

16. Surgical or nonoperative treatment for lumbar spinal stenosis? A randomized controlled trial / *Malmivaara A., Sletis P., Heliövaara M. [et al.]* // *Spine*. — 2007. — Vol. 32. — P. 1–8.
17. Surgical results of lumbar spinal stenosis : a comparison of patients with or without previous back surgery / *Herno A., Airaksinen O., Saari T. [et al.]* // *Spine*. — 1995. — Vol. 20. — P. 964–969.
18. *Swezey R.* Outcome for lumbar stenosis : a 5-year follow-up study / *Swezey R.* // *J. Clin. Rheumatol.* — 1996. — № 2. — P. 129–134.
19. The prognosis of conservative treatments for lumbar spinal stenosis : analysis of patients over 70 years of age / *Tadokoro K., Miyamoto H., Sumi M. [et al.]* // *Spine*. — 2005. — Vol. 30. — P. 2458–2463.
20. The use of epidural steroids in the treatment of lumbar radicular pain : a prospective, randomized, double-blind study / *Cuckler J., Bernini P., Wiesel S. [et al.]* // *J. Bone Jt Surg.* — 1985. — Vol. 67-A. — P. 63–66.
21. Toward a biochemical understanding of human intervertebral disc degeneration and herniation / *Kang J., Stefanovic-Racic M., McIntyre L. [et al.]* // *Spine*. — 1997. — Vol. 22. — P. 1065–1073.

УДК 616-092.4:611-018.54

ДИНАМІКА РОЗЧИННОСТІ БІОЛОГІЧНИХ, СИНТЕТИЧНИХ КЕРАМІЧНИХ ТА ЦЕМЕНТНИХ КОМПОЗИТНИХ ГІДРОКСИАПАТИТНИХ МАТЕРІАЛІВ У ШТУЧНІЙ ПЛАЗМІ КРОВІ В ДОСЛІДАХ *IN VITRO*

I. Г. Герцен¹, О. Р. Пархомей², О. О. Кудя²

¹ДУ “Інститут травматології та ортопедії НАМН України”, м. Київ

²ДУ “Інститут проблем матеріалознавства НАН України”, м. Київ

DYNAMICS OF DISSOLUTION OF BIOLOGICAL, SYNTHETIC CERAMIC AND CEMENT COMPOSITE HYDROXYAPATITE MATERIALS IN ARTIFICIAL BLOOD PLASMA IN THE STUDY IN VITRO

I. G. Hertsen, A. R. Parkhomey, O. O. Kuda

The comparative objective evaluation of the dynamics of the solubility of modern hydroxyapatite composite biomaterials in artificial blood plasma SBF has been presented. The studies were conducted on the 2-nd, 5-th and 7-th days. As the main criterion for the dissolution of plastic materials the loss of their mass has been adopted. It is proved significantly higher solubility properties of calcium phosphate cement, mass loss rates are much higher than values of ceramic biological and synthetic hydroxyapatite materials.

Key words: hydroxyapatite, cements, ceramics, solubility.

ДИНАМИКА РАСТВОРЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ, СИНТЕТИЧЕСКИХ КЕРАМИЧЕСКИХ И ЦЕМЕНТНЫХ КОМПОЗИТНЫХ ГИДРОКСИАПАТИТНЫХ МАТЕРИАЛОВ В ИСКУССТВЕННОЙ ПЛАЗМЕ КРОВИ В ИССЛЕДОВАНИИ *IN VITRO*

И. Г. Герцен, А. Р. Пархомей, А. А. Кудя

Представлена сравнительная объективная оценка динамики растворимости современных гидроксиапатитных композитных биоматериалов в искусственной плазме крови (SBF). Исследования проводились на 2, 5 и 7 сутки. За основной критерий растворения пластических материалов была принята потеря их массы. Достоверно доказаны высокие свойства растворимости фосфатно-кальцевого цемента, потеря массы которым значительно превышала показатели керамических биологического и синтетического гидроксиапатитных материалов.

Ключевые слова: гидроксиапатит, цементы, керамика, растворимость.

