

© А.В. Карлов, И.А. Хлусов, 2002

Влияние продуктов деградации титановых имплантатов с модифицированной поверхностью на активность щелочной и кислой фосфатаз в культуре клеток костного мозга

А.В. Карлов, И.А. Хлусов

Influence of the products of degradation of titanium implants with modified surface on alkaline and acid phosphatase activity in bone marrow cell culture

A.V. Karlov, I.A. Khlosousov

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

В системе *in vitro* исследована ферментативная активность миелокариоцитов крыс в суточной жидкой культуре на пластике после воздействия недельных экстрактов титановых дисков с биоинертным (металлокерамическим) либо биоактивными (кальций-фосфатными) покрытиями. Установлено, что наличие кальций-фосфатного слоя меняет биохимический ответ клеток на продукты длительного физико-химического растворения имплантатов в стерильном физиологическом растворе. Отмечается повышение соотношения щелочной и кислой фосфатаз (индекс фосфатаз) в межклеточной среде по сравнению с биоинертным изделием. Оптимальным эффектом обладали экстракты имплантатов с кальций-фосфатным стеклокерамическим слоем, полученным по шликерной технологии. Представленная модель может использоваться для прогнозирования поведения имплантатов в кости при остеосинтезе.

Ключевые слова: кальций-фосфатные покрытия, экстракты имплантатов, супернатанты, ферменты, *in vitro*

Enzymatic activity of rat myelokaryocytes has been studied *in vitro* in 24-hour liquid culture on plastic material after influence of week extracts from titanium disks with bioinert (metalloceramic) or bioactive (calcium phosphate) coatings. Presence of calcium phosphate layer has been established to change biochemical reply of cells to products of long physicochemical dissolution of implants in sterile saline. Increase in alkaline and acid phosphatase correlation (phosphatase index) in intercellular medium is noted in comparison with bioinert ware. The extracts of implants with calcium phosphate glass-ceramic coating produced by slip manner had an optimal effect. The model presented may be used to predict the implant behavior in bone under osteosynthesis.

Keywords: calcium phosphate coatings, extracts from implants, supernatants, enzymes, *in vitro*

В настоящее время различные биоматериалы (металлы, полимеры, керамика, композиты) находят все более широкое распространение в медицине [12]. В травматологии и ортопедии особое внимание уделяется кальций-фосфатам благодаря их высокой способности к интеграции с костной тканью [7, 13, 20]. При этом отмечается, что при взаимодействии биоматериалов с тканями организма значение их структурных и химических свойств, определяющих процессы биodeградации [2, 3, 14], известно недостаточно [22]. Биodeградацию имплантатов можно моделировать *in vivo* и *in vitro* за счет физико-химического и биохимического растворения материала в агрессивных жидкостях и/или посредством биорезорбции, осуществляемой клеточными системами организма (макрофагами, остеокластами). Однако чувствительность анализов *in vitro* выше, чем *in vivo* [18]. Щелочная и кислая фосфатазы являются важными маркерами процессов, протекающих в костной ткани

[10] и на границе раздела имплантат/кость [17]. Наиболее распространены исследования ферментативной активности клеток при их прямом контакте с искусственными поверхностями [15], моделирующие местные реакции на имплантируемые изделия. Ранее нами была установлена в эксперименте возможность системной минерализации костной ткани в ответ на введение имплантатов с кальций-фосфатными покрытиями [4], опосредованной, по-видимому, усилением химических сигналов и биохимических путей дальноранговой регуляции костеобразования при активном растворении имплантируемых изделий, составляющем основу концепции биоактивности материалов [14]. В связи с этим изучение *in vitro* ферментативного ответа клеток костного мозга на продукты деградации биосовместимых имплантатов с модифицированной поверхностью, активно применяемых в ортопедической практике [5], представляло несомненный интерес.

Эксперименты проводились в осенне-зимний период с использованием биологического материала – 6 крыс-самцов линии Wistar массой 200-300 грамм (виварий НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН). До начала исследования экспериментальных животных выдерживали в течение недели на обычном пищевом рационе. Крыс умерщвляли эфирным наркозом, выделяли костный мозг бедренных костей и культивировали миелокариоциты на пластинке в концентрации 5×10^6 /мл в течение 24 часов при 37°C в жидкой культуральной среде (2 мл) следующего состава: 280 мг/л L-глутамина (Sigma), 80 мг/л гентамицина сульфат, 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ICN), 95% RPMI-1640 (Sigma).

