

## Кинетика высвобождения кальция и фосфата с поверхности имплантатов в зависимости от способа нанесения покрытия

### Аннотация

На модели *in vitro* изучена биодоступность кальция и фосфата с поверхности стержней с кальций-фосфатным покрытием, выполненным по различным технологиям. Обнаружено, что количество высвобожденных остеотропных элементов зависит от технологии нанесения кальций-фосфата. Отмечается, что различия в биодоступности кальция и фосфата для имплантатов с разной технологией нанесения должны обуславливать и различия в показаниях к их применению.

### Введение

В настоящее время в травматологии и ортопедии актуальным направлением является поиск безопасных и эффективных материалов и технологий для лечения заболеваний скелета, основанных на использовании имплантатов с биоактивным покрытием [1], [2]. В этом плане перспективными являются кальций-фосфатные соединения. Показания к таким медицинским изделиям достаточно широкие, поэтому с разной степенью эффективности они используются для лечения многих заболеваний костной системы [3]-[5]. Технологии нанесения покрытий также разнообразны [6]-[9]. Показано, что биологический ответ организма на кальций-фосфатные покрытия различен и эти различия определяются, в том числе, биодоступностью остеотропных элементов, высвобождающихся с поверхности изделия, что может зависеть от технологии нанесения кальций-фосфата [10]. Данные обстоятельства, по нашему мнению, априори определяют различия в показаниях к применению имплантатов с кальций-фосфатными покрытиями в зависимости от технологии нанесения последних. Подобные факторы в показаниях к применению практически не учитываются. Число исследований в данном направлении незначительно [11], [12].

**Цель исследования:** изучить кинетику высвобождения кальция и фосфата с поверхности стержней в зависимости от способа нанесения на них биоактивного слоя и на основе полученных данных конкретизировать показания для применения этих изделий.

### Материалы и методы

Выполнены четыре серии экспериментов *in vitro* (1-3 – опытные серии, 4 – контрольная). Во всех сериях тестировали стержни из титанового сплава Ti6Al4V. На поверхность стержней (диаметр 1,8 мм) опытных серий был нанесен кальций-фосфатный слой [13]: в серии 1 использовали метод высокочастотного магнетронного распыления (ВЧМР; 12 образцов, толщина слоя 1,5 мкм); в серии 2 – микродугового оксидирования (МДО; 12 образцов, толщина слоя 40 мкм); в серии 3 на поверхность образцов был нанесен кальций-фосфатный слой в виде композита сополимером тетрафторэтилена с винилиденфторидом (12 образцов, толщина слоя 80 мкм) методом пневматического распыления. В контрольной серии тестировали стержни без покрытия (12 образцов). Каждый исследуемый образец (по 12 образцов в серии) помещали в отдельную измерительную ячейку, заполненную изотоническим 0,9%-ным раствором хлорида натрия (раствор электролита). Объем электролита определяли из расчета 4 мл на 1 см<sup>2</sup> поверхности стержня. Далее образцы инкубировали в термостате при температуре 37 °С. После недели инкубации электролит меняли: старый подвергали химическому анализу на наличие ионов кальция и фосфата, а на место старого раствора заливали новый. Длительность инкубации для образцов 1-й и 2-й серий составила 7 недель, для 3-й и 4-й серий – 21 неделю. Временем окончания инкубации считали окончание третьей недели инкубации, в ходе которой ионы кальция и фосфата в среде электролита не

обнаруживались. Определение ионов кальция и фосфата осуществляли с помощью реагентов фирмы «Vital Diagnostic» (Россия) на фотометре «Stat Fax 1904+» (США).

Часть образцов (по 6 в каждой серии) после инкубации в течение четырех недель извлекали и осуществляли оценку поверхности визуально макроскопически, а также методами сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и рентгеновского электронно-зондового микроанализа (в 10 точках на каждом образце определяли содержание кальция и фосфора *W* в % вес.) с помощью СЭМ «Phenom ProX» на базе ООО «Мелитэк» (г. Москва). За контрольные принимали результаты, полученные с этих же образцов перед началом экспериментов.