Вступ

Основними параметрами синтезу фосфатів кальцію, які призначені для пластики кісткових порожнин, є їх стехіометрія — $n(\text{Ca})/n(\text{P})$, та розчинність. В умовах

імплантації під дією внутрішнього середовища організму відмічається обернено пропорційна залежність цих параметрів: чим менше відношення кількості речовин $n(\text{Ca})/n(\text{P})$, тим більш розчинним є матеріал. У нормі

в кістковій тканині людини коефіцієнт стехіометрії неорганічного матриксу становить 1,67. Фосфатам кальцію з відносно низькими стехіометричними коефіцієнтами властиві низькі рівні рН та потенційно високі швидкості біодеградації [1]. Ізотерми розчинності відображають динаміку змін іонного складу матеріалу в розчині. Відомо, що при рівні рН > 4,2 єдиним термодинамічно-стабільним фосфатом кальцію у водному розчині є гідроксиапатит. На відміну від біологічних, при синтезі синтетичних гідроксиапатитних матеріалів, окрім кількості вмісту основних складових імплантата важливим є надання особливої форми кристалам. Синтетичні кристали фосфатів кальцію повинні мати форму плоских призм розмірами 60×20×5 нм, тобто відповідати таким кістковій тканині. Розробка цементних гідроксиапатитних матеріалів — перспективна галузь матеріалознавства, що привертає увагу великої кількості дослідників [3]. Цементну масу отримують при змішуванні порошків фосфатів кальцію з розчинником. При цьому виникає реакція гідролізу: часткове розчинення фосфатів кальцію з утворенням мікропористого моноліту. Середні значення пористості фосфатно-кальцієвого цементу (ФКЦ) становлять 30–60%, розміри пор — близько 1 мкм. Сьогодні запропонована велика кількість цементів на основі фосфатів кальцію різного складу [4]. Проте, незважаючи на варіабельність первинних складових ФКЦ, після реакції гідролізу можливе утворення тільки двох кінцевих продуктів — гідроксиапатиту і бруситу [6].

Міцність на стиснення ФКЦ становить від 50 до 100 МПа, що відповідає компресійній стійкості кісток людини. Міцність на вигин для цих матеріалів значно менша і становить до 10 МПа. Для порівняння: міцність стисненню акрилових цементів становить до 400 МПа, вигину — 30 МПа [21]. Основними хімічними вимогами для остеопластичних гідроксиапатитних матеріалів є їх відносно висока швидкість біодеградації (на рівні 10 мкм/рік) та великі кондукторні властивості поверхні імплантатів. Великокристалічна гідроксиапатитна кераміка резорбує вкрай повільно, і це корелює із зведенням розчинності. Так, зведення розчинності при температурі 25°C для гідроксиапатиту становить $\approx 10^{-117}$. Кераміка, яку отримують із одного лише трикальційфосфату, розчиняється надто швидко, так що власна кісткова тканина не встигає замінити дефект. Зведення розчинності для трикальційфосфатної кераміки становить $\approx 10^{-29}$ [1]. Тому швидкість біодеградації остеопластичних матеріалів напряму

залежить від швидкості їх розчинності. Під дією міжклітинної рідини виникає розчинення фосфатів кальцію з осадом гідроксиапатиту на поверхні імплантата (зміна стехіометрії) з подальшою макрофагальною резорбцією. Отже, порівняльні тестування впливу на імплантати внутрішнього середовища організму змодельовані *in vitro*, дозволяють прогнозувати їх біодеградаційні властивості.

Мета роботи — дослідити стехіометрію композитних гідроксиапатитних остеопластичних матеріалів у штучній міжклітинній рідині в дослідах на розчинність *in vitro*.

Матеріали і методи

Для дослідження використовували керамічні біологічний та синтетичний гідроксиапатити, а також ФКЦ. Ці апатитні матеріали були композитними (окрім гідроксиапатиту, містили склофазу та трикальційфосфати), однаковими за щільністю та пористістю та доказово рекомендованими для пластики порожнинних дефектів кісток [1, 4, 6]. Для визначення динаміки змін стехіометрії остеопатитів *in vitro* застосували дослідження у штучній плазмі крові (Simulated Body Fluid — SBF).

SBF виготовляли розчиненням CaCl₂ (розчин), K₂HPO₄, NaCl, KCl, MgCl₂, H₂O, NaHCO₃, Na₂SO₄ у дистильованій воді згідно з формулою Kokubo [8]. Концентрація іонів представлена в табл. 1.

Для визначення втрати ваги і швидкості розчинення зразків їх зважували на аналітичних вагах з точністю до 5 знака. Таким чином отримували однакову масу досліджуваних матеріалів. Після зважування зразки поміщали в ємкості з розчином у співвідношенні 1:30 (рис. 1). Масу ємкостей також попередньо визначали у той самий спосіб.

Після чого зразки відправляли в термостат на 2, 5 та 7 діб з температурою 36–37 °C. Досліджували по 6 однотипних зразків на кожний строк спостереження. Зразки розподілили на чотири серії:

- *перша* — фосфатно-кальцієвий цемент (ФКЦ);
- *друга* — композитний керамічний біологічний гідроксиапатит (КБ ГА);
- *третья* — композитний керамічний синтетичний гідроксиапатит (КС ГА);
- *четверта* (контрольна) — нативна спечена кістка (неорганічний матрикс кістки, отриманий шляхом спікання без включень).

