

Остеоиндуктивные, остеокондуктивные и электрохимические свойства кальцийфосфатных покрытий на титановых имплантатах и влияние их на минеральный обмен при переломах трубчатых костей в эксперименте

А.В. Карлов, В.И. Верещагин, В.П. Шахов, В.П. Игнатов, О.И. Налесник

Osteoinductive, osteoconductive and electrochemical properties of calcium phosphate coatings on titanium implants and their effect on mineral metabolism in experimental fractures of tubular bones

A.V. Karlov, V.I. Verechshagin, V.P. Shakhov, V.P. Ignatov, O.I. Nalesnick

Центр ортопедии и медицинского материаловедения Томского научного центра Сибирского отделения РАН

Исследовали способность оксидированных и кальцийфосфатных покрытий, нанесенных на чистый титан или его сплавы, к самопассивации при нагрузках и к проявлению остеоиндуктивных (ОИ) и остеокондуктивных (ОК) свойств с помощью модели эктопического костеобразования. Установлено, что защитные пленки обладают способностью к самовосстановлению при действии циклических нагрузок, что свидетельствует об их высокой биосовместимости. Оксидированный титан и титан с нанесением на него тонкого кальцийфосфатного покрытия электрохимическим методом не проявляет ОИ свойств. Данные кальцийфосфатные покрытия обладают ОК и хорошо сцепляются с окружающими тканями. ОИ свойствами обладают только текстурированные макропористые кальцийфосфатные покрытия.

Ключевые слова: эксперимент, имплантат титановый, оксидированные покрытия, кальцийфосфатные покрытия, эктопическое костеобразование, остеоиндуктивные свойства, остеокондуктивные свойства, минеральный обмен

Capability of oxidated and calcium phosphate coatings, applicated to pure titanium or its alloys, have been studied for selfpassivation in loadings and manifestation of osteoinductive (OI) and osteoconductive (OC) properties with a model of ectopic osteogenesis. It is established, that protective films are capable of self recovery under cyclic loadings, demonstrating their high biocompatibility. Both oxidated titanium and titanium with applied to it thin calcium phosphate coating, using electrochemical method, don't show OI properties. The mentioned calcium phosphate coatings have OC properties and are bound well with surrounding tissues. Only texturated low-porous calcium phosphate coatings have OI properties.

Keywords: experiment, titanium implant, oxidated coatings, calcium phosphate coatings, ectopic osteogenesis, osteoinductive properties, osteoconductive properties, mineral metabolism.

ВВЕДЕНИЕ

Кальцийфосфатная биокерамика нашла широкое распространение в ортопедии и стоматологии благодаря высокой биосовместимости и способности к интеграции с костной тканью [3, 5, 7]. Как правило, ее используют в сочетании с металлической подложкой, на которую она наносится в виде модифицированной поверхности. При этом металл играет роль каркаса, определяющего механические свойства всего имплантата в целом, а кальцийфосфаты обеспечивают его взаимодействие с окружающей тканью [4]. В большинстве случаев толщина биокерамики составляет от 10 до 20 мкм [3]. Однако иногда необходимо создать более объемную структуру, которая имела бы необходимую пористость для

обеспечения остеокондуктивных и остеоиндуктивных свойств [6]. Кроме того, такая биоактивная керамика могла бы осуществить локальную коррекцию нарушений со стороны минерального обмена, наблюдаемого при переломах. Но сложность проблемы заключается в том, что толстый слой кальцийфосфатов обладает низкими адгезивными и механическими свойствами. В результате этого пористая керамика может легко мацерироваться и отделяться от металлической подложки [3, 4]. Для снижения этих негативных процессов нами разработана многослойная поверхность, состоящая из титана и тонкого слоя кальцийфосфатов, нанесенная на металл методом анодно-искрового оксидирова-

ния, и еще одного макропористого композитного слоя стеклокерамики.

