

БІОАКТИВНІ КОМПОЗИЦІЙНІ СКЛОКРИСТАЛІЧНІ МАТЕРІАЛИ НА ОСНОВІ СТЕКОЛ СИСТЕМИ $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{R}_2\text{O}_3-\text{RO}_2-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$ ТА ПОЛІСАХАРИДІВ

Національний технічний університет «ХПІ», м. Харків

Встановлена перспективність використання біоактивних композиційних склокристалічних матеріалів на основі стекол системи $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{R}_2\text{O}_3-\text{RO}_2-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$ та полісахаридів при одержанні резорбційних імплантатів для кісткового ендопротезування зі скороченими строками резорбції. Досліджено розчинність та особливості формування апатитоподібного шару на поверхні карбонатмістячих кальційсилікофосфатних склокристалічних матеріалів *in vitro*.

Введення

На сьогоднішній день важливим аспектом при застосуванні біоактивних матеріалів як кісткових імплантатів є скорочення термінів реабілітації пацієнтів після протезування. Зважаючи на те, що кістка є біорезорбційним органічно-мінеральним композитом, для підвищення біоактивності імплантату з метою регулювання рівня їх резорбції до складу керамічних матеріалів поряд з біорезистивною фазою гідроксіапатиту кальцію (ГАП) вводять також біорезорбційні фази: склофазу та (або) кристалічні фази (трикальційфосфат, пірофосфат кальцію та ін.) [1].

Новий, перспективний підхід для поліпшення остеоіндуктивних властивостей біоактивних матеріалів є використання модифікованого ГАП $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, наприклад, карбонатгідроксіапатиту (КГАП) $\text{Ca}_{10-x}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_2$, який більш чітко відтворює склад кісткової тканини у порівнянні з немодифікованим ГАП і характеризується підвищеною біорезорбцією внаслідок мікровикривлень, які виникають при входженні карбонат-іона в структуру апатиту [1]. Наявність у складі склокристалічних матеріалів (далі СКМ) КГАП В-типу дозволить суттєво підвищити їх біологічну активність за рахунок наближення їх складу до складу молоді кістки [2, 3]. Комлевим В.С. зі співавторами встановлено, що при збільшенні вмісту груп CO_3^{2-} у структурі КГАП та зниженні температури його утворення спостерігається зменшення розмірів кристалів КГАП і зростання початкової швидкості його розчинення. Різноступеневана дія факторів розміру кристалів і ступеня заповнення А-позицій приводить до немонотонної зміни швидкості резорбції внаслідок збільшення вмісту CO_3^{2-} -іонів [4].

Кристалізація КГАП у структурі біоактивних кальційфосфатних матеріалів можлива, зок-

рема, при введенні до їх складу карбонатомісних органічних компонентів [4,5]. При створенні функціональних матеріалів для заміщення кісткових дефектів доцільно використовувати дешеві, технологічні та безпечні компоненти, зокрема замінити білок на імуноінертний полісахарид хітозан, який характеризується біосумісністю та антибактеріальними властивостями [6]. Використання хітозану як носія карбонатних груп у складі фосфатів кальцію також дозволить вирішити проблему раціонального використання хітину. Відомо, що одержаний з водяного розчину при низькій температурі з додаванням хітозану нанокристалічний карбонат-апатит може бути використаний при заміщенні кісткових дефектів з активацією біорезорбції карбонат-апатиту [2]. Однак, використання кераміки на основі КГАП як основи при одержанні біоактивних кісткових імплантатів обмежується її низькими механічними властивостями.

Основною умовою успішної адаптації біоактивних матеріалів в умовах *in vivo* є їх висока біологічна сумісність з живими тканинами, яка визначається їх нетоксичністю та остеокондуктивністю. В свою чергу, остеокондуктивність, як процес залучення та міграції остеобластів на поверхню імплантату, пов'язана з можливістю утворення на поверхні матеріалу полікристалічного кальційфосфатного шару з апатитоподібною структурою близькою до структури кісткового карбонатгідроксіапатиту та забезпечення його міцного зчеплення з кісткою [7]. Перспективним напрямом розвитку біоактивних матеріалів для кісткового ендопротезування є створення резорбційних СКМ на основі КГАП з міцностними властивостями наближеними до відповідних властивостей кісткової тканини. Введення хітозану до складу кальційсилікофосфатних СКМ не тільки наблизить склад СКМ

