

Фотоспектрметричне дослідження структури поверхневого шару матеріалів АСЗ-5 та FAR 5 після витримки *in vivo*

В.М. Шимон, С.П. Алфелдїй, В.В. Стойка, А.А. Шерегїй, М.В. Шимон
Kafravm@rambler.ru

Ужгородський національний університет, медичний факультет, кафедра загальної хірургії з курсами травматології, оперативної хірургії та судової медицини, Ужгород

Реферат

Вступ. Механізм скріплення кісткової тканини з матеріалом аналогічний механізму природного ремоделювання кістки. Після імплантації біоактивних матеріалів жива кістка формує міцний фізико-хімічний зв'язок з імплантатом, який повинен характеризуватися значною стабільністю проти хімічного і біологічного руйнування під дією рідкого середовища людського організму, оскільки призначений для постійного знаходження у середині людського тіла.

Мета дослідження: на основі експериментальних і теоретичних досліджень електронної будови апатитів природного походження встановити механізм взаємодії АСЗ-3 та FAR 5 з органічним матриксом нативної кістки і зародкоутворення апатиту *in vivo*.

Матеріали та методи. Хімічний склад поверхневих шарів та їх структуру визначали кількісним методом електронного зондового мікроаналізу на скануючому електронному мікроскопі РЕМ Tescan Mira 3LMU з використанням енергодисперсійного спектрометру Oxford X-max 80mm.

Результати досліджень та їх обговорення. Результати дослідження поперечного перерізу склокристалічного матеріалу FAR 5, який було імплантовано в кісткову тканину, дозволили встановити таке: після 14 та 28 витримки *in vivo* в умовах статичних та динамічних навантажень імплантат щільно прилягає до кісткової тканини, що свідчить про цілісність формування зв'язку імплантат – кісткова тканина. Структура імплантату після динамічних навантажень не втрачає міцності: не містить тріщин і зломів та наявності дебрису. Це вказує на відповідність пружних та механічних властивостей до таких як у кісткової тканини.

При поперечному перерізі зразку АСЗ-5, який імплантовано у кісткову тканину, через 14 діб *in vivo* спостерігається його міцна фіксація у зоні контакту. Після 28 діб *in vivo* зразок АСЗ-5 характеризується незначними зламами поверхні, що свідчить про його крихкість. Це може обумовити складність вилучення імплантату при повторних операціях. Однак завдяки тому, що даний зразок характеризується здатністю до прискореного формування апатитоподібного шару впродовж одного місяця, процес мінералізації даного імплантату дозволить забезпечити його міцність впродовж експлуатації.

Висновки. Встановлено, що природні апатити характеризуються наявністю великої кількості дефектів у їх структурі. Мінералізація нанодисперсних кристалів кістки у відсутності умов формування апатиту з перебігом тривалого часу супроводжується деградацією кісткового мінералу.

Встановлені умови осадження кристалічних фаз АМФ та ОГА як прекурсорів для формування апатитового шару ГАП на поверхні імплантату *in vivo*, що є запорукою успішної адаптації імплантату в середовищі організму.

Ключові слова: кісткова тканина, біоскло, природні апатити.

Photo-spectrometric study of the structure of the surface layer of ASZ-5 and FAR 5 materials after *in vivo* exposure

V. Shymon, S. Alfeldii, V. Stoika, A. Sheregii, M. Shymon

Uzhhorod National University, Higher Educational Institution, Faculty of Medicine, Department of General Surgery with courses in traumatology, surgery and forensic medicine, Uzhhorod

Abstract

The mechanism of attachment of bone tissue to the material is similar to the mechanism of natural bone remodeling. After implantation of bioactive materials, living bone forms a strong physico-chemical bond with the implant, which should be characterized by considerable stability against chemical and biological destruction under the action of the liquid environment of the human body, since it is intended for permanent residence within the human body.

