

ОРИГІНАЛЬНА СТАТТЯ

УДК 616.314:615.46:666.3

ДОСЛІДЖЕННЯ БІОСУМІСНОСТІ БІОМОРФНОЇ
КЕРАМІКИ НА ОСНОВІ КАРБІДУ КРЕМНІЮ
МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЇ МІКРОСКОПІЇ

Жуковцева Олена Ігорівна,
azh1985@mail.ru

О.І. Жуковцева¹, В.О. Маланчук¹, Литвин П.М.², В.С. Кисельов², Ю.В. Чепурний¹, Т.А.Алексеева³

¹Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

²Інститут фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова НАН України

³Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України

Резюме. В статті наведено результати атомно-силової мікроскопії (АСМ) зразків біоморфної кераміки на основі карбиду кремнію (біо SiC), проведеної для оцінки біосумісності даного матеріалу. Паралельно проводилось дослідження для титанових імплантатів з метою порівняння отриманих результатів між собою, оскільки біосумісність даного металу є загально визнаною. В ході експерименту визначено сили біоадгезії імункомпетентних біомолекул до поверхні зразків біоморфної кераміки та титану до та після їх перебування в організмі експериментальних тварин.

В результаті дослідження встановлено, що середня сила утримання зонда, модифікованого IgG, поверхнею імплантатів з чистого біо SiC складала $12,87 \pm 1,39$ нН (наноНьютон). Для порівняння, середня сила утримання зонда поверхнею титанових імплантатів до їх внесення в організм експериментальних тварин складала $14,43 \pm 1,55$ нН. Таким чином, зразки біо SiC виявили нижчий рівень біоадгезії IgG до поверхні в порівнянні з титаном медичного призначення, що дало підґрунтя оцінювати потенційну біоінертність даного матеріалу як високу та не гіршу за титан.

АСМ після видалення імплантатів з організму експериментальних тварин виявила, що сила біоадгезії IgG до поверхні біо SiC складала в середньому $14,29 \pm 1,53$ нН. Середня сила біоадгезії молекули IgG до поверхні титанових імплантатів після їх знаходження в живому організмі становила $15,64 \pm 1,67$ нН. Даний факт дозволяє стверджувати, що за результатами АСМ біоморфна кераміка на основі SiC виявила високий рівень біосумісності.

На підставі отриманих даних зроблено висновок, що біоморфна кераміка на основі карбиду кремнію є біосумісною, оскільки встановлено низький рівень її біофізичної взаємодії на нанорівні з біоактивними імункомпетентними біомолекулами. А значить при введенні імплантатів з даного матеріалу в м'які тканини живого організму потенційно слід очікувати низький рівень імунної відповіді або її відсутність.

Ключові слова: біоінертність, імплантаційний матеріал, титан медичного призначення.

Вступ

Атомно-силова мікроскопія (АСМ) дозволяє вимірювати значення сил біоадгезії між антигеном (АГ), яким у дослідженні являється поверхня матеріалу, що вивчається, та антитілом (АТ), яким зазвичай виступає IgG. Принцип дії АСМ базується на використанні міжатомних зв'язків. На малих відстанях (біля 0,1 нм) між атомами двох тіл (досліджувана поверхня та зонд) діють сили відштовхування, а на більших – сили тяжіння (рис. 1.) [2, 5].

При імплантації будь-якого матеріалу відбувається контакт його поверхні з кров'ю, що супроводжується адсорбцією захисних білків на поверхні імплантату, що в подальшому призводить до розвитку запалення чи утворення тромбів. Цей адсорбований шар визначає реакцію організму на імплантат і може контролювати сприйняття його тканинами реципієнта [1, 2]. Атомно-силова мікроскопія дозволяє вивчити силу зчеплення між поверхнею матеріалу та АТ, зокрема IgG, як основного

фактору, що забезпечує імунну реакцію організму на чужорідне тіло. Таким чином, чим вища сила біоадгезії молекули АТ до поверхні матеріалу, тим вища імовірність виникнення імунологічної реакції відторгнення даного імплантаційного матеріалу, та, відповідно, нижчий рівень його біосумісності [2, 4, 5]. Особливий інтерес викликає сила біоадгезії між АТ та поверхнею матеріалу, після його перебування в живих тканинах, оскільки, вище згаданий біологічний шар, що виникає на поверхні матеріалу, буде сприяти зростанню зазначених біоадгезивних сил. Таким чином, на основі даних щодо сил біоадгезії між поверхнею будь-якого матеріалу з АТ, можна робити висновок про його біологічну сумісність та перспективи використання в якості імплантатів з певною лікувальною метою.