Целью данной работы является изучение свойств биоактивных композитных кальций-фосфатных покрытий, нанесенных на титановые

сплавы анодно-искровым методом в растворе фосфорной кислоты и в суспензии кальцийфосфатов (КФ) и в сочетании электрохимического и шликерного методов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве образцов использовались пластины титана ВТ 1-0 и его сплавов ВТ 5-1, ВТ 6 и прутки ВТ 16. Образцы обрабатывались импульсным током со следующими параметрами: частота 0,5 - 10 Гц, длительность импульсов 10 - 200 мс, рабочее напряжение 90-180В в 10% H_3PO_4 с или без добавления суспензии КФ. Время обработки не превышало 8 секунд. В ряде случаев на КФ пленку наносился шликерным методом слой КФ стеклокерамики (КФ и кальцийфосфатное биостекло в соотношении 9:1), толщиной 150-200 мкм. Полученные покрытия исследовались на присутствие фосфора и кальция, определялся привес (Δm , мг/см²) и толщина покрытия (S , мкм). В 0,9% растворе NaCl определялся устанавливающийся в течение 10-15 мин. потенциал коррозии (Ев) оксидированного образца относительно хлорсеребряного электрода сравнения, а также поляризационное сопротивление (R_p , МОм·см²) покрытия при анодном токе 0,5 мкА. Величина K_p является критерием коррозионной стойкости имплантата и коррелирует с характером взаимодействия материала с костной и мягкими тканями [5, 6]. Оба эти параметра являются индикаторами целостности или нарушения покрытия при деформациях. Деформация оксидированных образцов задавалась изгибом по шаблонам с последовательным уменьшением радиуса от ∞ до 20 мм и фиксированием вместе с шаблонами в электрохимической ячейке с 0,9% NaCl. Степень деформации определялась по формуле

$$K_d = \frac{\delta}{2R + \delta} * 100\%,$$

где δ - толщина плоского образца, мм, R - радиус шаблона, мм.

Фазовый состав кальцийфосфатов и солей титана исследовали методом рентгеноструктурного анализа на установке ДРОН-4.

Для каждой степени деформации определялся потенциал коррозии, а затем поляризационный потенциал при токе 0,5 мкА и вычислялось R_p . Исследование образцов на цитотоксичность проводилось по стандартной методике с использованием витальной окраски мононуклеаров периферической крови человека 0,1% раствором трипанового синего [1]. Для изучения влияния биоактивных покрытий на минеральный обмен были проведены опыты на 103 крысах линии Вистар, массой 190-220 г. Группе животных

после дачи эфирного наркоза делали винтообразный оскольчатый перелом бедра с помощью иглы. Затем внутрь бедренного канала вводили через иглу титановые спицы длиной 10 мм и диаметром 1,1 мм. В другой серии опытов дополнительно делали перелом голени в нижней ее трети. Животные распределялись по следующим сериям (по 10 животных в каждой серии): контрольная группа (интактные животные); перелом бедра одинарный; двойной перелом (бедро + голень); перелом одинарный + спица с кальцийфосфатной пленкой (электрохимический способ) + со шликерной (композит) поверхностью; перелом двойной + спица с кальцийфосфатной поверхностью (электрохимический способ) + со шликерной поверхностью; перелом одинарный + спица с кальцийфосфатной поверхностью (электрохимический способ); перелом двойной + спица с кальцийфосфатной поверхностью (электрохимический способ в растворе КФ); перелом одинарный + биоинертная спица (анодно-искровое оксидирование); перелом двойной + биоинертная спица (анодно-искровое оксидирование). В ряде опытов, через 30 суток после перелома, для определения минерализации костной ткани крысам внутривенно вводили изотоп ^{99m}Tc из набора Технефор (НИИ ядерной физики, Томск) в дозе 0,2 мл на животное из расчета 25 мКю на кг массы тела. Учет данных осуществляли с помощью гамма-счетчика Бета-2 на базе НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН. Счетчик автоматически подсчитывал количество импульсов в минуту. Полученные данные обрабатывали с учетом распада контрольного образца через 30, 45, 60 минут и 2 часа после введения изотопа [2]. Остеоиндуктивные (ОИ) и остеокондуктивные (ОК) свойства изучали методом эктопического костеобразования при имплантации титановых дисков с или без кальцийфосфатного покрытия путем введения тестируемого материала под кожу 60 мышам линии СВА, массой 18-21 г [5]. Через 1 месяц диски извлекали, определяли размеры образовавшейся кости (ОИ) или ее проведения (ОК), с последующим проведением гистологических и гистохимических (кислая, щелочная фосфатазы) исследований ее ткани [1]. Полученные результаты обрабатывали методом непараметрической статистики по Вилкоксоу-Уитни-Манну.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За первые 1,5-2 минуты импульсной обработки в среде 1 (40% H_3PO_4) на ВТ 1-0 формируется матовое покрытие светло-серого цвета. При меньшем времени обработки покрытие имеет радужную окраску с различными оттенками. Цветное покрытие (особенно голубое) имеет более высокое поляризационное сопротивление, но малую прочность из-за небольшой толщины (<0,2 мкм), и поэтому не пригодно для использования в ортопедии.