Тестируемые имплантаты (по 3 изделия на группу) формировали, как описано ранее [4], из титановых дисков марки BT-6 диаметром 12 мм и толщиной 0,5 мм с нанесением следующих типов двусторонних покрытий: биоинертное (металлокерамическое) покрытие (МК), нанесенное анодно-искровым способом в 10% растворе фосфорной кислоты; биоактивное, кальций-фосфатное плотное (КФП) покрытие, нанесенное микродуговым способом в растворе 10% фосфорной кислоты и гидроксилapatита (толщина 10-20 мкм); биоактивное, кальций-фосфатное стеклокерамическое (КФС) покрытие, нанесенное по шликерной технологии и

отожженное при 600° С (толщина 150-200 мкм).

Экстракты имплантатов (общая площадь 2-х поверхностей каждого диска 226 мм²) получали согласно требованиям ISO 10993-5 (1992 г.) в условиях их длительного культивирования в 4 мл 0,9% стерильного раствора хлорида натрия при 37°C. Половину растворов забирали на 1, 2, 3, 4 и 7-ю недели экстрагирования с последующим добавлением свежего растворителя в объеме 2 мл, разливали по 1 мл в пластиковые контейнеры и хранили при -16°C.

Экстракты тестировали в краткосрочной культуре миелокариоцитов на пластинке в количестве ¼ (0,5 мл) от общего объема клеточной взвеси. Через 24 часа собирали кондиционные среды (супернатанты) путем центрифугирования взвеси неприлипающих клеток при 500 G в течение 10 мин. В надосадочной жидкости определяли активности щелочной (Alkaline Phosphatase, ALP) и кислой (Acid Phosphatase, ACP) фосфатаз с помощью стандартных наборов “новофосфал” и “фосфацид-ново” фирмы “ВЕКТОР-БЭСТ” (г. Новосибирск) при фотометрии на длине волны 400-420 нм.

Статистическую обработку результатов проводили согласно непараметрическим U-критерию Вилкоксона-Манна-Уитни (P_U) и T-критерию Вилкоксона (P_T).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Модификация поверхности титановых имплантатов посредством нанесения биоактивных (кальций-фосфатных) или биоинертных покрытий призвана улучшать биосовместимость имплантатов, в том числе [2, 23]: 1) предотвратить либо уменьшить выход металла и примесей из титана и его сплавов в ткани, т.е. улучшить коррозионную стойкость изделия; 2) предотвратить протекание электрохимических реакций на границе имплантат/ткань, ухудшающих его интеграцию (концепция биоинертности); 3) способствовать взаимодействию имплантата с живой тканью за счет стимуляции биохимических (биологических) процессов (концепция биоактивности).

Кислая фосфатаза – лизосомальный фермент – в костной ткани считается маркером главным образом остеокластов, обладает как гидролитической функцией (отщепление фосфатного радикала от молекулы эфиров фосфорной кислоты), так и трансферазной (перенос свободного фосфатного радикала на акцептор) с оптимумом pH от 3,5 до 5,5 [8,10]. Большинство ядродержащих клеток костного мозга, включая остеобласты, демонстрируют определенную положительную реакцию на фермент [11]. ACP участвует в резорбции минерального матрикса кости, ее активность регулируется

уровнем кальция в среде по типу отрицательной обратной связи [10]. Кроме того, различные концентрации титана способны стимулировать кислую фосфатазу [16].

Выполненные эксперименты показали (табл. 1), что экстракты МК покрытия на титане значительно (практически в 3 раза) повышают активность ACP к 7-й неделе наблюдения, что может быть обусловлено “старением” (деградацией) имплантатов в растворителе, приводящим к постепенному выходу титана в раствор. Экстракты титановых имплантатов с кальций-фосфатными покрытиями достоверно ($P_U < 0,05$) снижали активность фермента в межклеточной среде в различные сроки экстракции. Более того, для КФС и КФП покрытий показатель оказался сниженным ($P_T < 0,05$) в течение всего периода наблюдений (табл. 1).

С одной стороны, это может свидетельствовать об уменьшении миграции титана и элементов сплава в раствор, обусловленном защитным кальций-фосфатным слоем (концепция биоинертности). Ионы металлов и растворы сплавов способны ингибировать биохимическую (щелочная фосфатаза) и функциональную активность культивируемых остеогенных клеток, оказывать цитоток-

сическое действие [19]. С другой стороны, падение активности АСР может быть связано с растворением кальций-фосфатного покрытия, выделением свободных ионов кальция [14], повышающих рН среды [21]. В свою очередь, это является одним из механизмов активации другого фермента – щелочной фосфатазы.

Выделяют пять тканеспецифических изоферментов ALP (костный, печеночный, плацентарный, кишечный, почечный), катализирующих гидролиз эфиров фосфорной кислоты при рН=9,0-10,0 [8]. Костный изофермент является маркером остеобластов, может отрываться от клеточной поверхности и связывать Ca^{2+} [10]. В костном мозге сильная активность фермента также отмечена в стромальных клетках, включая остеобласты. Молодые гранулоцитарные клетки, эритробласты, мегакариоциты, лимфоциты и моноциты дают отрицательную реакцию [11].