Objective. Based on experimental and theoretical studies of the electronic structure of natural apatites to establish the mechanism of interaction of ASZ-3 and FAR 5 with the organic matrix of native bone and germination of apatite *in vivo*.

Materials and methods of study. The chemical composition of the surface layers and their structure was determined by quantitative electron probe microanalysis on a Tescan Mira 3LMU SEM using an Oxford X-max 80mm energy dispersion spectrometer.

Research results. The results of a cross-sectional study of a fiberglass material FAR 5 implanted in bone tissue allowed us to establish the following: after 14 and 28 *in vivo* exposure under static and dynamic loads, the implant is tightly attached to the bone tissue, which indicates the integrity of the bond-forming integrity. bone tissue. The struc-

ture of the implant after dynamic loading does not lose strength: it does not contain fracture fracture and the presence of debris. This indicates that elastic and mechanical properties are consistent with those of bone tissue.

A cross section of the ASZ-5 sample implanted into the bone tissue after 14 days in vivo shows its firm fixation in the contact area. After 28 days in vivo, the ASZ-5 sample is characterized by slight fractures of the surface, indicating its fragility. This can make it difficult to remove the implant during repeated operations. However, due to the fact that this specimen is characterized by the ability to accelerate the formation of the apatite layer within one month, the process of mineralization of the implant will allow to ensure its durability during operation.

Conclusions. It is established that natural apatites are characterized by a large number of defects in their structure. The mineralization of nanodispersed bone crystals in the absence of conditions of apatite formation over a long time is accompanied by bone mineral degradation.

The conditions of deposition of crystalline phases of AMP and YEA as precursors for the formation of the apatite layer of GAP on the surface of the implant in vivo have been established, which is the key to successful adaptation of the implant in the environment of the body.

Key words: bone tissue, bioglass, natural apatites.

Вступ. Механізм скріплення кісткової тканини з матеріалом аналогічний механізму природного ремоделювання кістки [1]. На початковому етапі відбувається резорбція матеріалу, що здійснюють остеокласти, яка може продовжуватися у дорослої людини до 6 тижнів. Далі настає фаза реверсії, яка характеризується переходом від процесів резорбції до формування кісткової тканини за рахунок сполучення діяльності остеокластів. Фаза формування остеогенезу починається з локальної диференціації преостеобластів в остеобласти і їх міграція у ділянку резорбційної лагуни. Преостеобласти розташовуються в надкісничі, тому імплантатний матеріал прагнуть вкрити надкісницею. Прикріплення клітки остеобласта здійснюється рецепторами білкових молекул клітинної мембрани [2].

Після імплантації біоактивних матеріалів жива кістка формує міцний фізико-хімічний зв'язок з імплантатом, який повинен характеризуватися значною стабільністю проти хімічного і біологічного руйнування під дією рідкого середовища людського організму, оскільки призначений для постійного знаходження усередині людського тіла [3].

Паралельно з фізико-хімічними процесами, які можна спостерігати в експериментах “*in vitro*”, у живому організмі на поверхні біоматеріалу проходять біохімічні процеси за участі органічних сполук та живих клітин. У присутності макрофагів завдяки захопленню ними окремих елементів імплантату координуючий вплив фізіологічного середовища на поверхню біоматеріалу посилюється. Колагенові волокна беруть участь у процесі утворення апатито-подібного шару, структурно інтегруючи з апатитовими агрегатами. При цьому зона, що виникає, збагачена органічними сполуками, протягом часу мінералізується і становить основу нової зростаючої кістки [4].

Завдяки високій синтетичній і секреторній активності остеобластів лакуна поступово заповнюється органічною міжклітинною речовиною і надалі починається мінералізація, середня тривалість процесу всього 20 тижнів. Згодом активні остеобласти втрачають здатність до сек-

реції і мінералізації кісткового матриксу і перетворюються на неактивні остеобласти [5].