Для каждого анализируемого параметра определяли средние значения (*M*) и стандартное отклонение (*SD*). Достоверность различий оценивали с помощью критерия Крускала-Уоллиса с последующим применением критерия Данна. Исследования выполнены с учетом рекомендаций ГОСТ ISO 10993-15–2011 «Межгосударственный стандарт. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 15. Идентификация и количественное определение продуктов деградации изделий из металлов и сплавов».

### Результаты исследований

Результаты выполненных исследований показали, что в серии 1 при визуальной оценке и СЭМ образцов перед началом инкубации биоактивный слой имел глянцевую гладкую структуру без наличия пор (*рис. 1а, 2а*). Содержание Са составляло  $(10,47 \pm 0,3)$  % вес., Р –  $(3,85 \pm 0,17)$  % вес., соотношение Са / Р – 2,72. Через 4 недели инкубации у всех образцов как визуально макроскопически, так и методом СЭМ определяли нарушение целостности кальций-фосфатного слоя. Поверхность имплантатов состояла из мозаично расположенных участков биоактивного покрытия. Остатную площадь занимали участки, на которых покрытие отсутствовало либо происходило его слущивание (*рис. 1б, 2а*).

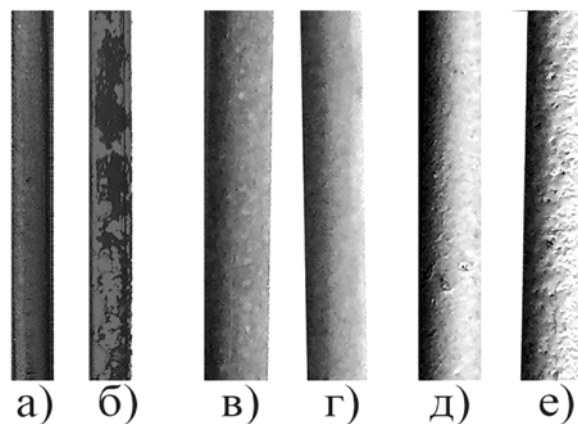


Рис. 1. Внешний вид тестируемых образцов. Перед началом инкубации: а) серия 1; в) серия 2; д) серия 3; через 28 суток инкубации: б) серия 1; г) серия 2; е) серия 3

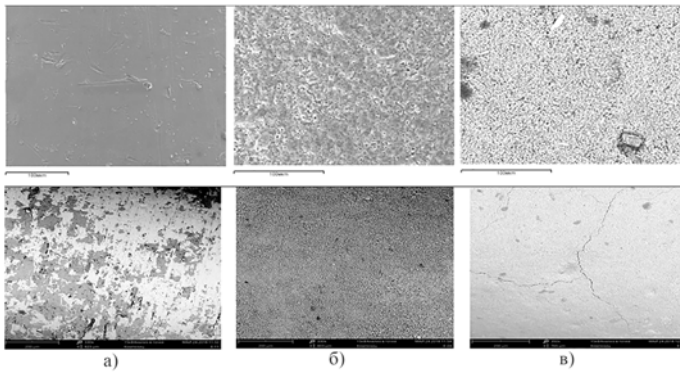


Рис. 2. Увеличенная поверхность тестируемых образцов: верхний ряд – перед инкубацией (СЭМ, увеличение 400х); нижний ряд – через 28 суток инкубации (СЭМ, увеличение 330х); а) серия 1; б) серия 2; в) серия 3

Рентгеновский электронно-зондовый микроанализ показал уменьшение концентрации как Ca ( $p = 0,0001$ ), так и фосфата ( $p = 0,0001$ ) на поверхности образцов. В этот период содержание Ca составляло  $(1,59 \pm 1,62) \% \text{ вес.}$ , а содержание P снижалось до  $(1,13 \pm 0,9) \% \text{ вес.}$  Соотношение Ca / P составляло 1,4.