Медичний титан вже багато років вважається загально визнаним біосумісним матеріалом для виготовлення імплантатів різного призначення. Тому, в багатьох сучасних дослідженнях біосумісності матеріалів в якості порівняння використовують показники титану, що застосовується в медицині.

Матеріали і методи дослідження

Нами проведено визначення біоадгезивних сил для поверхні імплантатів з біоморфного SiC [3] до та після перебування їх в організм експериментальних тварин. Аналогічне дослідження проведено для імплантатів з титану.

АСМ біоадгезійної сили відриву нами проводилась на скануючому зондовому мікроскопі Dimension 3000 NanoScore IIIa (Veeco corp., США) в Інституті фізики напівпровідників імені В.Е. Лашкарьова НАНУ, Київ. Серія силових кривих (залежностей величини силової взаємодії від відстані зонд-поверхня) реєструвалася при кімнатних умовах в атмосфері. Швидкість реєстрації кривих була постійною та складала 400 кГц.

Швидкість вертикального переміщення зонду вибиралась в діапазоні від 20 до 20000 нм/сек. Для вимірювань використовувались контактні зонди з Si₃N₄ марки DNP-20 (Veeco Inc., США) з V-подібним кантилівером. Усереднений радіус вістря зонду складав 30 нм, жорсткість кантилівера – 0.06 Н/м. Контроль форми вістря проводився перед та після вимірювань за методом “сліпої реконструкції” із використанням тестової ґратки TGT-1 (NT-MDT). Уточнення значення жорсткості кантилівера проводилось за аналізом спектру його температурного шуму [6, 7].

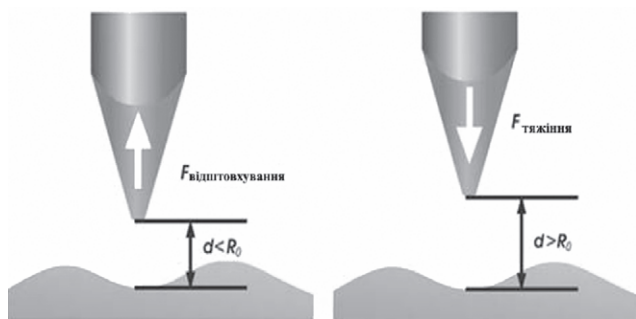


Рис. 1. Схема роботи АСМ.

Схема вимірювань представлена на рис. 2. У початковий момент зонд, модифікований АТ, знаходиться далеко від поверхні зразка (точка 1) і сила взаємодії поверхня-АТ (АГ) рівна нулю. Далі система вертикального переміщення зонда АСМ підводить зонд до поверхні, контролюючи відстань з ангстремною точністю. При деякій мінімальній відстані зонд-поверхня відбувається “захоплення” модифікованого зонда поверхнею під дією сил притягіння (точка 2). При подальшому зближенні зонда та поверхні починають діяти сили відштовхування, що перешкоджають проникненню зонду в поверхню. Після досягнення максимального значення сили відштовхування (задається оператором виходячи з умов експерименту) – точка 3, починається зворотне вертикальне переміщення зонда. При цьому, рівнодіюча всіх сил, що утримує модифікований зонд біля поверхні врівноважується силою пружної деформації консолі зонда в точці 4, в якій і відбувається відрив від поверхні. Таким чином, максимальна величина сили біоадгезійної взаємодії відповідає величині сили відриву зонда від поверхні (точка 4), що дорівнює силі пружної деформації консолі зонда, вимірюваною системою детектування АСМ по величині її прогину d .

$$F = k \Delta d$$

Поверхні зонда модифікували за допомогою покриття антитілами (АТ). В якості АТ – використовували поліклональні антитіла віслюка проти альбуміну кроля (SERVA, Швейцарія). АГ і АТ наносили з розчину білків концентрацією 0,1 мкг/мл у фізіологічному розчині (0,9% NaCl).