У роботі Lin D. J. 2016 р. вказано, що завдяки підвищенню концентрації кальцію і супутнім чинникам у довкіллі «запускається» процес появи навколо імплантату кристалів гідроксиапатиту (остеоіндукція). Поява нової кісткової тканини, як і її розростання (остеоіндукція), на поверхні імплантата виявляється можливою, коли забезпечується велика площа поверхні контакту біологічних рідин і імплантату, тобто при достатній пористості останньої [6].

Матеріал повинен мати розмір пор, близький до розміру остеонів – структурно-функціональних одиниць природної кістки [7]. При розмірах пор менше 80 мкм остеоіндуктивні властивості не виявляються, а при розмірах більше 300 мкм остеоіндуктивні властивості помітно погіршуються. Це має велике значення для імплантатів, які виконують функцію заміни кістки, з метою забезпечення швидкого і міцного зв'язку з живою кісткою.

Наявність такої складноорганізованої структури слід враховувати при розробці біоматеріалів, які повинні позитивно впливати на всі рівні організації кісткової тканини, починаючи від мінеральної складової, біополімерів, білків і закінчуючи остеогенними клітинами. Такий підхід є більш раціональним, оскільки спрямований на створення єдиної функціональної системи імплантат – кістка [8].

Мета дослідження: на основі експериментальних і теоретичних досліджень електронної будови апатитів природного походження встановити механізм взаємодії AC3-3 та FAR 5 з органічним матриксом нативної кістки і зародкоутворення апатиту *in vivo*.

Матеріали та методи. Дослідження на тваринах. Експерименти виконано з дотриманням вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) [9] та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ст. 26, 31) [10] і схвалено позитивним рішенням комітету з біоетики при ДУ «ІПХС ім. проф. М.І. Ситенка НАМН» (протокол № 184 від 10.09.2018).

Дослідження проведено на 28 білих лабораторних щурах-самцях (на початок експерименту вік 4 міс., маса тіла 200–260 г), яких утримували на стандартному раціоні харчування та споживання води в умовах експериментально-біологічної клініки ДУ «ПХС ім. проф. М.І. Ситенка НАМН».

Хірургічні втручання виконано в умовах асептики й антисептики під загальним знеболюванням (кетамін, 50 мг/кг живої маси, внутрішньом'язово). Після вистриження шерсті на лівому коліні й оброблення ділянки антисептиком Бетадин® передньолатеральним доступом відкривали ділянку дистального метафіза стегнової кістки та за допомогою стоматологічного бора моделювали дірчастий дефект, розміри якого відповідали розмірам імплантата, — діаметром 1 мм, глибиною 3 мм. Циліндричні зразки зі СКМ розміщували в ділянці дефекту з використанням press-fit техніки. Після місцевої обробки антибіотиком пошарово зашивали м'язи та шкірну рану, ділянку хірургічного втручання обробляли антисептиком. Через 7, 14, 28 і 90 діб після операції по 7 тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під ефірним наркозом.

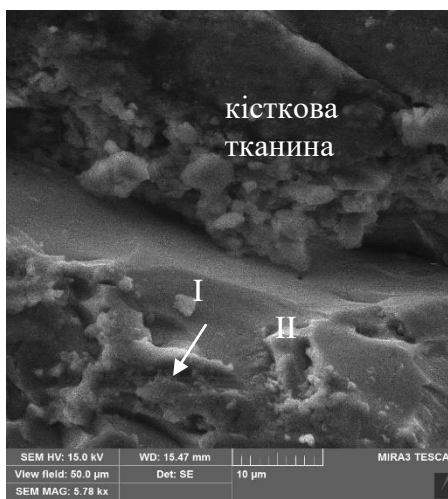
Фотоспектрометричний аналіз. Хімічний склад поверхневих шарів та їх структуру визначали кількісним методом електронного зондового мікроаналізу на скануючому електронному мікроскопі РЕМ Tescan Mira 3LMU з використанням енергодисперсійного спектрометру Oxford X-max 80 mm.