Таблиця 1

Концентрація іонів у плазмі крові людини і SBF, моль/л

Перелік іонів	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ³⁻	HPO ⁴⁻	SO ⁴⁻
Плазма крові людини	142,0	3,6–5,5	1,0	2,1–2,6	95,0–107,0	27,0	0,65–1,45	1,0
SBF	142,0	6,5	1,5	2,5	148,0	4,2	1,0	0



Рис. 1. Загальний вигляд остеопатитних матеріалів в ємкостях з SBF

Після необхідного проміжку часу зразки проціджували, промивали дистильованою водою, висушували у сухожировій шафі при температурі 105–110°C протягом 4–6 год і повторно зважували. Наступний етап роботи включав у себе вимірювання розчинів, у яких насичувались зразки, кількість речовини була в 30 разів більша ніж маса самого зразка. Підготовленими розчинами одночасно заливали всі зразки, засікали час, накривали кришкою і ставили в ексікатор з температурою 36–37°C протягом різних проміжків часу (від 2 до 7 діб). Після цього зразки промивали дистильованою водою, висушували та зважували. Попередньо була визначена площа поверхні зразків, їх початкова маса. За зміною маси відносно початкової маси з одиниці поверхні протягом доби визначали питому втрату маси матеріалу.

Втрату маси розраховували за формулою (1), динаміку розчинення — за формулою (2).

Питому втрату маси P зразків композитів % (мас.) / добу визначали за формулою:

$$P = \frac{\Delta m}{m_{\text{поч}}} \cdot 100\%, \quad (1)$$

де Δm — зміна маси зразка за час перебування у штучному середовищі; $m_{\text{поч}}$ — початкова маса зразка, г.

Динаміку розчинення S визначали за формулою, % мас.:

$$S = \frac{\Delta m}{(m_{\text{поч}} \cdot t)} \cdot 100\%, \quad (2)$$

де t — час перебування зразка у штучному середовищі, діб.

Результати та їх обговорення

Стехіометричні показники, що характеризують розчинення гідроксиапатитних композитних матеріалів у штучній плазмі крові (SBF) у динаміці виявили поступову стабільну втрату маси в *першій* (ФКЦ) та нестабільну — у *другій* (КБ ГА) і *контрольній серії* (нативна спечена кістка).

• Так, на 2 добу після початку дослідів ФКЦ втратив 0,527±0,006 г, питома втрата маси ФКЦ становила 17,16±0,23%, а динаміка розчинення *in vitro* в цьому періоді спостереження становила 8,58±0,11%/добу. Тоді як ці показники в *контрольній* та у *другій серії* спостереження були значно меншими від показників групи ФКЦ.

На 2 добу після початку дослідів керамічний біологічний гідроксиапатит втратив 0,016±0,001 г, питома втрата маси КБ ГА становила 0,53±0,02%, а динаміка розчинення *in vitro* в цьому періоді спостереження становила 0,26±0,01%/добу. Показники розчинення *контрольної серії* на 2 добу після початку дослідів також були меншими за серію з ФКЦ: так, нативна спечена кістка втрачала 0,02±0,001 г, питома втрата маси *контрольною серією* становила 0,64±0,013%, а динаміка розчинення *in vitro* в цьому періоді спостереження для неї становила 0,32±0,006%/добу. Ці показники були дещо вищими за серію композитного біологічного гідроксиапатиту, проте значно поступались показникам розчинення фосфатно-кальцієвого цементу.

На відміну від попередніх матеріалів, при дослідженні показників розчинності КС ГА виявлено зворотне попереднім дослідом збільшення маси матеріалу. Так, на 2 добу після початку дослідів керамічний синтетичний

гідроксиапатит додав у масі на 0,015±0,001 г, питома втрата маси КС ГА була негативною і становила -0,49±0,02%, і тому динаміка розчинення *in vitro* в цьому періоді спостереження була від'ємною і становила -0,24±0,01%/добу.

Це дає підставу стверджувати, що на 2 добу спостереження розчинність фосфатно-кальцієвого цементу була більш вираженою, ніж керамічного біологічного гідроксиапатиту та нативної спеченої кістки контрольної групи. Керамічний синтетичний гідроксиапатит адсорбував штучну плазму крові (SBF) і таким чином додавав у масі, що призводило від'ємні значення динаміки розчинення.