Під час вимірювань в атмосфері на поверхні зразка через присутність капілярних сил утворюється так званий капілярний місток, який дає значний внесок у величину адгезивних сил. Таким чином, значення сили відриву при вимірюванні на повітрі більші, ніж під час вимірювань у воді. Так як в ряді робіт [1, 2, 4, 5] були

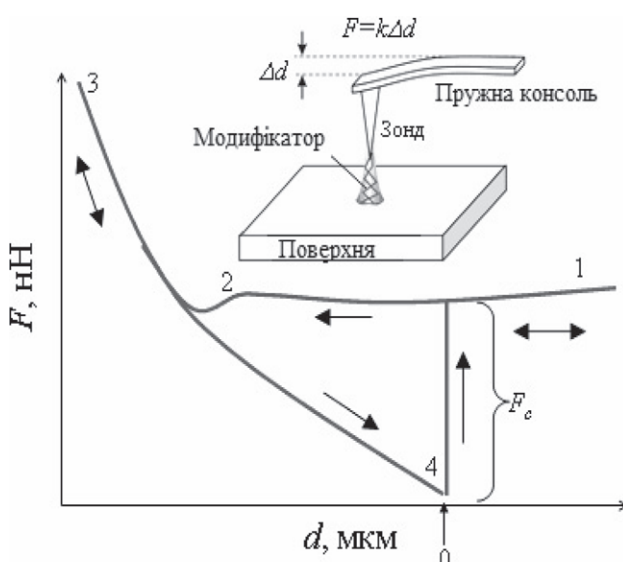


Рис. 2. Схема вимірювань сили відриву F методом АСМ. Сила біоадгезії визначається по вимірній АСМ величині пружної деформації консолі зонда d , як $F=kd$, де k – пружна стала консолі.

встановлені якісні співвідношення між значеннями сил відриву при вимірюванні в атмосфері та в рідині (фізіологічному розчині) для різних зразків, в роботі вимірювання були проведені тільки на повітрі.

Зразки імплантатів до та після вилучення з м'яких тканин, вивчалися за вище запропонованою методикою. Паралельно проводилось аналогічне дослідження у відношенні імплантатів із титану. Отримані результати порівнювались між собою. На основі отриманої інформації робились висновки щодо біосумісності досліджуваної біокераміки.

Дане дослідження проводилось паралельно з експериментальним вивченням *in vivo* особливостей взаємодії імплантатів з біоморфного карбиду кремнію з живими тканинами організму експериментальних тварин.

Оцінку сил біoadгезії IgG з поверхніми імплантатів з біоморфного SiC перед їх введенням до організму експериментальних тварин проведено у 15 випадках. Після виведення тварин з експерименту зразки матеріалу висікались, м'які тканини, що їх оточували направлялись на гістологічне дослідження з морфометрією капсули навколо імплантатів. Самі ж зразки біо SiC після видалення з організму експериментальних тварин вивчалися за допомогою АСМ за описаною методикою. Одночасно проводилось аналогічне дослідження у відношенні такої ж кількості імплантатів з титану (титанових пластин для остеосинтезу).

Результати та їх обговорення

Біосумісність матеріалу проявляється в реакції імунної системи організму на його введення. У випадку активної взаємодії між ними говорять про низьку біологічну сумісність. І навпаки – при виявленні низького рівня реакції імунокомпетентних молекул, клітин на введений матеріал, біосумісність останнього оцінюють як високу. Момент ініціації імунної відповіді на введений в організм небіологічний матеріал починається з взаємодії антитіл з активними центрами (певна електронна сукупність) на його поверхні, яка проявляється в їх адгезії. Чим краща адгезія антитіла до досліджуваної поверхні, тим вища імовірність та виразність імунної відповіді. Силу адгезії імунокомпетентних молекул до певної поверхні, яка може бути об'єктивно визначена, вважають важливим показником біосумісності небіологічного матеріалу з живим організмом. Таким чином, чим нижча сила адгезії між поверхнею матеріалу та імунокомпетентною молекулою, тим вищий рівень біосумісності даного матеріалу. Даний показник може бути дослідженим і відображеним в числовому значенні (в наноНьютонах) методом АСМ.