Результати досліджень та їх обговорення. Після 14 діб імплантації FAR 5 представляє собою багатофазну систему, яка складається з окремих сферичних та пластинчастих кристалів розміром від 0,5 до 5 мкм (рис. 1 а I), та їх скупчень близько 10 мкм, які формують єдиний кристалічний блок. Наявність значної кількості сферолітів є свідченням утворення аморфного фосфату кальцію (рис. 2 а II), який є попередниками формування нативної кістки.

Для АСЗ-5 неоднорідності представлені сферолітами, які формують гребні та сколи (рис. 1 б I). Даний процес супроводжується фазовим перебудуванням АФК, із наступним вирівнюванням поверхні та формуванням пошарової структури матеріалу з наявністю пластинчастих кристалів ГАП (рис. 1 б II).



а



б



в

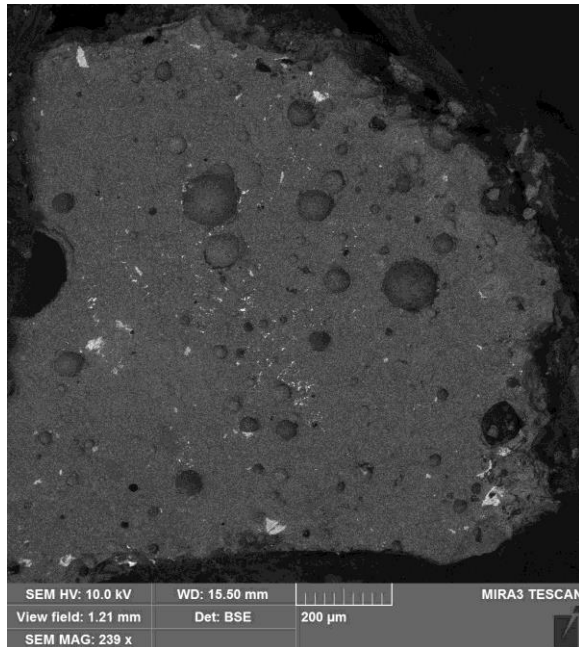


г

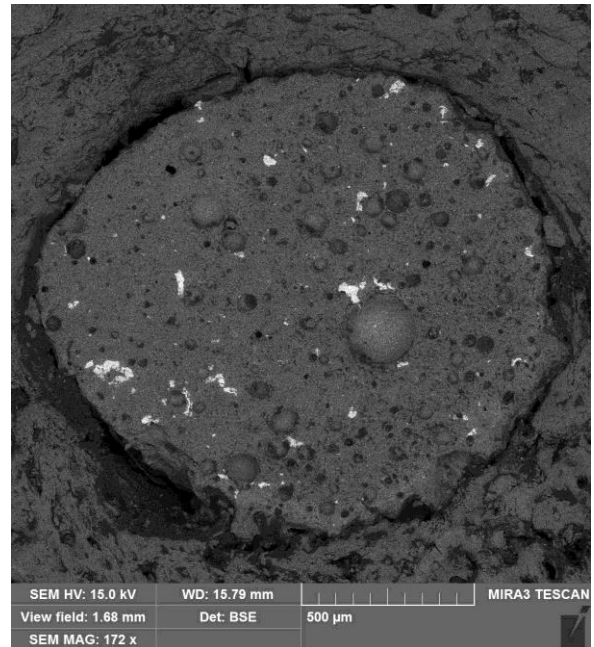
Рис. 1. Структура поверхні біоактивних ситалів FAR 5(а), АСЗ-5 (б) після 14 діб витримки та після 28 діб витримки FAR 5(в), АСЗ-5 (г).