Для получения большей толщины покрытий (>5 мкм) время обработки достигало 6-8 минут. Аналогичный ход формирования АИП наблюдался у исследованных сплавов. На них также через 6 - 8 минут в среде 1 образуется матовое покрытие более темного цвета. При этом каждый сплав имеет свои оптимальные параметры импульсного тока. В среде 2 (10% H_3PO_4 + суспензия кальцийфосфатов) АИП всех сплавов и ВТ 1-0 имеют более светлый (белесый) вид.

Композитное покрытие, состоящее из смеси гидроксидата (80%) и кальцийфосфатного биостекла (20%), наносили на оксидированный в кальцийфосфатной суспензии и 10% H_3PO_4 титан марки ВТ 1-0 с последующим отжигом при 600°C. Размер пор зависел от диаметра используемых частиц кальцийфосфатов и составлял, по данным сканирующей электронной микроскопии, от 100 до 250 мкм.

Наши исследования показали, что образующиеся на титане и его сплавах при электрохимическом оксидировании покрытия являются аморфными. Рентгенограммы металла с покрытием, полученным в средах 1 и 2, содержат только пики подложки. После отжига при 800°C на рентгенограммах появляются как пики TiO_2 в форме рутила и анатаза, так и пики фосфата титана (среда 1) и $CaTi(PO_4)_6$ (среда 2). Более высокий привес в среде 2 позволяет утверждать о содержании в АИП до 30-40% кальций фосфатных соединений. Вероятно, $CaTi(PO_4)_6$ образуется как в процессе анодно-искровой обработки, так и при отжиге в результате взаимодействия захваченного из суспензии кальцийфосфата с TiO_2 .

На примере сплава ВТ 5-1 показано, что удельный привес массы (Δm , мг/см²) покрытия в среде 1 стабилизируется уже через 4 минуты, а в среде 2 достигает максимума за 6-8 минут (рис. 1). При этом Δm в среде 2 за счет захвата кальцийфосфатов в структуру АИП на 50-70% выше, чем в среде 1. АИП других сплавов также подчиняется описанным закономерностям.

Закономерность изменения потенциала коррозии в 0,9 % NaCl от времени импульсной обработки в среде 1 для сплавов ВТ 6 и ВТ 16

показана на рис. 1б. В начальный период обработки измеряемая величина не имеет строго определенной зависимости. Флуктуации потенциала связаны с изменением плотной части оксидного слоя и его диэлектрических свойств. Стабилизация Ек сплавов происходит через 2 минуты и связана с завершением формирования оксидного покрытия.

