

© Группа авторов, 2001

Ионная модификация поверхности ортопедических имплантатов в свете профилактики и лечения инфекционных осложнений

А.В. Карлов, И.А. Хлусов, Ю.Р. Колобов, В.А. Понтак, С.Ю. Зинатулина

Ion modification of orthopaedic implants surface for prophylaxis and therapy of infection complications

A.V. Karlov, I.A. Khlusov, Yu.R. Kolobov, V.A. Pontak, S.Yu. Zinatulina

Центр ортопедии и медицинского материаловедения ТНЦ СО РАМН, г. Томск

В системе *in vitro* изучены цитотоксичность, бактерицидность и коррозионное поведение титановых дисков марки VT1-0 с кальций-фосфатным микродуговым покрытием, модифицированным ионной имплантацией серебра либо меди в пределах 5-20 атомных % от состава покрытия. Оптимальным антимикробным эффектом при удовлетворительном токсическом воздействии на клетки периферической крови человека обладали покрытия, несущие в кальций-фосфатном слое примерно 7 атомных % серебра. Концентрации меди до 20 атомных % не подавляли рост стафилококков, не снижали коррозионную стойкость имплантатов, что говорит о возможности увеличения дозы имплантируемых ионов для поиска терапевтического диапазона. Модификация покрытий посредством техники ионной имплантации металлов с антимикробным эффектом целесообразна и может снизить риск возникновения инфекционных осложнений без нарушения интимных процессов остеоинтеграции имплантатов.
Ключевые слова: кальций-фосфатное покрытие, ионная имплантация металлов, бактерицидность, цитотоксичность, коррозия.

Cytotoxicity, bactericidal action and corrosion behavior of titanium VT1-0 disks with microarc calcium-phosphate coating modified by silver or copper ion implantation within 5-20 atomic percents out of the coating compound have been studied *in vitro*. The coatings with approximately 7 atomic percents of silver in their calcium-phosphate layer had an optimum antibacterial (*St. Aureus*, *Clostridium Perfringens*, *E. Coli*) effect and satisfactory cytotoxic action on peripheral blood cells. No copper concentrations up to 20 atomic percents inhibited staphylococci growth, decreased corrosion resistance of the implants, thereby demonstrating the possibility to increase a dose of ions implanted for the purpose of therapeutic range finding. Modification of the coatings using the technique of ionic implantation of metals with antimicrobial properties is expedient and can decrease the risk of development of infection complications without disordering of internal processes of implant osteointegration.

Keywords: calcium-phosphate coating, ionic implantation of metals, bactericidal action, cytotoxicity, corrosion.

ВВЕДЕНИЕ

Инфекционные осложнения, вызванные имплантатами, остаются для травматологии и ортопедии серьезной проблемой, обычно заканчивающейся удалением чужеродного материала [12, 17]. Хорошо известна способность имплантатов потенцировать инфекцию посредством синергичного провоспалительного действия бактериальных тел и чужеродной поверхности имплантируемых устройств на организм хозяина. При этом имплантируемые материалы, в зависимости от их биосовместимости, могут снижать порог дозы, вызывающей инфекционное воспаление [11]. В связи с этим, при высокой клинической эффективности изделий с керамическими покрытиями [6], даже в условиях инфекции стержневого тракта [16], сохраняется возможность контаминации при проведении ортопедических и травматологических опера-

ций. В свете полученных данных формирование антибактериальных свойств покрытий посредством насыщения антибиотиками [11] или импрегнации металлов [2], в частности, ионной имплантации серебра [15], не кажется чрезмерным для снижения риска развития постимплантационных инфекций.

Антимикробное действие металлов, включая серебро и медь, широко известно [2, 18], в том числе в составе покрытий имплантатов [2, 8, 9, 19]. Существуют разнообразные способы нанесения металлов на имплантаты, среди которых наиболее часто используют ионное напыление, гальванические или электрохимические методы. Однако сложность проблемы создания эффективных антимикробных покрытий заключается в том, что граница, лежащая между необходимым уровнем проявления антибактериальной

активности и нежелательными цитотоксическими свойствами металлов, лежит в достаточно узком диапазоне. В данной работе определялось оптимальное соотношение между цитотоксич-