Після 28 днів імплантації у структурі СКМ FAR 5 та АСЗ-5 імплантату спостерігається формування агрегатів гідроксиапатиту (рис. 1 в, г I), які є подібними до кристалів для зрілої пластинчастої кістки (рис. 1 в, г II). На межі імплантат-кістка спостерігається формування пе-

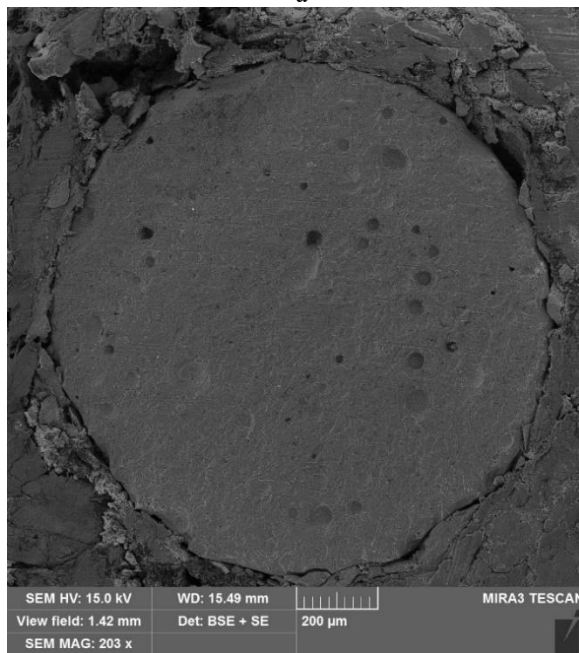
рехідного шару, який вміщує подібно до матеріалу імплантату кристали пластинчасті структури карбонатгідроксиапатиту (КГАП). Це пов'язано з інкорпорацією карбонатних іонів у решітку апатиту, що впливає на процес мінералізації.



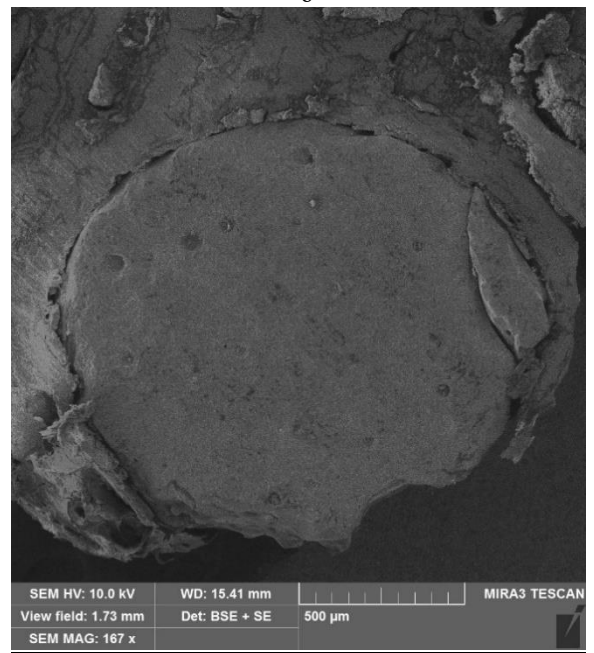
а



б



в



г

Рис. 2. Поперечний переріз розроблених склокристалічних матеріалів, які імплантовано в кісткову тканину після 14 та 28 днів витримки *in vivo*: FAR 5 (а,б); АСЗ-5 (в, г).

Інтенсифікація зародкоутворення для СКМ АСЗ-5 дозволяє вже на їх поверхні на 28 добу *in vivo* сформувати КГАП, який представляє собою кристали гексагональної сингонії призматичних до голковидних, зібраних у агрегати (рис. 1 в, г I). Кристали карбонатгідроксиапатиту присутні

у формі пластин розміром $50 \times 20 \div 25 \times 2 \div 5$ нм, які орієнтовані певним чином по відношенню до осі колагенових волокон.