Хотя зависимости поляризационного сопротивления (R_p) АИП в 0,9 % NaCl от времени импульсной обработки имеют обратный ход, стабилизация их значений в течение 1,5-2 мин. позволяет утверждать, что это время является минимальным для формирования покрытия. Удельный привес АИП в среде 2 выше, чем в среде 1, но диэлектрическая прочность покрытия в среде 1 выше. Электрические свойства (E_k и R_p) покрытий на всех изученных сплавах имеют аналогичную зависимость. По увеличению поляризационного сопротивления сплавы располагаются в ряд ВТ 16 - ВТ 6 - ВТ 1-0 - ВТ 5-1. Первая позиция сплава ВТ 16 объясняется, прежде всего, большой пористостью АИП, обусловленной геометрией образца (диаметр 2 мм). В таблице 1 показан статистический разброс R_p покрытий, сформированных за 8 минут в оптимальных для каждого сплава режимах импульсного тока в средах 1, 2.

Таблица 1.

Поляризационные сопротивления АИП (R_p , МОм см²), нанесенных на титан ВТ 1-0 и сплав ВТ 5-1 при оптимальном импульсном режиме (τ обр. = 8 мин.)

Электролит	№ обр.	Сплав	
		ВТ 1-0	ВТ 5-1
10% H_3PO_4	1	35,8	50,2
	2	37,1	41,0
	3	30,2	45,5
	4	31,0	44,0
10% H_3PO_4 + кальцийфосфаты	1	19,5	42,5
	2	21,5	26,5
	3	20,0	30,5
	4	15,9	29,3

АИП, нанесенное на все указанные сплавы, имеет хорошую адгезию к металлической основе. Изгиб оксидированных образцов (плоских и цилиндрических) по диаметру 10 мм не привел к отслоению или вспучиванию покрытия, но сопровождался образованием трещин. Изгиб по диаметру 20 мм уже не позволяет обнаружить трещины невооруженным глазом. В связи с этим нами изучено влияние степени деформации (Кд, %) на изменение потенциала коррозии и поляризационное сопротивление АИП, исследована зависимость потенциала коррозии оксидированных титана ВТ 1-0 и сплава ВТ 5-1 от степени ступенчатой деформации. При этом приведены начальные (через 5 сек. после очередного уве-

лечения деформации) и установившиеся (через 10-15 мин.) значения Ек. Сдвиг потенциала коррозии в отрицательную сторону после каждого увеличения степени деформации свидетельствует о нарушениях структуры покрытия и частичном снижении пассивности металла. Но через 10-15 минут в результате самопассивации металла за счет воды и запасенного сорбированного кислорода потенциал коррозии восстанавливается. Титан ВТ 1-0 имеет стабильный потенциал коррозии вплоть до деформации 0,36%, а затем резкое снижение после 0,45% и стабилизацию к 0,8%. Сплав ВТ 5-1 на участке снижения потенциала коррозии (при деформациях до 0,7%) имеет несколько осцилляций Ек. После 0,7% деформации изгиба потенциал коррозии стабилизируется. При увеличении деформации потенциалы коррозии ВТ 1-0 при Кд= 1,24% и ВТ 5-1 при Кд=1,95% снижаются на 0,35-0,40 В по сравнению с исходным состоянием, что свидетельствует о возможности увеличения скорости коррозии титановых сплавов при изгибе.

На рис. 1 показана зависимость Rп от степени деформации указанных сплавов, оксидированных как в 10 % H₃PO₄, так и в суспензии. На графике видно, что величина поляризационного сопротивления сразу после деформации на 25-50% ниже установившейся (через 15 минут) величины, что подтверждает хорошую самопассивацию титана и сплавов. Даже начальные (сразу после деформации) значения поляризационного сопротивления указывают на высокую диэлектрическую прочность АИП и сохранение биосовместимости при изгибе оксидированных титановых имплантатов.