В наших экспериментах на культуре костного мозга активность ALP в межклеточной среде возрастала в следующем ряду: МК покрытие (средняя скорость прироста недельной активности 2,5 Е/л) < КФС покрытие (8,1) < КФП покрытие (18). Возрастание толщины кальций-фосфатного слоя вызывало и повышение активности фермента (в 1,5-2,5 раза) с достижением

статистических различий с металлокерамикой к 3-й и 7-й неделям исследования (табл. 2).

Точно неизвестно, как ALP вовлекается в процесс минерализации костного матрикса. Считается, что фермент обеспечивает дефосфорилирование фосфопротеинов, гексозофосфатов, глицерофосфатов. Это вызывает локальное увеличение фосфатных ионов, они взаимодействуют с Ca^{2+} и образуют кальций-фосфатные соединения. КФ выпадают в осадок и преобразуются в кристаллы апатитов, в результате чего происходит минерализация органического матрикса [1, 10].

Соотношение активностей щелочной и кислой фосфатаз (индекс фосфатаз, ИФ) может служить маркером активности процессов остеогенеза и резорбции кости [9]. В исследованиях *in vitro* он может быть прогностическим фактором поведения имплантата в кости (фиксация/расшатывание). Наши эксперименты показали, что ИФ в культуре костного мозга после добавления недельных экстрактов от различных типов имплантатов постепенно снижается (табл. 3). Тем не менее КФС покрытие, в отличие от КФП слоя, достоверно ($P_T < 0,05$) тормозит данный процесс по сравнению с биоинертными имплантатами на протяжении всего периода наблюдений.

Таблица 1.

Активность кислой фосфатазы в супернатантах клеток костного мозга при добавлении недельных экстрактов имплантатов с различными типами покрытий, X

Покрытие на имплантатах	Активность кислой фосфатазы, Е/л					
	1 неделя	2 неделя	3 неделя	4 неделя	7 неделя	P _T
Кальций-фосфатное, стеклокерамическое	0,183* n=6	0,214 n=6	0,305 n=5	0,396 n=6	1,006* n=6	<0,05
Кальций-фосфатное, плотное	0,305 n=5	0,183 n=6	0,336 n=6	0,426 n=6	1,280 n=6	<0,05
Металлокерамическое	0,487 n=6	0,396 n=6	0,366 n=6	0,427 n=6	1,402 n=6	

Примечание: здесь и в табл. 2-3:

*) – достоверные ($P_U < 0,05$) различия с металлокерамикой согласно U- критерию Вилкоксона-Манна-Уитни; P_T – достоверные различия с металлокерамикой согласно T-критерию Вилкоксона.

Таблица 2.

Активность щелочной фосфатазы в супернатантах клеток костного мозга при добавлении недельных экстрактов имплантатов с различными типами покрытий, X, P_U

Покрытие на имплантатах	Активность щелочной фосфатазы, Е/л				
	1 неделя	2 неделя	3 неделя	4 неделя	7 неделя
Кальций-фосфатное, стеклокерамическое	96,87 n=6	92,03 n=6	106,55* n=5	60,54 n=6	152,57* n=6
Кальций-фосфатное, плотное	38,75* n=5	46,01* n=6	48,43 n=6	82,34 n=6	111,40 n=6
Металлокерамическое	77,48 n=6	101,71 n=6	42,02 n=6	62,96 n=6	111,39 n=6

Таблица 3.

Динамика индекса фосфатаз в супернатантах клеток костного мозга при добавлении недельных экстрактов имплантатов с различными типами покрытий, X, P_T

Покрытие на имплантатах	Индекс фосфатаз					
	1 неделя	2 неделя	3 неделя	4 неделя	7 неделя	P _T
Кальций-фосфатное, стеклокерамическое	529,34	430,05	349,34	152,88	151,66	<0,05
Кальций-фосфатное, плотное	127,05	251,42	144,14	192,83	87,03	
Металлокерамическое	159,10	256,84	114,81	147,45	79,45	

Данные модельного эксперимента говорят о преимуществах изделий с кальций-фосфатными покрытиями за счет позитивного влияния продуктов их деградации на ферментативные процессы, протекающие на границе раздела имплантат/костная ткань. По-видимому, оптимизация ферментативной реакции клеток на искусственный материал (локальный эффект) является одним из маркеров и, одновременно, одним из механизмов прочной и долговременной фиксации биоактивных имплантатов в костной тка-