до складу молоді ківки, що є важливим фактором при скороченні реабілітаційного періоду пацієнтів після імплантування, а також дозволить зменшити собівартість імплантатів та підвищити технологічність процесу їх одержання за рахунок зниження температури їх термооброблення, що є важливим фактором при впровадженні продукту на вітчизняному ринку. Отже, розробка резорбційних біоактивних СКМ на основі кальційсилікофосфатних стекол і полісахаридів дозволить одержати кісткові ендопротези з остеокодуктивними властивостями зі скороченими строками резорбції, які можуть використовуватися при змінних навантаженнях, що і визначає актуальність даної роботи.

Метою даної роботи є розробка біоактивних композиційних склокристалічних матеріалів на основі стекол системи $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{R}_2\text{O}_3-\text{RO}_2-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$ та полісахаридів і дослідження їх розчинності та особливостей формування апатитоподібного шару на їх поверхні *in vitro*.

Наявність кристалічної фази в дослідних матеріалах було встановлено за допомогою рентгенофазового аналізу (РФА) на «ДРОН-3». Петрографічні дослідження було виконано з використанням оптичного мікроскопа МІН-8. Концентраційний розподіл елементів Ca, P та Si в поверхневих шарах матеріалів після витримання *in vitro* визначали за допомогою енергодисперсійного рентгенофлуоресцентного аналізу на спектрометрі «СПРУТ».

Ступінь розчинності, яка характеризує здатність дослідних матеріалів до резорбції, визначали у фізіологічних рідинах та білку крові, що були обрані відповідно до складу міжклітинної речовини рідкої тканини крові людини (плазми). Зважаючи на те, що плазма складається на 92–92% з води, доцільним є вивчення розчинності дослідних матеріалів після витримання у дистильованій воді (ДВ) протягом 30 діб. Ступінь вилуговування у ДВ іонів кальцію $\text{P}_{\text{Ca}^{2+}}$ визначали методом порівняння зі стандартним розчином на фотометричному полум'яному фотометрі ПФМ-УЧ.І., іонів фосфору $\text{P}_{\text{P}^{5+}}$ – на фотоколориметрі КФК-2. Водневий показник (рН) дослідного розчину вимірювали на рН-метрі.

Оцінювання біологічної дії склокристалічних матеріалів у фізіологічних рідинах було виконано з використанням фізіологічного розчину (ФР) (0,9% NaCl) за ГОСТ Р 52770-2007 [8] та модельної рідини організму (МРО) на основі TRIS-HCl та катіонів Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} і аніонів Cl^- , HCO_3^- , HPO_4^{2-} за ISO 23317:2012 [9].

Розчинність дослідних матеріалів визначали за втратами маси після витримання у ДВ ($V_{\text{ДВ}}$, %) та ФР ($V_{\text{ФР}}$, %), протягом 30 діб та за втратами маси ($V_{\text{МРО}}$, %) протягом 72 год в МРО,

кінетику осадження на поверхні дослідних матеріалів визначали за приростом маси ($\text{P}_{\text{м.р.о}}$, %) в МРО протягом 30, 90 та 180 діб при температурі 37°C.

З метою встановлення впливу органічної складової на процеси резорбції дослідних матеріалів *in vitro* було виконано дослідження їх розчинності у 10%-ному розчині альбуміну (А) протягом 30 діб при температурі 0°C, яке було проаналізовано за втратами маси дослідних матеріалів ($V_{\text{А}}$, %).

Оцінювання біосумісності дослідних матеріалів було виконано в ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І Сітенка АМНУ» (м. Харків) після витримання у живому організмі протягом 7, 14, 60, 90 та 180 діб.

Експериментальна частина

З метою розробки біоактивних карбонатвмісних СКМ як матриця був обраний раніше синтезований СКМ БС-11 на основі системи $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{R}_2\text{O}_3-\text{RO}_2-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$. За даними попередніх досліджень встановлено, що СКМ БС-11 з вмістом кристалічної фази ГАП у кількості 60% та розмірами кристалів від 3 до 8 мкм характеризується незначним рівнем резорбції [10] та високими механічними властивостями [11], що дозволяє його використовувати у якості основи при одержанні кісткових ендопротезів, які експлуатуються в умовах змінних навантажень.