При исследовании токсикологических свойств всех типов покрытий было установлено, что они являются нетоксичными (таблица 2). При имплантации их под кожу они не вызывали выраженных воспалительных, аллергических реакций и нагноения. Все кальцийфосфатные соединения, включая и шликерные покрытия, обладают хорошей способностью к сцеплению с окружающими тканями. Установлено, что только композитный тип покрытий обладает как остеоиндуктивными, так и остеокондуктивными свойствами. Биоинертные имплантаты (оксидирование в 10% растворе H₃PO₄, среда 1) не проявляли каких-либо ОК и ОИ характеристик. Кальцийфосфатные покрытия, полученные с помощью электрохимического оксидирования, обнаруживали только остеокондуктивные свойства. Тем не менее, исследования образцов показали, что ОИ- и ОК-подобных покрытий ниже, чем у кальцийфосфатных покрытий с развитой структурой поверхности и калиброванным раз-

мером пор (шликерное покрытие), однако выше, чем у «чистых» оксидных покрытий.

Таблица 2.

Биологические свойства различных типов поверхности на титане марки ВТ1-0, полученные в опыте на животных линии Вистар

Наименование	ОИ	ОК	Воспаление	Сцепление с тканями	Адгезия покрытия	Капсула	Нагноение	Аллергическая реакция
TiO ₂ (контроль)	-	-	-	-	+++	-	-	-
TiO ₂ +КФр+ АИО+600 ⁰ С	-	+	-	+++	+++	-	-	-
TiO ₂ +КФр+ АИО+600 ⁰ С+ шликер	++	+++	-	++	+-	-	-	-

Примечание: - отсутствие, + слабая, ++ средняя, +++ сильная реакция.

В результате проведенных исследований было установлено, что перелом сопровождается усилением минерального обмена в поврежденной конечности. В зависимости от величины травмы количество связанного с костной тканью остеотропного изотопа возрастает. Интересно, что при этом наблюдается включение генерализованного механизма, так как уровень минерализации возрастает не только в зоне перелома, но и на противоположной (неповрежденной) конечности (таблица 3). Использование титановых имплантатов, покрытых методом анодно-искрового оксидированного в электролите с или без гидроксилпатита, не оказывает дополнительного стимулирующего или, напротив, ингибирующего влияния на минеральный обмен в данном эксперименте. Установлено, что только комбинация кальцийфосфатного покрытия со шликерной технологией оказывает достоверное связывание радиоактивного технеция с минеральной частью костного матрикса как в поврежденной, так и здоровой конечностях. Патогенез этого процесса не совсем понятен. Очевидно, что в данном случае имеет место включение дополнительных, резервных механизмов стимуляции минерализации костной ткани. При этом макропористые кальцийфосфатные покрытия, по-видимому, выполняют роль триггера, который переключает работу локальных гомеостатических механизмов костеобразования на системный уровень. Этот феномен чрезвычайно важен, так как открывает дорогу к разработке новых патогенетических методов коррекции нарушений со стороны обмена кальцийфосфатов и может быть использован для нормализации минерального баланса в дефектных костных тканях, например, при лечении остеопороза или переломов.