ностью и бактерицидностью кальций-фосфатных покрытий, модифицированных ионной имплантацией серебра либо меди.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые образцы представляли собой титановые диски марки BT1-0 толщиной 0,4 мм и диаметром 12 мм. Поверхность дисков подвергалась механической шлифовке, затем формировалось кальций-фосфатное покрытие (КФП) толщиной порядка 10 мкм методом микродугового разряда в растворе ортофосфорной кислоты, насыщенной мелкодисперсным гидроксипатитом [13]. Ионная имплантация проводилась на вакуумно-дуговом ионном источнике «Диана-2», как описано ранее [14]. В качестве катода применялись серебро либо медь технической чистоты. Двустороннее облучение имплантатов проводилось дозами порядка 10^{16} - 10^{17} ионов/см², позволяющими достичь в поверхностном слое покрытия толщиной 50-100 нм концентрации серебра 5-15 атомных % и меди 5-20 атомных %. Подготовленные диски промывали после имплантации в дистиллированной воде, высушивали и стерилизовали в сухожаровом шкафу при 180° С в течение 1 часа.

Клетки периферической крови человека выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности фиколл-гипак (плотность 1,077 г/мл), дважды отмывали и доводили средой RPMI-1640 с 1% бычьим сывороточным альбумином до концентрации 1×10^6 нуклеаров/мл. Для проведения цитотоксического теста 0,1 мл клеточ-

ной суспензии осторожно наслаивали на центр тестируемого материала, помещали во влажную камеру и оставляли при 37°С на 1 час. В контрольной группе клетки помещали на кальций-фосфатное покрытие без серебра. После чего клетки собирали, смешивали с равным объемом 0,1% раствора трипанового синего и подсчитывали в камере Горяева количество живых (неокрашенных) и убитых (окрашенных) клеток на 100 ядросодержащих клеток.

Бактерицидный тест осуществляли со штаммами St. Aureus, Clostridium Perfringens, E. Coli по стандартной технологии [3] в суточной агаровой культуре с измерением зоны просветления (мм) вокруг дисков, которые наслаивали на питательную среду.

Возможное влияние ионной имплантации на структуру микродугового покрытия исследовали методом сканирующей электронной микроскопии (SEM) на микроскопе JSM-84 при увеличении 5000 раз.

Электропроводность ($1/R_{\text{п}}$) покрытий вычисляли по величине переходного сопротивления ($R_{\text{п}}$, мОмсм²), измеренного в 0,9% NaCl на потенциостате П-5848, как описано ранее [5].

Статистическую обработку данных проводили с использованием U-критерия Вилкоксона-Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сканирующая электронная микроскопия показала, что микродуговое кальций-фосфатное покрытие имеет аморфную пористую структуру с линейным размером пор около 1-5 мкм, не меняющуюся после проведенной имплантации ионов серебра либо меди. В то же время модифицированное серебром КФП проявляет токсические и бактерицидные свойства в зависимости от дозы металла (табл. 1).

Серебро в концентрации 15 атомных % и 10 атомных % вызывало гибель как бактериальных, так и моонуклеарных клеток человека. Концентрация металла 5 атомных % приводила к умеренному цитотоксическому действию на клетки крови человека, но практически не оказывала антимикробного эффекта. Оптимальным ингибирующим влиянием на рост микробов при удовлетворительном цитотоксическом эффекте на клетки крови обладали покрытия, несущие в кальций-фосфатном слое примерно 7 атомных % серебра.

Представленные данные свидетельствуют о

том, что предварительная обработка кальций-фосфатных покрытий серебром целесообразна и может снизить риск возникновения постимплантационных осложнений, связанных с развитием бактериальной инфекции. В то же время следует тщательно подбирать режимы и концентрации металла, имеющего при чрезвычайно малых дозах (порядка 10^{-11} моль/л) как высокую антибактериальную активность [18], так и токсичность. Серебро - высоко опасное вещество, предельно допустимые концентрации которого соответствуют или даже превышают таковые для общепризнанно ядовитых веществ, таких как свинец, кобальт, кадмий, мышьяк [4]. В нашей работе установлено, что интервал оптимальной бактерицидности и цитотоксичности составляет для ионов серебра всего 2-4 атомных %. Естественно, что из многообразия методов формирования антимикробных покрытий [2] требуются точные технологии, такие как ионная имплантация, позволяющая легировать поверхности до заданной концентрации.

Таблица 1.