У образцов серии 2 поверхность перед началом опыта была матового серого цвета, шероховатой пористой структуры (рис. 1в, 2б). Содержание кальция и фосфора на поверхности имплантатов составляло  $(6,94 \pm 0,47)$  и  $(16,3 \pm 0,4) \% \text{ вес.}$  соответственно, а соотношение Ca / P было 0,42. Через 4 недели инкубации при макроскопической оценке этих образцов видимых различий их поверхности в сравнении с состоянием до инкубации не было обнаружено (рис. 1г). Микроскопически целостность биоактивного слоя была сохранена, трещин и повреждений другого характера не было выявлено (рис. 2б). При этом, так же как и в серии 1, регистрировали достоверное уменьшение содержания Ca до  $(2,25 \pm 0,62) \% \text{ вес.}$  ( $p = 0,0003$ ) и фосфата до  $(14,4 \pm 1,87) \% \text{ вес.}$  ( $p = 0,007$ ). Соотношение Ca / P также было снижено и составляло 0,15.

В серии 3 поверхность тестовых образцов перед началом опыта была шероховатая, пористая, белого матового цвета, без признаков повреждения (рис. 1д, 2в). Содержание кальция на их поверхности составляло  $(18,49 \pm 0,37) \% \text{ вес.}$ ; фосфора –  $(5,36 \pm 0,01) \% \text{ вес.}$ ; соотношение Ca / P – 3,45. Через 28 суток после инкубации визуально макроскопически поверхность образцов становилась более шероховатой, увеличивалось количество пор, цвет при этом не изменялся (рис. 1е). Методом СЭМ на всех образцах наблюдали признаки повреждения кальций-фосфатного покрытия в виде стабильных редко расположенных криволинейных трещин различной протяженности (рис. 2в). При рентгеновском электронно-зондовом микроанализе поверхности биоактивного слоя в этот период регистрировали повышение содержания Ca до  $(23,99 \pm 2,15) \% \text{ вес.}$  ( $p = 0,0004$ ) по сравнению со значениями до инкубации. На данном этапе содержание P достоверно не изменилось ( $p = 0,96$ ) и составляло  $(4,51 \pm 2,19) \% \text{ вес.}$  Отношение Ca / P было 6,97.

Изучение динамики высвобождавшихся в раствор электролита ионов кальция показало, что для образцов серии 1 максимальное значение высвобождающегося кальция было отмечено через неделю инкубации, через 4 недели кальция в электролите не было обнаружено (рис. 3а), суммарное количество высвобожденного кальция в среднем составило  $(0,814 \pm 0,197) \text{ мкмоль/см}^2$  (рис. 3в). Для образцов серии 2 максимальное значение высвобождающегося кальция отмечено через неделю инкубации, через 5 недель кальция в электролите не обнаружено (рис. 3а), суммарное количество высвобожденного кальция в среднем составило  $(1,436 \pm 0,082) \text{ мкмоль/см}^2$  (рис. 3в). Для образцов серии 3 максимальное значение высвобождающегося кальция было отмечено на 14-й неделе инкубации, через 22 недели инкубации кальция в электролите не было обнаружено (рис. 3б), суммарное количество высвобожденного кальция в среднем составило  $(15,137 \pm 0,112) \text{ мкмоль/см}^2$  (рис. 3г). В контрольной серии кальция в электролите после

инкубации на всех неделях исследования не было обнаружено.

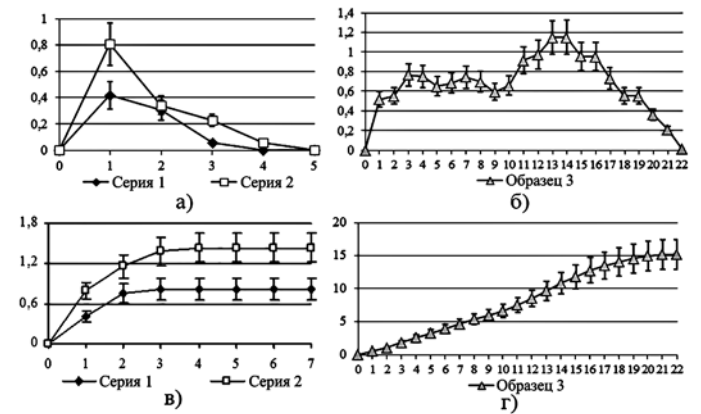


Рис. 3. Количество высвобождавшегося иона кальция с поверхности образцов: а), б) кальция за неделю, мкмоль/см<sup>2</sup>; в), г) кальция суммарно за все время инкубации, мкмоль/см<sup>2</sup>