ни по сравнению с биоинертными изделиями, отмеченной ранее *in vivo* [3, 6]. С другой стороны, усиление межклеточных биохимических сигналов может выполнять триггерную роль при системной минерализации костной ткани, зафиксированной в случае применения штифтов с кальций-фосфатным покрытием, выполненным по шликерному методу [4]. Данный феномен делает кальций-фосфатные технологии нанесения покрытий весьма перспективными в условиях проведения остеосинтеза при остеопорозе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Быков В.Л. Цитология и общая гистология (функциональная морфология клеток и тканей человека). - СПб., 1998. - 520 с.
2. Дубок В.А. Биокерамика – вчера, сегодня, завтра // Порошковая металлургия. - 2000. - № 7/8. - С. 69-86.
3. Калита В.И. Физика и химия формирования биоинертных и биоактивных поверхностей на имплантатах. Обзор // Физика и химия обработки материалов. - 2000. - № 5. - С. 28-45.
4. 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.
5. 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 // Тезисы докладов научно-практической конференции с международ. участием "Новые технологии в медицине", Курган, 19-21 сентября 2000. - Курган, 2000. - Ч.1. - С.121-122.
6. Карлов А.В., Хлусов И.А., Хохлов А.В. Биомеханическое поведение в кости титановых имплантатов с модифицированной поверхностью // Гений ортопедии. - 2001. - № 3. - С. 57-63.
7. Карлов А.В., Шахов В.П. Системы внешней фиксации и регуляторные механизмы оптимальной биомеханики. - Томск, 2001. - 480 с.
8. Лившиц В.М., Сидельников В.И. Биохимические анализы в клинике: Справочник. - М., 1998. - 303 с.
9. Состояние минерального обмена и костной регенерации в условиях гипербарической оксигенации при удлинении конечностей / А.В. Попков, Н.В. Сафонова, Л.С. Кузнецова, Д.А. Попков // Гений ортопедии. - 2001. - № 4. - С. 53-55.
10. Риггз Б.Л., Мелтон III Л.Дж. Остеопороз / Пер. с англ. - М.-СПб., 2000. - 560 с.
11. Хейхоу Ф.Г. Дж., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. - М., 1983. - 320 с.
12. Agrawal C.M. Reconstructing the human body using biomaterials // JOM: J. Miner., Metals and Mater. Soc. - 1998. - Vol. 50, N 1. - P. 31-35.
13. An introduction to bioceramics / Ed. by L.L. Hench, J.Wilson. - Singapore et al., 1993. - 386 p.
14. Daculsi G. New technology for calcium phosphate bioactive ceramics in bone repair // Proc. EMBEC'99, Vienna, Austria, 4 - 7th November 1999. - Vienna, 1999. - Vol. 37, Part II. - P. 1598 - 1599.
15. Adult human bone cells from jaw bones cultured on plasma-sprayed or polished surfaces of titanium or hydroxylapatite discs / D. De Santis, C. Guerriero, P.F. Nocini et al. // J. mater. Sci. Mater. Med. - 1996. - Vol.7, № 1. - P. 21-28.
16. Elagli K., Vernon C., Hildebrand H.F. Titanium-induced enzyme activation on murine peritoneal macrophages in primary culture // Biomaterials. - 1995. - Vol.16. - P.1345-1351.
17. Handbook of biomaterials evaluation / Ed. A.F. von Recum. - N.Y., Toronto, London, 1986. - 611 p.
18. Biocompatibility test procedures for materials evaluation in vitro. II. Objective methods of toxicity assessment / H.J. Johnson, S.J. Northup, P.A. Seagraves et al. // J. Biomed. Mater. Res. - 1985. - Vol.19. - P. 489-508.
19. In vivo biomineralization by osteoblastlike cells. I. Retardation of tissue mineralization by metal salts / S. Morais, J.P. Sousa, M.H. Fernandes, G.S. Carvalho // Biomaterials. - 1998. - Vol.19. - P.13-21.
20. Enhanced fixation with hydroxyapatite coated pins / A. Moroni, P. Aspenberg, S. Toksvig-Larsen et al // Clin. Orthop. - 1998. - N 346. - P.171-177.
21. Solubility behaviour of synthetic hydroxyapatites in aqueous solution: influence of amorphous constituents on pH value / U. Saalfeld, N.M. Meenen, T.T. Jures, H. Saalfeld // Biomaterials. - 1994. - Vol.15. - P.905-908.
22. Structure of the interface between rabbit cortical bone and implants of gold, zirconium and titanium / P. Thomsen, C. Larsson, L.E. Ericson et al // J. Mater. Sci. Mater. Med. - 1997. - Vol. 8, N 11. - P. 653-665.
23. Thull R. Hartstoffbeschichtungen für Zahnimplantate zur Verhinderung von Reibkorrosion bei Mikrobewegungen // Z. Zahnärztl. Implantol. - 1993. - Bd. IX. - S. 275-280.

Рукопись поступила 12.07.02.