Цитотоксическое влияние кальций-фосфатных покрытий, содержащих различные концентрации ионов серебра, на мононуклеары периферической крови человека и бактерии *in vitro*, X

Содержание серебра в покрытии (атомных %)	St. Auerus (мм)	Clostridium Perfringens (мм)	E. Coli (мм)	Мертвые клетки (%)	Живые клетки (%)
0	0	0	0	4,3	95,7
5	0,1	0	0,2	8,8	91,2
7	3,2*	3,3*	2,1*	22,4*	77,6*
10	4,4*	4,8*	3,5*	78,0*	22,0*
15	5,5*	6,1*	4,7*	86,0*	14,0*

Примечание: *) – отмечены достоверные отличия ($P < 0,05$) по сравнению с нулевой концентрацией серебра в покрытии.

Таким образом, сохраняется потребность в эффективном и недорогом антимикробном материале, обладающем следующими свойствами [2]: 1) длительно выделять антимикробный агент на терапевтически активном уровне; 2) быть применимым для широкого круга устройств и материалов; 3) обладать приемлемым сроком годности при хранении; 4) проявлять низкую токсичность по отношению к млекопитающим.

С этих позиций следующим тестируемым веществом мы выбрали медь. С одной стороны, ее бактерицидная активность в растворе примерно в 11 раз ниже по сравнению с серебром [18]. Однако, как микроэлемент организма, медь модулирует различные функции клеток и тканей, в частности, стимулирует зависимые металлоферменты, участвует в синтезе гемоглобина и активации гемопоэза, регулирует активность лейкоцитов крови [1, 7, 10, 20]. Другими словами, правильный выбор концентрации меди позволяет решать интегральные задачи, включая прямое (профилактическое и терапевтическое) и опосредованное – через иммунную систему – влияние на инфекционный процесс, регуляцию репарационных процессов.

Результаты показали, что выбранных концентраций ионов меди в КФП недостаточно для проявления бактерицидной активности, поскольку не происходит подавления роста патогенного штамма 209 *Staphylococcus aureus* вокруг исследуемых образцов (рис. 1). Доза стафилококков, достаточная для инфицирования раны, составляет 1×10^6 микробных тел. При этом имплантируемые материалы, в зависимости от их биосовместимости, могут снижать порог дозы, вызывающей инфекционное воспаление, до 10^2 микробов [11]. Тем не менее существует точка зрения, что сильное антимикробное действие металлов, обусловленное высокими дозами, неприемлемо для клиники [9], по-видимому, вследствие существенных побочных эффектов. В таком случае выбранных концентраций меди в КФП может оказаться достаточно для предупреждения размножения патогенной микрофлоры на поверхности имплантатов и

стимуляции защитных сил организма.

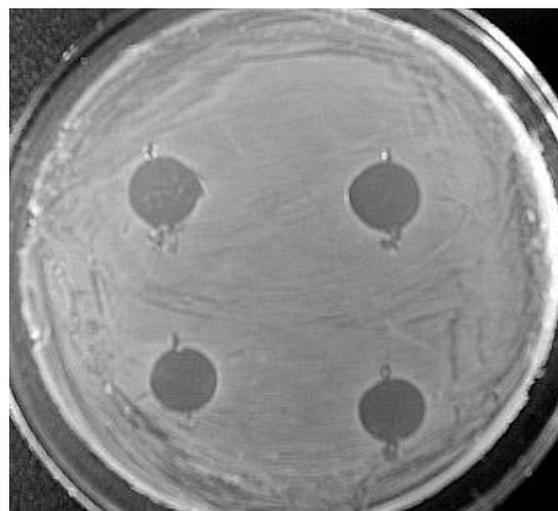


Рис. 1. Агаровая культура *Staphylococcus aureus* после удаления титановых имплантатов с кальций-фосфатным покрытием, легированным медью.

Существует, кроме того, возможность увеличения содержания металлов в покрытии посредством увеличения дозы ионного облучения. Однако возникает угроза усиления электрохимических реакций на границе раздела покрытие-живая ткань, приводящих к остеолиту, а также коррозии, разрушению и расшатыванию имплантата [21]. В наших экспериментах добавление в КФП электропроводящего металла ни в одной из тестируемых концентраций не вызвало заметного падения величины переходного сопротивления (табл. 2) и соответствующего увеличения электропроводности (рис. 2). Более того, при некоторых концентрациях имплантированной меди коррозионная стойкость имплантатов возрастала, что требует дальнейшего изучения. Линии регрессии показывают, что электропроводность КФП, модифицированных ионной имплантацией меди, либо не зависит от тестируемых концентраций металла (до контакта со стафилококком), либо даже несколько уменьшается после контакта с микробом, что можно объяснить диффузией меди в агар.