Для порівняння ступеня резорбції та інтенсивності формування апатитового шару на поверхні дослідних СКМ та вихідного СКМ БС-11 *in vitro* було використано резорбційний СКМ ЦФ-1, одержаний нами раніше в системі $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{R}_2\text{O}_3-\text{RO}_2-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$ при співвідношенні $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5=4$, який характеризується вмістом КГАП близько 30% та розміром кристалів близько 1 мкм у складі матеріалу після термооброблення [12].

Результати вивчення перебудови кістки в ділянці імплантації дослідних матеріалів БС-11 та ЦФ-1 та патоморфологічного дослідження внутрішніх органів шурів, свідчать про відсутність у аналізованих матеріалах явищ токсичної дії, про їх біологічну сумісність та можливість використання як кісткових ендопротезів.

При одержанні дослідних карбонатвмісних СКМ до складу матеріалу БС-11 було додано полісахариди хітозан (Х) та, для порівняння глюкозамін (ГА) у кількості 10 та 50 мас.ч. на 100 мас.ч матеріалу. Введення вищенаведеної кількості полісахаридів за даними авторів [7] приведе до заміщення переважно груп PO_4^{3-} на групи CO_3^{2-} та утворення КГАП В-типу, що є необхідним при формуванні молоді ківки.

Дослідні СКМ були одержані: на основі Х з маркуванням БС-11Х10 та БС-11Х50 при співвідношеннях БС-11/Х=90/10 та БС-11/Х=

=50/50; на основі ГА з маркуванням БС–11ГА10 та БС–11ГА50 при співвідношеннях БС–11/Г=90/10 та БС–11/ГА=50/50 відповідно.

Для одержання дослідних СКМ був обраний порошок СКМ БС-11 до залишку наситі № 008 та порошки полісахаридів. Дослідні зразки матеріалів готували методом напівсухого пресування з використанням у якості тимчасової зв'язки КМЦ.

Температура термооброблення дослідних СКМ за одностадійним режимом складала 850°C з витримування 0,5 год і була нижчою від температури термооброблення вихідного СКМ БС-11 на 200°C.

Слід зазначити, що після термооброблення дослідні СКМ характеризувалися значним зсіданням, тому для їх одержання у вигляді циліндрів діаметром 2 мм та висотою 10 мм вихідні композиційні СКМ мали наступні параметри: для дослідних СКМ з вмістом 50% полісахариду діаметр циліндрів складав 4 мм, висота – 20 мм, для дослідних СКМ з вмістом 10% полісахариду діаметр циліндрів складав 2,2 мм, висота – 11 мм.

Результати та їх обговорення

За результатами дослідження ступеня резорбції дослідних СКМ у фізіологічних рідинах та білку крові встановлено, що втрати їх маси зростають зі збільшенням у складі СКМ полісахариду та складають від 2,33 до 6,05%, що є на 30–50% більше втрат маси вихідного СКМ БС-11 та резорбційного СКМ ЦФ-1 (рис. 1).

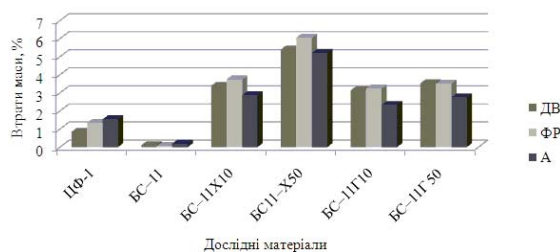


Рис. 1. Втрати маси дослідних склокристалічних матеріалів у фізіологічних рідинах та альбуміні

Визначення виходу іонів Ca^{2+} , P^{5+} та рН розчину після витримування дослідних матеріалів у ДВ показало, що СКМ БС-11ГА10 та БС-11Х10, які характеризуються втратами маси у ДВ відповідно 3,13 та 3,39% та виходом іонів Ca^{2+} від 0,044 до 0,048% та P^{5+} від 0,43 до 0,53%, в умовах *in vitro* створюють умови для забезпечення рН=7,2, що є необхідним для формування апатитоподібного шару в умовах *in vivo*. Зі збільшенням кількості полісахаридної складової для матеріалів БС-11ГА50 та БС-11Х50 спостерігається підвищення їх розчинності, виходу іонів Ca^{2+} та P^{5+} та зниження рівня рН до 5,25 (табл. 1), що може негативно позначитися на біоактивності матеріалів.