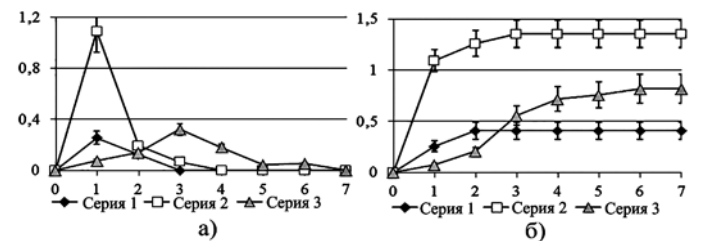


Рис. 4. Количество высвобождавшегося фосфат-иона с поверхности спиц: а) фосфат-иона за неделю, мкмоль/см<sup>2</sup>; б) фосфат-иона суммарно за все время инкубации, мкмоль/см<sup>2</sup>

Биодоступность фосфат-иона была значительно ниже. Для образцов серии 1 максимальное значение высвобождающегося фосфата было отмечено через неделю инкубации, через 3 недели фосфата в электролите не обнаружено (рис. 4а), суммарное количество высвобожденного фосфата в среднем составило  $(0,405 \pm 0,103) \text{ мкмоль/см}^2$  (рис. 4б). Для образцов серии 2 максимальное значение высвобождающегося фосфата было отмечено через неделю инкубации, через 4 недели фосфата в электролите не было обнаружено (рис. 4а), суммарное количество высвобожденного фосфата в среднем составило  $(1,451 \pm 0,153) \text{ мкмоль/см}^2$  (рис. 4б). Для образцов серии 3 максимальное значение высвобождающегося фосфата отмечено на 3-й неделе инкубации, через 7 недель инкубации фосфата в электролите не было обнаружено (рис. 4а), суммарное количество высвобожденного фосфата в среднем составило  $(0,817 \pm 0,185) \text{ мкмоль/см}^2$  (рис. 4б). В контрольной серии фосфат-ионов в электролите после инкубации на всех неделях исследования не было обнаружено.

Проведенное исследование обнаружило, что способ нанесения кальций-фосфатного покрытия определяет две важные характеристики имплантируемого изделия: 1) количество кальция и фосфата на его поверхности; 2) кинетику высвобождения этих ионов с поверхности (т. е. биодоступность кальция и фосфата).

Очевидно, что для задач клинической практики наиболее важен показатель биодоступности указанных ионов. В этом плане нами прежде всего было обнаружено отсутствие зависимости между исходным количеством кальция на поверхности стержня с его биодоступностью. Во-первых, у образцов серии 1 количество нанесенного кальция было выше, чем у образцов серии 2, однако в серии 2 суммарное число вышедшего в раствор кальция было выше, чем в серии 1. Во-вторых, существует значительная разница в конечном объеме биодоступных, высвобожденных с поверхности, кальция и фосфата. Эти параметры, на наш взгляд, определяют то, что показания к применению костных имплантатов с кальций-фосфатным покрытием должны обязательно составляться с учетом кинетики ос-

вобождения остеотропных элементов. Так, использование изделия, протестированного в серии 1, в связи с относительно низкой биодоступностью как кальция, так и фосфата может быть показано для применения в качестве элементов связи (ЭС) в опорах аппарата Илизарова – классический остеосинтез при лечении любых заболеваний и травм костей.

Применение изделия, протестированного в серии 2, может быть показано в виде интрамедуллярных имплантатов при лечении переломов костей или удлинения конечностей. Применение изделия, протестированного в серии 3, может быть показано для лечения врожденных системных заболеваний опорно-двигательного аппарата (несовершенный остеогенез, болезнь Олье, рахитоподобные заболевания, остеопороз, фиброзная дисплазия и др.).

### Заключение

Результаты выполненного исследования показывают, что кинетика высвобождения кальция и фосфата с поверхности стержней с кальций-фосфатным покрытием зависит от технологии его нанесения. Это определяет необходимость уточнения (конкретизации) показаний для применения таких медицинских изделий для клинической практики.