При застосуванні розроблених матеріалів як імплантів регенерація має більш сприятливий перебіг, про що свідчить відновлення структури

кістки на 28 добу спостереження, коли частину регенерату ($50\div 70\%$) у дефекті представлено зрілою пластинчастою кісткою.

Результати дослідження поперечного перерізу склокристалічного матеріалу (СКМ) FAR 5 (далі імплантату), який було імплантовано в кісткову тканину, дозволили встановити таке: після 14 та 28 витримки *in vivo* в умовах статичних та динамічних навантажень імплантат щільно прилягає до кісткової тканини, що свідчить про цілісність формування зв'язку імплантат-кісткова тканина. Структура імплантату після динамічних навантажень не втрачає міцності: не містить тріщин, зломів та наявності дебрису. Це вказує на відповідність пружних та механічних властивостей до таких як у кісткової тканини. Це є важливим фактором при формуванні єдиної конструкції в системі імплантат-кісткова тканина та дозволить тривалий час успішно експлуатувати імплантат при змінних навантаженнях на кісткову тканину.

При поперечному перерізі зразку СКМ АС3-5, який імплантовано у кісткову тканину через 14 діб *in vivo* спостерігається його міцна фікса-

ція у зоні контакту (рис. 2 а, б II). Після 28 діб *in vivo* зразок СКМ АС3-5 характеризується незначними зламами поверхні (рис. 2 а, б II), що свідчить про його крихкість. Це може обумовити складність вилучення імплантату при повторних операціях. Однак завдяки тому, що даний зразок характеризується здатністю до прискореного формування апатитоподібного шару впродовж одного місяця, процес мінералізації даного імплантату дозволить забезпечити його міцність впродовж експлуатації.

При поперечному перерізі зразків вглиб ≈ 200 мкм спостерігається скупчення напівсфер розміром (рис. 3 а, б, в, г I) та зерен кристалів КГАП (рис. 3 а, б, в, г II), як після 14, так і після 28 діб їх витримки *in vivo*. Однак інтенсивність механізму та зародкоутворення кристалів є відмінними для дослідних зразків. Структури поверхні СКМ FAR 5 при поперечному перерізі характеризуються незначною кількістю зародків та кристалів КГАП, яка збільшується на 28 добу (рис. 3 а, б). Для СКМ АС3-5 спостерігається значна наявність як сферичних неоднорідностей, так і КГАП.