За даними РФА було встановлено, що в СКМ БС–11Х10 та БС–11ГА10 спостерігається зниження інтенсивності дифракційних максимумів кристалічної фази ГАП та поява КАП при порівнянні з фазовим складом вихідного СКМ БС-11. За даними петрографічних досліджень для СКМ БС–11Х10 виявлено зменшення розміру часток ГАП у його складі до 1 мкм та кількості до 30% та поява кристалів КАП розміром до 1 мкм у кількості 5%. Подальше підвищення вмісту полісахаридів у складі дослідних СКМ до 50 мас.ч. позначається на підвищенні вмісту КАП у їх складі до 20%, що може суттєво підвищити резорбцію та знизити механічні властивості дослідних матеріалів *in vivo*.

Таблиця 1

Вихід іонів Ca^{2+} , P^{5+} та рН розчину після витримування дослідних склокристалічних матеріалів у дистильованій воді

Дослідні склокристалічні матеріали	Вихід іонів Ca^{2+} , P^{5+} , %		рН розчину
	$V_{Ca^{2+}}$	$V_{P^{5+}}$	
БС-11ГА 10	0,0440	0,43000	7,20
БС-11ГА50	0,0460	0,47000	5,25
БС-11Х 10	0,0480	0,45000	7,20
БС-11Х 50	0,0650	0,53000	6,10
БС-11	0,0385	0,00363	5,40
ЦФ-1	0,0880	0,35000	7,29

З метою встановлення особливостей формування апатитоподібного шару на поверхні дослідних СКМ *in vitro* було досліджено їх розчинність протягом 72 год та кінетику їх осадження впродовж 30, 60, 90 та 180 діб у МРО. Встановлено, що для дослідних СКМ спостерігається зростання втрат маси у МРО протягом 72 год при порівнянні з втратами маси вихідного матеріалу БС-11 та ЦФ-1 за означений період (рис. 2, 3). Підвищення розчинності дослідних СКМ пояснюється наявністю кристалічних фаз ГАП та КАП (КГАП) у їх складі та зниженням рівня дисперсності даної кристалічної фази після термооброблення при температурі 850°C, що підтверджується даними петрографічного аналізу. За результатами дослідження кінетики осадження дослідних СКМ у МРО встановлено, що даний процес має параболічний характер з його суттєвим зростанням вже після 90 діб. Експериментально показано, що показники P_{MPO} для дослідних СКМ збільшуються відповідно до зростання їх розчинності у МРО: дослідні СКМ БС-11ГА10, БС-11Х10 та БС-11ГА50 з близькими значеннями $V_{ДВ}$ та V_{MPO} через 72 год характеризуються показниками P_{MPO} через 180 діб близько 8%. Для дослідного СКМ БС-11Х 50 показник P_{MPO} через 180 діб складає близько 10% і є найвищим серед дослідних матеріалів (табл. 3).

Однак, значний збільшення маси для матеріалу БС-11Х50 *in vitro* може негативно позначитися як на механічних властивостях імплантату, так і на протіканні біохімічних реакцій в процесі мінералізації кісткового матриксу *in vivo*. Тому імплантат на основі даного матеріал не може бути рекомендований для використання на навантажених ділянках кісткового скелету, а лише для заліковування кісткових дефектів.

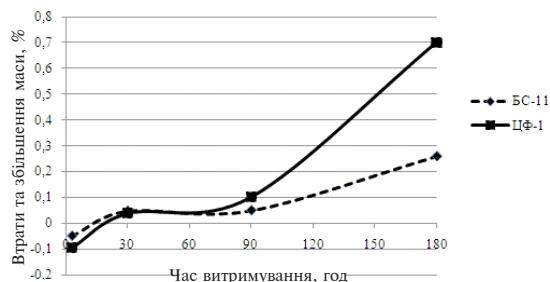


Рис. 2. Розчинність та кінетика осадження на поверхні вихідних дослідних матеріалів у МРО