**Работа выполнена в рамках программы НИР государственного задания на 2018-2020 гг. «Разработка и экспериментальное обоснование биоактивного кастомизированного остеосинтеза».**

### Список литературы:

1. Barrère F., van der Valk C.M., Dalmeijer R.A., Meijer G., van Blitterswijk C.A., de Groot K., Layrolle P. Osteogenicity of octacalcium phosphate coatings applied on porous metal implants // J. Biomed. Mater. Res A. 2003. Vol. 66. № 4. PP. 779-788.
2. Fujibayashi S., Neo M., Kim H.M., Kokubo T., Nakamura T. Osteoinduction of porous bioactive titanium metal // Biomaterials. 2004. Vol. 25. № 3. PP. 443-450.
3. Гринь А.А., Сергеев К.С., Козлов Л.Б. Использование имплантатов, покрытых гидроксиапатитом, в лечении поврежденных костей таза // Фундаментальные исследования. 2010. № 10. С. 95-99.
4. Popkov D.A., Popkov A.V., Shurov V.A., Kononovich N.A. Functional Recovery after Operative Lower Limb Lengthening at High-Division Regime in Children // Novosti Khirurgii. 2016. Vol. 24. № 4. PP. 373-378.
5. Spivak J.M., Hasharoni A. Use of hydroxyapatite in spine surgery // Eur. Spine J. 2001. Vol. 10 (Suppl. 2). PP. 197-204.
6. Калмин О.В., Розен М.А., Никишин Д.В. Морфологические изменения костной ткани вокруг титанового имплантата, подвергшегося микродуговому оксидированию в щелочных электролитах с использованием «Коллапан-геля» и без него // Саратовский научно-медицинский журнал. 2013. № 4. С. 624-628.
7. Кашуро 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.
8. Назаров Е.А., Папков В.Г., Кузьманин С.А., Веснов И.Г. Изучение остеоинтеграции внутрикостных имплантатов с разными типами покрытий в условиях эксперимента // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. 2016. № 2. С. 62-67.

9. Tverdokhlebov S.I., Bolbasov E.N., Shesterikov E.V., Malchikhina A.I., Novikov V.A., Anissimov Y.G. Research of the surface properties of the thermoplastic copolymer of Vinylidene Fluoride and Tetrafluoroethylene modified with radio-frequency magnetron sputtering for medical application // Applied surface science. 2012. Vol. 263. PP. 187-194.
10. Кононович Н.А., Попков А.В., Шастов А.Л., Попков Д.А. Реакция тканей при использовании имплантатов с биоактивным покрытием // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2017. № 12. С. 1361-1369.
11. Гнеденков С.В., Шаркеев Ю.П., Синябрюхов С.Л., Хрисанфова О.А., Легостаева Е.В., Завидная А.Г., Пузь А.В., Хлусов И.А. Функциональные покрытия для имплантационных материалов // Тихоокеанский медицинский журнал. 2012. № 1. С. 12-19.
12. Yu M., Zhou K., Li Z., Zhang D. Preparation, characterization and in vitro gentamicin release of porous HA microspheres // Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. 2014. Vol. 45. № 1. PP. 306-312.
13. Остеоинтеграция биоактивных имплантатов при лечении переломов длинных трубчатых костей / Под ред. проф. А.В. Попкова. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2017. 304 с.

Наталья Андреевна Кононович,  
канд. вет. наук, вед. научный сотрудник,  
экспериментальная лаборатория,  
Максим Валерьевич Стогов,  
д-р биолог. наук, доцент,  
вед. научный сотрудник,  
лаборатория биохимии,  
Арнольд Васильевич Попков,  
д-р мед. наук, профессор,  
гл. научный сотрудник,  
лаборатория коррекции деформаций  
и удлинения конечностей,  
Елена Николаевна Горбач,  
канд. биол. наук, вед. научный сотрудник,  
лаборатория морфологии,  
Елена Анатольевна Киреева,  
канд. биолог. наук, ст. научный сотрудник,  
Наталья Владимировна Тушина,  
канд. биолог. наук, научный сотрудник,  
лаборатория биохимии,  
Дмитрий Арнольдович Попков,  
д-р мед. наук, руководитель,  
клиника нейроортопедии,  
ФГБУ «Российский научный центр  
«Восстановительная травматология и ортопедия»  
им. акад. Г.А. Илизарова» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации,  
г. Курган,  
e-mail: n.a.kononovich@mail.ru