Зависимость переходного сопротивления от содержания меди в кальций-фосфатном покрытии до и после 24-часового контакта с культурой *Staphylococcus aureus*, X, Pu, n=4

Условия измерения	Содержание меди в кальций-фосфатном покрытии (атомные%)			
	0	5	12,5	20
До контакта с микробом	336,24	406,38* <0,05	397,34* <0,02	346,47
После контакта с микробом	386,03	382,64	353,25	411,47* <0,05

Примечание: *) – отмечены достоверные различия с контролем (0 атомных % меди).

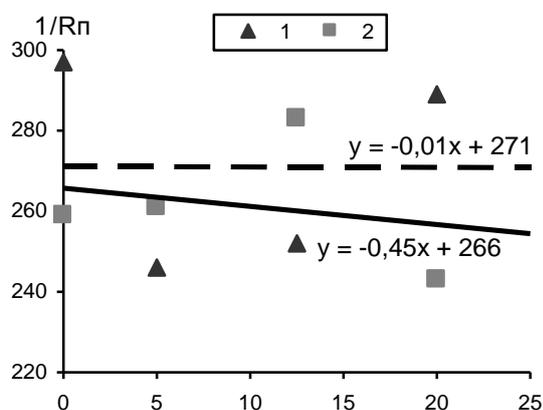


Рис. 2. Зависимость электропроводности кальций-фосфатного покрытия от содержания меди до и после 24-часового контакта с агаровой культурой *Staphylococcus aureus*. По оси абсцисс – содержание меди в покрытии, атомные %; по оси ординат – электропроводность покрытия, (МОмсм²)⁻¹ × 10⁻⁵. 1 - до контакта (пунктирная линия регрессии), 2 – после контакта с микробами (сплошная линия регрессии).

Полученные данные свидетельствуют о необходимости увеличения дозы имплантируемых в КФП ионов меди более 20 атомных % для установления порога оптимального сочетания бактерицидности, токсичности и коррозионной стойкости имплантатов с модифицированной поверхностью.

Итак, модификация КФП посредством техники ионной имплантации металлов с антимикробным эффектом, таких как серебро и медь, целесообразна и может снизить риск возникновения постимплантационных осложнений, связанных с развитием бактериальной инфекции. Некоторые трудности метода можно устранить при уточнении параметров технологического процесса, например, при помощи специальных программируемых систем напыления, учитывающих характер ионного напыления и рельеф поверхности.

ВЫВОДЫ

1. Оптимальным антимикробным эффектом при удовлетворительном цитотоксическом воздействии на клетки периферической крови человека обладают покрытия, несущие в кальций-фосфатном слое примерно 7 атомных % серебра.

2. Концентрации меди до 20 атомных % в кальций-фосфатном покрытии не тормозят рост стафилококков, не снижают коррозионную

стойкость имплантатов, что свидетельствует в пользу увеличения дозы имплантируемых ионов.

3. Модификация покрытий посредством техники ионной имплантации металлов с антимикробным эффектом целесообразна и может снизить риск возникновения инфекционных осложнений без нарушения интимных процессов остеоинтеграции имплантатов.