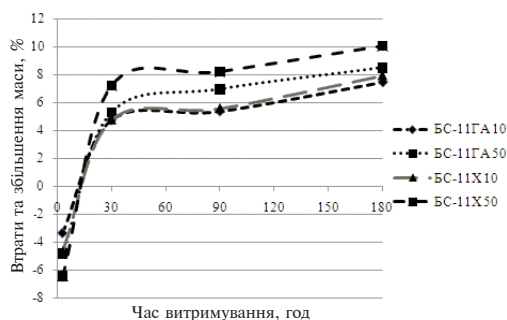


Рис. 3. Розчинність та кінетика осадження на поверхні композиційних дослідних матеріалів у МРО

На основі здійснених досліджень і з урахуванням технологічних та економічних показників у якості карбонатомісної сировини при одержанні резорбційних біоактивних імплантатів, які можуть експлуатуватися при змінних навантаженнях кісткової тканини, рекомендується введення хітозану у кількості 10 мас.ч. на 100 мас.ч фрити.

Отже, забезпечення продукту об'ємної тонко дисперсної кристалізації КГАП у кількості близько 35% з розміром кристалів до 1 мкм у складі кальційсилікофосфатних карбонатомісних СКМ та співвідношення $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5=4$ в об'ємі вихідних матеріалів створює умови для забезпечення їх розчинності у фізіологічних рідинах

протягом 30 днів в межах від 2,7 до 3,5% та відносить їх до резорбційних біоактивних матеріалів [13]. Встановлено, що процес кінетики осадження після витримування дослідних матеріалів у МРО впродовж 180 днів має параболічний характер з його суттєвим зростанням вже після 90 днів, що може свідчити про початкову мінералізацію кісткового матриксу з апатитоподібною структурою на поверхні імплантатів *in vivo* впродовж трьох місяців.

З урахуванням результатів попередніх клініко-біологічних досліджень СКМ БС-11 та ЦФ-1, які свідчать про прояв їх біологічної сумісності вже через 90 днів, було досліджено елементний склад шару, який утворився на поверхні СКМ БС-11Х10 в умовах витримування у МРО за вказаний період. За результатами співставлення співвідношення $\text{Si}:\text{Ca}:\text{P}$ на поверхні СКМ БС-11Х10 з даним співвідношенням на поверхні СКМ БС-11 та ЦФ-1 (табл. 2) встановлено, що забезпечення співвідношення $\text{Si}:\text{Ca}:\text{P}=1:5:7$, яке спостерігається на поверхні СКМ БС-11Х10 вказує на зростання інтенсивності утворення апатитоподібного шару на його поверхні за період 90 днів (табл. 2). Забезпечення даного співвідношення реалізується шляхом стимулювання гомогенного та гетерогенного зародкоутворення кристалів КГАП за рахунок кристалізації фосфатів кальцію в об'ємі та ініціюючої дії нуклеаторів $\text{Si}-\text{OH}$ на поверхні дослідних СКМ (табл. 2).

Таким чином, введення імуноінертного полісахариду хітозану у кількості 10 мас.ч до складу кальційсилікофосфатних СКМ дозволить підвищити рівень їх резорбції *in vitro* та забезпечити формування апатитоподібного шару на їх поверхні протягом 90 днів, що дозволить прискорити утворення міцного зв'язку імплантату з кісткою, та, в результаті скоротити строки їх зрощування.

Висновки

Розроблено біоактивні композиційні склокристалічні матеріали для кісткового ендопротезування на основі стекол системи $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{R}_2\text{O}_3-\text{RO}_2-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$ та полісахаридів за одностадійним режимом при температурі термооброблення 850°C . Встановлена перспективність використання хітозану при одержанні резорбційних імплантатів, які експлуатуються при змінних навантаженнях кісткової тканини.

Таблиця 2

Співвідношення $\text{Si}:\text{Ca}:\text{P}$ на поверхні дослідних склокристалічних матеріалів та після витримки їх в МРО

Співвідношення $\text{Si}:\text{Ca}:\text{P}$	Дослідні склокристалічні матеріали				
	ЦФ-1		БС-11		БС-11Х10
	до витримування	після витримування в МРО, 90 днів	до витримування	після витримування в МРО, 90 днів	після витримування в МРО, 90 днів
	1:0,6:0,23	1:2,2:2,7	1:0,5:0,2	1:1,1:1,35	1:5:7,1