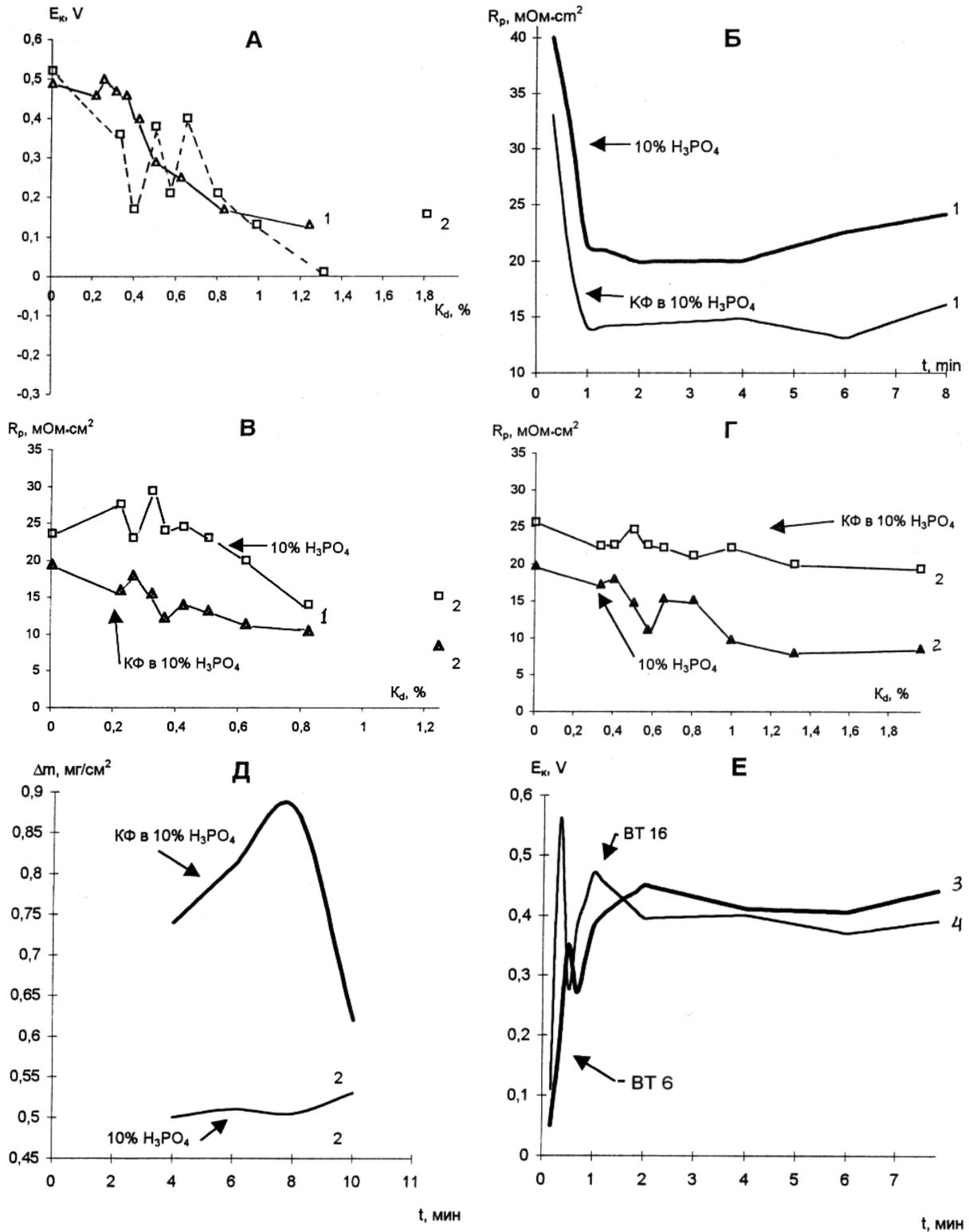


Рис. 1. Зависимость уровня потенциала коррозии в 10% H₃PO₄ (ЕкV) (а); в растворе 0,9 % NaCl (от времени анодно-искровой обработки) (б); в 10% H₃PO₄ с добавлением КФ (в, г, д) поляризационного сопротивления в 10% H₃PO₄ (R_p ,МОМ·см²) (в, г), удельного привеса анодно-искрового покрытия в 10 % H₃PO₄ (Δm , мг/см²) чистого титана марки ВТ 1-0 (1) и сплавов титана ВТ 5-1 (2), ВТ-6 (3) и ВТ 16 (4) (д, е) от величины деформации (K_d ,%).

Таблица 3.