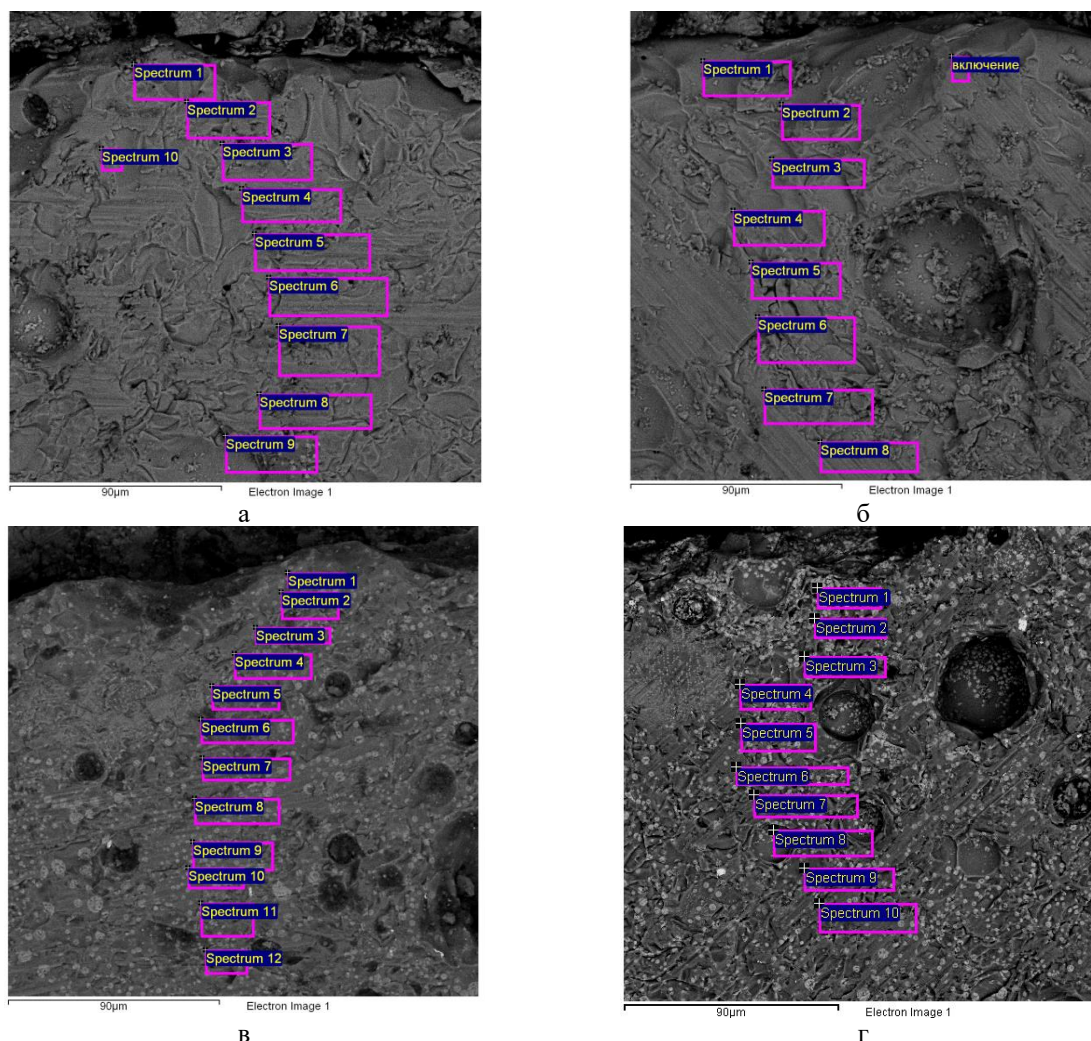


Рис. 3. Поперечний переріз перехідного шару в зоні контакту імплантат-кістка після 14 та 28 діб витримки *in vivo*: BC-11 (а, б); АС3-5 (в, г).

Концентрація та співвідношення кальцію та фосфору на поверхні дослідних СКМ *in vitro* є визначальним при формуванні апатитоподібного шару на поверхні імплантату *in vivo*. Встановлено, що значення співвідношення Ca / P для дослідних СКМ, яке було визначено із застосування методу растрової електронної мікроскопії та енергодисперсійного електроноозондового мікроаналізу (ЕЗМ), змінюється в залежності від механізму зародкоутворення та росту кристалів, які, в свою чергу залежать від біологічної активності поверхні, яка визначається здатністю їх до резорбції, кристалізаційною здатністю та характеристиками поверхні (вільна енергія поверхні (ВЕР), параметр шорсткості R_a). При цьому вказані характеристики визначаються ступенем зв'язаності силіційкисневого каркасу f_{Si} та відмінностями хімічного складу.

Для забезпечення біоактивних властивостей склокристалічних матеріалів та покриттів однією з умов є перебіг об'ємної тонкодисперсної кристалізації ГАП при забезпеченні співвідношення $\text{CaO} : \text{P}_2\text{O}_5 = 1,67 \div 4,0$. Поряд з цим у структурі скла, окрім наявності фосфатів кальцію, також важливим є формування сиботаксичних угруповань майбутніх кристалічних фаз, які є

потенційними нуклеаторами при формуванні апатитоподібного шару в умовах *in vivo* на поверхні імплантату в умовах живого організму.