Встановлено умови забезпечення розчинності карбонатомісних кальційсилікофосфатних склокристалічних матеріалів у фізіологічних рідинах згідно з вимогами до біоактивних матеріалів. Визначено оптимальний вихід іонів кальцію та фосфору впродовж 30 діб для забезпечення певних значень рН як визначального фактора протікання процесу апатитоутворення на поверхні імплантатів на початкових стадіях їх зрощування з кісткою. Досліджено розчинність дослідних склокристалічних матеріалів у фізіологічних розчинах та кінетику осадження на їх поверхні іонів Si^{4+} , Ca^{2+} та P^{5+} у модельній рідині організму впродовж 180 діб. Експериментально підтверджено формування апатитоподібного шару на поверхні дослідних матеріалів впродовж 90 діб при забезпеченні співвідношення $Si:Ca:P=1:5:7,1$ in vitro.

Розроблені біоактивні карбонатомісні кальційсилікофосфатні склокристалічні матеріали з активацією біорезорбції карбонат-апатиту є перспективними при одержанні кісткових ендопротезів в ортопедії та хірургії з терміном зрощування близько трьох місяців.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Композиционная керамика, содержащая биорезорбируемую фазу* / Т.В. Сафронова, В.И. Путляев, М.А. Шехирев, А.В. Кузнецов // *Стекло и керамика* . – 2007. – № 3. – С.31-35.
2. *Murugan R., Ramakrishna R. Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nanohydroxyapatite* // *Biomaterials* . – 2004. – Vol.25. – P.3829-3835.
3. *Thermal transformations of the mineral component of composite biomaterials based on chitosan and apatite* / Danilchenko S.N., Kalinkevich O.V., Kuznetsov V.N. and other // *Cryst. Res. Technol.* – 2010. – P.1-7.
4. *Влияние содержания карбонат-групп в карбонат-гидроксиапатитовой керамике на ее поведение in vivo* / Комлев В.С., Фадеева И.В., Гурин А.Н. и др. // *Неорганические материалы*. – 2009 – № 45(3). – С.373-378.
5. *Получение композитных биоматериалов на основе фосфатов кальция и хитозана из мицелиального гриба Blakeslea trispora* / Калинкевич О.В., Скляр А.М., Данильченко С.Н. и др. // *Сучасне матеріалознавство: матеріали та технології матеріалів: Тез. докл. Всеукр. конф. молодих вчених*. – К.: Інститут металофізики ім. Г.В. Курдюмова, 2008. – С.2-20.
6. *Композитные биоматериалы на основе хитозана и нанокристаллических неорганических соединений* / Калинкевич О.В., Калинкевич А.Н., Данильченко С.Н. и др. // *Наноструктурные материалы – 2010: Беларусь–Россия–Украина: Тез. докл. II Междунар. конф.* – К.: Інститут металофізики ім. Г.В. Курдюмова, 2010. – С.668.
7. *Саркисов П.Д. Направленная кристаллизация стекла – основа получения многофункциональных стеклокристаллических материалов*. – М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 1997. – 218 с.
8. *ГОСТ Р 52770-2007. Изделия медицинские. Требования безопасности. Методы санитарно-химических и токсикологических испытаний. Введен в действие 01.07. 2008*. – М.: Госстандарт России, 2008. – 31 с.
9. *ISO 23317:2012. Implants for surgery – In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials*. – International Standard published 28. 09. 2012. – 13 p.
10. *Саввова О.В., Брагіна Л.Л., Бабіч О.В. Дослідження розчинності спечених кальційсилікофосфатних склокристалічних матеріалів* // *Вопр. химии и хим. технологии*. – 2011. – № 5. – С.146-150.
11. *Влияв структури на механічні властивості склокерамічних кальційсилікофосфатних матеріалів для кісткового ендопротезування* / О.В. Саввова, О.В. Бабіч, Г.М. Шадріна, Д.Є. Пантус // *Сборник трудов ОАО “УкрНИИогнеупоров им. А.С. Бережного”*. – 2012. – № 112. – С.282-290.
12. *Саввова О.В., Бабіч О.В. Дослідження впливу цинку на кристалізацію стекел в системі $Na_2O-CaO-ZnO-Al_2O_3-B_2O_3-P_2O_5-SiO_2$* // *Східно-Європейський журнал передових технологій*. – 2012. – Вип. 2/6(56). – С.51-54.

Надійшла до редакції 11.11.2013