В результаті дослідження встановлено, що середня сила утримання зонда, модифікованого IgG, поверхнею імплантатів з чистого біо SiC склала $12,87 \pm 1,39$ нН (наноНьютон). Для порівняння, середня сила утримання зонда поверхнею титанових імплантатів до їх внесення в організм експериментальних тварин склала $14,43 \pm 1,55$ нН. Таким чином зі статистичною достовірністю зразки біо SiC виявили нижчий рівень біoadгезії IgG до поверхні в порівнянні з титаном медичного призначення,

що дало підґрунтя оцінювати потенційну біоінертність даного матеріалу як високу та не гіршу за титан, та приступити до дослідження зазначеного матеріалу *in vivo*.

АСМ після видалення імплантатів з організму експериментальних тканин виявила, що сила біoadгезії IgG до поверхні біо SiC складала в середньому $14,29 \pm 1,53$ нН. Середня сила біoadгезії молекули IgG до поверхні титанових імплантатів після їх знаходження в живому організмі становила $15,64 \pm 1,67$ нН. Дані показники статистично відрізняються між собою на користь зразків біоморфної кераміки з SiC. Даний факт дозволяє стверджувати, що за результатами АСМ біоморфна кераміка на основі SiC виявила високий рівень біосумісності.

Імплантати з титану виступали в якості контрольної групи спостережень. Вибір матеріалу був обумовлений тим, що титан медичного призначення є загально визаним матеріалом з високим рівнем біосумісності. Отже, за результатами нашого дослідження можна стверджувати, що біоморфній кераміці на основі карбиду кремнію притаманний високий рівень біологічної сумісності, а за показниками сил взаємодії з IgG – вищий, ніж для титану медичного призначення.

Висновки

На підставі отриманих даних можна зробити висновок, що біоморфна кераміка на основі карбиду кремнію є біосумісною, оскільки встановлено низький рівень її біофізичної взаємодії на нанорівні з біоактивними імунокомпетентними біомолекулами. Таким чином, при виведенні імплантатів з даного матеріалу в м'які тканини живого організму потенційно слід очікувати низький рівень імунної відповіді або її відсутність, при чому нижчий, ніж на імплантати з титану медичного призначення. Саме результат порівняння досліджуваного матеріалу з медичним титаном доводить його високу біосумісність, оскільки сила біoadгезії імунокомпетентних біомолекул до поверхні титану вища, ніж до поверхні досліджуваної кераміки.

Рецензент: д.мед.н., професор Неспрядько В.П.

ЛІТЕРАТУРА

1. Алексеева Т.А., Ермоленко И.С., Лебовка Н.И. и др. Исследование биоадгезивных взаимодействий на золоте, кремнии и стекле методом атомно-силовой спектроскопии // *Металлофизика и новейшие технологии*. – 2009. – Т.31, №2. – С. 241-248.
2. Алексеева Т.А., Ермоленко И.С., Ошкадёрв С.П. и др. Изменение поверхности металлических имплантатов с неорганическими покрытиями после нахождения в живом организме // *Металлофизика и новейшие технологии*. – 2009. – Т.31, №7. – С. 979-988.
3. Беляев А.Е., Конакова Р.В. (ред.) (2010) *Карбид кремния: технология, свойства, применение*. Х: "ИСМА", 532с.
4. Efremov A.A., Alekseyeva T.A., P.V. Lytvyn et al. Nanoprobe spectroscopy of capillary forces and its application for a real surface diagnostic // *Semiconductor Physics, Quantum Electronics, Optoelectronics* – 2010. – Vol.13, № 2 – P.111-124.
5. Ohnishi S., Murata M., Hato M. Correlation between Surface Morphology and Surface Forces of Protein A Adsorbed on Mica. – *Biophys. J.*, 1988, v.74, p.455-465.
6. Friedbacher G., Fuchs H. Classification of Scanning Probe Microscopies (Technical Report) // *Pure Appl. Chem.* – 1999. – Vol. 71. – №. 7. – P. 1337-1357.
7. Howland R., Benatar L. *A Practical Guide to Scanning Probe Microscopy*. – TM Microscopes, 1998.