Распределение радиоактивной метки в костной ткани крыс линии Вистар (в %) при моделировании одинарного и двойного перелома с введением в бедренный канал биоинертных, кальцийфосфатных и кальцийфосфатных с шликерным покрытием титановых спиц

№	Название серии эксперимента	Бедро (перелом)	Бедро (голень)	Голень 1	Голень 2
1	Контрольная группа (интактные животные)	100%	100%	100%	100%
2	Перелом бедра одинарный	137,1*	113,5	110,5	108,5
3	Двойной перелом бедра+голень	146,9*	123,6	154,4*	136,2
4	Перелом одинарный+спица с кальцийфосфатной пленкой (электрохимический способ) + шликерной поверхностью	150,2*	145,9*	195,2*	162,9*
5	Перелом двойной+спица с кальцийфосфатной пленкой (электрохимический способ) + шликерной поверхностью	234,2***	176,3***	159,7*	146,3
6	Перелом двойной+спица с кальцийфосфатной поверхностью (электрохимический способ в растворе КФ)	21,53*	118,2	139,2	135,9
7	Перелом одинарный+спица с кальцийфосфатной поверхностью (электрохимический способ)	147,5*	116,6	124,2*	111,0
8	Перелом одинарный + биоинертная спица (анодно-искровое оксидирование)	131,9*	103,7	106,7	104,4
9	Перелом двойной + биоинертная спица (анодно-искровое оксидирование)	136,0*	115,9*	135,0	135,7

Примечание. $P < 0,05$, * - по сравнению с данными у интактных животных, ** - по сравнению с данными у животных с переломом, *** - по сравнению с данными у интактных животных и животных с переломом.

ВЫВОДЫ

1. Оксидные кальцийфосфатные покрытия, нанесенные анодно-искровым (электрохимическим) методом, обладают способностью к "самозалечиванию" дефектов, образующихся при изгибных деформациях до 0,8 %, посредством процесса самопассивации.

2. Кальцийфосфатные материалы, нанесенные электрохимическим методом, целесообразно использовать как подложку для нанесения чисто кальцийфосфатных покрытий с развитой структурой поверхности и калиброванным раз-

мером пор для целенаправленного влияния на минеральный состав кости и ее регенерации.

3. Остеоиндуктивными свойствами обладают покрытия, нанесенные шликерным методом с диаметром пор 100-250 мкм. Они же стимулируют усиление минерализации костной ткани при переломах

4. Кальцийфосфатные материалы, нанесенные анодно-искровым методом, проявляют остеопроводящие свойства и хорошо сцеплены с окружающей тканью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии. -Томск: ТГУ, 1992. - 264 с.
2. Козлов Ю.А., Новицкий ВВ., Байков А.Н. Радионуклиды в медико-биологических исследованиях. - Томск: ТГУ, 1994. - 355 с.
3. Bruijn I.D. Calcium phosphate biomaterials : Bone-bonding and biodegradation properties. -Leiden, 1993.-170 p.
4. De Groot K. Bioceramics consisting of calcium phosphate salts // Biomaterials. -1981. -Vol. 1. - P.47-50.
5. Bioaktiven Schichten auf Titanimplantaten und Biokompatibilitat der Titanlegierung fuer ortopadischen Implantaten / A.V. Karlov, J.R. Kolobov, V.P. Shakhoff, et al. // Biomedizinische Technik. Biomedical Engineering. -1998. - Bd. 43. - S. 408-409.
6. Einfluss der bioaktiven Schichten aus natuerlichen und synthetischen Hydroxyapatit auf Prozesse von Reparation und Induktion der Knochengewebe / A.V. Karlov, V.P. Shakhoff, V.L. Vereshagin, V.P. Ignatov // Biomedizinische Technik. Biomedical Engineering.- 1998. - Bd. 43. - S.380-381.
7. Li P. In vitro and in vivo calcium phosphate induction on gel oxide. - Leiden. -1993. -159 p.

Рукопись поступила 30.08.99.