ЛИТЕРАТУРА

- Агафонников В.Ф., Дамбаев Г.Ц., Романовский М.Н. Автономные электростимуляторы желудочно-кишечного тракта. - Томск, 1999. - 194 с.
- Баррелл Р.Э., Моррис Л.Р. Модифицированный материал, модифицированный антимикробный материал, способ формирования антимикробного покрытия на устройстве и медицинское устройство, которое предполагается использовать в контакте с электролитом на основе спирта или воды, имеющее на своей поверхности антимикробное покрытие: патент RU 213169 от 10.06.1999.
- Джавец Э., Мельник Дж.Л., Эйдельберг Э.А. Руководство по медицинской микробиологии: Пер. с англ. Т. 2. - М.: Медицина, 1982. - 384 с.
- Злобинский Б.М. и др. Воспламеняемость и токсичность металлов и сплавов / Б.М. Злобинский, В.Г. Иоффе, В.Б. Злобинский. - М., 1972. - 264 с.
- 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 и др. // Гений ортопедии. - 1999. - № 4. - С. 28-33.
- Результаты лечения заболеваний и повреждений длинных трубчатых костей при использовании АВФ с биосовместимыми имплантатами / А.В. Карлов, И.В. Сокулов, С.А. Корощенко, И.А. Хлусов // Новые технологии в медицине: Тез. докл. науч.-практ. конф. Курган, 2000. - Часть I. - С. 121-122.
- Машковский М.Д. Лекарственные средства. Т. 2. - М., 1988. - 576 с.
- Исследование антимикробных свойств некоторых металлов и покрытий для медицинских изделий / Ф.Г. Студеникина, М.М. Миронов, В.П. Денисов, Г.М. Покровская // Мед. техника. - 1993. - № 5. - С. 6-8.

9. Суров О.Н. Биоинертный или биоактивный имплантат? // Новое в стоматологии. - 1998. - № 3. - С. 14-18.
10. Хейхоу Ф.Г., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. - М., 1983. - 320 с.
11. Dougherty S.H. Implant infections // Handbook of biomaterials evaluation / Ed. A.F. von Recum.-N.Y., Toronto, London, - P. 276-289.
12. Feng Q.L., Cui F.Z. Ag-incorporated HA coatings with antimicrobial effects and biocompatibility // 6th World Biomaterials Congress: Abstr. - Hawaii, 2000. - P. 1514.
13. The calcium-phosphate coatings applied on titanium by different technology / A.V. Karlov, Yu.R. Kolobov, L.S. Bushnev et al. // Med. Biol. Engin. Comput. - 1999. - Vol. 37. - P. 198-199.
14. Implantation der Ag-ionen in Kalziumphosphatschichten / A.V. Karlov, Ju.R. Kolobov, E.E. Sagymbajew, B.P. Gritzenko // Biomedizinische Technik. - 2000. - Bd. 45. - P. 109-110.
15. Karlov A.V., Shakhov V.P., Kolobov Yu.R. Definition of silver concentration in calcium phosphate coatings on titanium implants ensuring balancing of bactericidity and cytotoxicity // Proceedings of 13th International Symposium on Ceramics in Medicine. - Bologna, 2000. - Vol. 13. - P. 207-210.
16. Hydroxyapatite-coated pins dramatically improve the strength of fixation / A. Moroni, C. Faldini, F. Vannini et al. // Proceedings of 13th International Symposium on Ceramics in Medicine. - Bologna, 2000. - Vol. 13. - P.1037-1042.
17. Nepola J.V. External fixation // Rockwood and Green's fractures in adults. - Lippincot-Raven Publishers, 1996. - Vol. 1. - P. 229-304.
18. The effect of antibacterial agents on the behaviour of mouse fibroblasts in vitro / R. Sheridan, P.J. Doherty, T. Gilchrist, D. Healy // Proceedings of 12th European Conference on Biomaterials. - Porto, 1995. - P. 182.
19. Sparado J.A. Evaluation of several silver composite implant materials // J. Inorg. Biochem. - 1991. - Vol. 42. - P. 294.
20. Copper(II)₂(3,5-diisopropylsalicylate)₄ stimulates hemopoiesis in normal and irradiated mice / L.S.F. Soderberg, J.B. Barnett, M.L. Baker et al. // Exp. Hematol. - 1988. - Vol.16. - P. 577-580.
21. Thull R. Hartstoffbeschichtungen fur Zahnimplantate zur Verhinderung von Reibkorrosion bei Mikrobewegungen // Z. Zahnarztl. Implantol. -1993. - Bd. IX. - P. 275-280.

Рукопись поступила 23.07.01.

Рекламируемые книги предназначены для травматологов-ортопедов, хирургов, преподавателей и студентов медицинских учебных заведений.

Книги высылаются наложенным платежом.

Заказы направлять Таушкановой Лидии Федоровне – главному библиографу-маркетологу ОНМИ Российского научного центра "Восстановительная травматология и ортопедия" им. акад. Г.А. Илизарова, по адресу:

г. Курган, 640014, ул. М. Ульяновой, 6,

Тел. (35222) 30989

E-mail: gip@rncvto.kurgan.ru

Internet: <http://www.ilizarov.ru>