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ БИОМОРФНОЙ КЕРАМИКИ НА ОСНОВЕ КАРБИДА КРЕМНИЯ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Е.И. Жуковцева¹, В.А. Маланчук¹, Литвин П.М.²,
В.С. Киселёв², Ю.В. Чепурный¹, Т.А.Алексеева³

¹Национальный медицинский университет
имени А.А. Богомольца, г. Киев, Украина

²Институт физики полупроводников
имени В.Е. Лашкарьова НАН Украины,
г. Киев, Украина

³Институт химии поверхности
имени А.А. Чуйко НАН Украины, г. Киев, Украина

Резюме. В статье приведены результаты атомно-силовой микроскопии образцов биоморфной керамики на основе карбида кремния (био SiC), проведенной для оценки биосовместимости данного материала. Параллельно проводилось исследование для титановых имплантатов с целью сравнения полученных результатов между собой, поскольку биосовместимость данного металла является общепризнанной. В ходе эксперимента определены силы биоадгезии иммунокомпетентных биомолекул к поверхности образцов биоморфной керамики и титана до и после их пребывания в организме экспериментальных животных.

В результате исследования установлено, что средняя сила удержания зонда, модифицированного IgG, поверхностью имплантатов из чистого био SiC составила $12,87 \pm 1,39$ НН (наноНьютон). Для сравнения, средняя сила удержания зонда поверхностью титановых имплантатов до их введения в организм экспериментальных животных составила $14,43 \pm 1,55$ НН. Таким образом, образцы био SiC обнаружили низкий уровень биоадгезии IgG к поверхности по сравнению с титаном медицинского назначения, что дало основания оценивать потенциальную биоинертность данного материала как высокую и не хуже титана.

АСМ после удаления имплантатов из организма экспериментальных животных обнаружила, что сила биоадгезии IgG к поверхности био SiC составляла в среднем $14,29 \pm 1,53$ НН. Средняя сила биоадгезии молекулы IgG к поверхности титановых имплантатов после их нахождения в живом организме составляла $15,64 \pm 1,67$ НН. Данный факт позволяет утверждать, что по результатам АСМ биоморфная керамика на основе SiC обнаружила высокий уровень биосовместимости.

На основании полученных данных сделан вывод, что биоморфная керамика на основе карбида кремния является биосовместимой, поскольку установлен низкий уровень ее биофизического взаимодействия на наноуровне с биоактивными иммунокомпетентными биомолекулами. Таким образом, при введении имплантатов из данного материала в мягкие ткани живого организма потенциально следует ожидать низкий уровень иммунного ответа или ее отсутствие, причем ниже, чем на имплантаты из титана медицинского назначения.

Ключевые слова: биоинертность, имплантационный материал, титан медицинского назначения.

INVESTIGATION OF THE BIOMORPHIC CERAMICS BASED ON SILICON CARBIDE BIOCOMPATIBILITY BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY

¹O. Zhukovtceva, ¹V. Malanchuk, ²P. Litvin,
²V. Kiselov, ¹Yu. Chepurny, ³T. Alekseyeva

¹Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

²V.E. Lashkaryov Institute of Semiconductor
Physics NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

³Chuiko Institute of Surface Chemistry, Kyiv, Ukraine

Summary. The paper presents the results of atomic force microscopy for the biomorphic ceramics based on silicon carbide (bio SiC), conducted to evaluate the biocompatibility of the material. In parallel, the survey for titanium implants was presented to compare the results obtained with each other because biocompatibility of this metal is generally recognized. In the experiment, it was defined forces of the bioadhesion of the immune biomolecules to the surface of biomorphic ceramics and titanium before and after their stay in the body of experimental animals.

This study found, that the average force of the retention the modified probe with IgG by implanted bio SiC surface was $12,87 \pm 1,39$ NN (nanoNiyuton). For comparison, the average force of the retention the probe by the surface of titanium implants before their introduction into the body of experimental animals was $14,43 \pm 1,55$ NN. Thus bio SiC revealed lower bioadhesion of the IgG to the surface, compared with medical titanium. This data gave opportunity to evaluate the bioinaction of this material as high and better than titanium.

AFM after implant removal from the body of experimental animals revealed that the force of the IgG bioadhesion to the surface of the bio SiC on average was $14,29 \pm 1,53$ NN. The average force of the IgG molecules bioadhesion to the surface of titanium implants after their presence in vivo was $15,64 \pm 1,67$ NN. This fact suggests that the results of AFM biomorphic ceramics based on SiC revealed a high level of biocompatibility.

Based on these data it is concluded that biomorphic ceramics based on silicon carbide is biocompatible as set low level of biophysical interactions at the nanoscale with bioactive immunocompetent biomolecules.

Key words: bioinaction, implantation material, medical titanium.