Наявність силіцію на поверхні дослідних матеріалів є необхідною для утворення груп Si-OH , які є нуклеаторами при гетерогенному зародкоутворенні ГАП. Відомо, що в МРО кристали діоксиду титану можуть заряджатися негативно і електростатично адсорбувати іони Ca^{2+} на поверхні матеріалу. Останні притягнуть гідроксильні та фосфатні групи, створюючи умови для пересичення фосфатом кальцію у приповерхневому шарі, який при визначених умовах може мінералізуватися з розчину з утворенням ОГА.

Висновки. Встановлено, що природні апатити характеризуються наявністю великої кількості дефектів у їх структурі. Мінералізація нанодисперсних кристалів кістки у відсутності умов формування апатиту з перебігом тривалого часу супроводжується деградацією кісткового мінералу.

Встановлені умови осадження кристалічних фаз АМФ та ОГА як прекурсорів для формування апатитового шару ГАП на поверхні імплантату *in vivo*, що є запорукою успішної адаптації імплантату в середовищі організму.

Інформація про конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів при виконанні наукового дослідження та підготовці даної статті.

Інформація про фінансування. Автори гарантують, що вони не отримували жодних винагород у будь-якій формі, здатних вплинути на результати роботи.

Список використаної літератури

1. Serbin M. Ye., Timchenko D. S., Korobov A. M., Lahuta T. I., Shydlovska O. A. Biosumisni implantaty ta zasoby pidvyshchennia yakosti yikh vykorystannia (ohliad). Fotobiologhiia ta fotomedytsyna. 2017; (14, № 1-2), 95-104. [in Ukrainian]
2. Petrovskaja T. S. Silikolfosfatnye stekla kak komponent bioaktivnyh pokrytij. Steklo i keramika. 2002; 3(12):34–37. [in Russian]
3. Kokubo, T., & Yamaguchi, S. (2016). Novel bioactive materials developed by simulated body fluid evaluation: Surface-modified Ti metal and its alloys. *Acta biomaterialia*, 44, 16-30.
4. Garcia-Gareta, E., Coathup, M. J., & Blunn, G. W. (2015). Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone*, 81, 112-121.
5. Reid, R., Hall, B., Marriott, I., & El-Ghannam, A. (2015). Early osteoblast responses to orthopedic implants: Synergy of surface roughness and chemistry of bioactive ceramic coating. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(6), 1961-1973.
6. Lin, D. J., Hung, F. Y., Jakfar, S., & Yeh, M. L. (2016). Tailored coating chemistry and interfacial properties for construction of bioactive ceramic coatings on magnesium biomaterial. *Materials & Design*, 89, 235-244.
7. Gorbik, P. P. Magnitochuvstvitel'nye nanokompozity s funkcijami nanorobotov dlja primenenij v medicine i biologii. *Poverhnost'*. 2015; (7): 297-310. [in Russian]
8. Pisareva E.V., Vlasov M.Ju., Volova L.T. Struktura i svojstva biomaterialov na osnove mineral'nogo komponenta kostnoj tkani. *Sovremennye problemy nauki i obrazovanija*. 2015; (5); 710-710. [in Russian]
9. Yevropeiska konventsiiia pro zakhyst khrebetnykh tvaryn, shcho vykorystovuiutsia dlja doslidnykh ta inshykh naukovykh tsilei. Strasburh, 18 bereznia 1986 roku : ofitsiyni pereklad [Elektronnyi resurs] / Verkhovna Rada Ukrainy. Ofits. veb-sait. (Mizhnarodnyi dokument Rady Yevropy). — Rezhym dostupu do dokumenta : http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994_137.
10. Pro zakhyst tvaryn vid zhorstokoho povodzhennia : Zakon Ukrainy № 3447-IV vid 21.02.2006 r. [Elektronnyi resurs] /Verkhovna Rada Ukrainy. Ofits. veb-sait. Rezhym dostupu do dokumenta: <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=3447-15>. [in Ukrainian]

Стаття надійшла до редакції: 4.11.2019 р.