• На 5 добу спостереження відмічалось зменшення показників розчинності в усіх дослідних серіях. Витрата маси фосфатно-кальцієвим цементом була меншою і становила 0,84±0,01 г, питома втрата маси ФКЦ становила 27,47±0,37%, динаміка розчинення *in vitro* в цьому періоді спостереження значно зменшувалась і відповідала 5,49±0,07%/добу. Показники розчинності у *контрольній* та у серії композитного керамічного біологічного гідроксиапатиту також зменшувались, але на цьому етапі спостереження поступались резорбційним властивостям фосфатно-кальцієвого цементу.

Так, на 5 добу після початку дослідів керамічний біологічний гідроксиапатит втратив 0,05±0,02 г, питома втрата маси КБ ГА становила 1,58±0,06%, а динаміка розчинення *in vitro* в цьому періоді спостереження становила 0,31±0,012%/добу. Показники розчинення нативної спеченої кістки *контрольної серії* синхронно відповідали серії композитного керамічного біологічного гідроксиапатиту, тобто також були меншими за серію ФКЦ.

Так, на 5 добу спостереження нативна спечена кістка втрачала 0,03±0,001 г, питома втрата маси *контрольною серією* становила 0,95±0,02%, а динаміка розчинення *in vitro* в цьому періоді спостереження для неї становила 0,19±0,004%/добу. Ці показники також значно поступались показникам розчинення фосфатно-кальцієвого цементу.

Обернено пропорційно показникам керамічного біологічного гідроксиапатиту та *контрольній серії* в цьому періоді дослідження продовжилась тенденція додавання у масі керамічним синтетичним гідроксиапатитом. Так, на 5 добу після початку дослідів відмічали збільшення маси керамічним синтетичним гідроксиапатитом до +0,2±0,001 г, питома втрата маси КС ГА продовжувала бути негативною і становила -0,62±0,02%, і тому динаміка розчинення *in vitro* в цьому періоді спостереження була від'ємною і становила -0,12±0,005%/добу.

Це дає підставу стверджувати, що на 5 добу спостереження розчинність фосфатно-кальцієвого цементу була постійною і більш вираженою, ніж керамічного біологічного гідроксиапатиту та нативної спеченої кістки *контрольної серії*. Керамічний синтетичний гідроксиапатит продовжував адсорбувати штучну плазму крові (SBF) і таким чином надалі збільшував свою масу, що знову призводило від'ємні значення динаміки розчинення.

• На 7 добу спостереження додавання у масі шляхом адсорбції штучної плазми крові (SBF) керамічним синтетичним гідроксиапатитом стабільно продовжувалось.

Так, на цьому етапі спостереження КС ГА збільшив свою масу до $+0,04 \pm 0,001$ г, питоме збільшення маси для КС ГА становило $+1,04 \pm 0,04\%$, а динаміка розчинення *in vitro* в цьому періоді спостереження була від'ємною і становила $-0,15 \pm 0,006\%$ /добу. У *контрольній* та у серії керамічного біологічного гідроксиапатиту на цьому етапі процес розчинення матеріалів штучною плазмою синхронно призупинявся.

Так, на 7 добу після початку дослідження нативна спечена кістка витрачала лише $0,04 \pm 0,001$ г, а втрата нею питомої маси становила $1,28 \pm 0,003\%$. Динаміка розчинення *in vitro* в цьому періоді спостереження для *контрольної* серії становила $1,22 \pm 0,04\%$ /добу. У групі керамічного біологічного гідроксиапатиту на 7 добу після початку дослідження процес розчинення матеріалу в штучній плазмі також практично припинявся. На цьому етапі спостереження КБ ГА втрачав у масі $0,06 \pm 0,003$ г, питоме втрата маси керамічним біологічним гідроксиапатитом становила $1,92 \pm 0,07\%$, а динаміка розчинення *in vitro* в цьому періоді спостереження для матеріалу становила $0,27 \pm 0,01\%$ /добу. Ці показники переважали композитний керамічний синтетичний гідроксиапатит, проте значно поступалися показникам розчинення фосфатно-кальцієвого цементу. На 7 добу після початку дослідження фосфатно-кальцієвий цемент продовжував розчинятися в штучній плазмі, хоч і загальна динаміка резорбції цього матеріалу в SBF знижувалась. Так, на цьому етапі досліджень ФКЦ втратив у масі до $0,98 \pm 0,01$ г, питоме втрата маси ФКЦ становила $32,24 \pm 0,43\%$, динаміка розчинення *in vitro* для ФКЦ в цьому періоді спостереження знижувалась, хоч і перевищувала показники КБ ГА та *контрольної* серії і становила $4,61 \pm 0,06\%$ /добу (табл. 2).

Таким чином, на 7 добу спостереження показники, що характеризують активність розчинення, в усіх дослідних серіях мали тенденцію до зниження. При цьому нативна спечена кістка та керамічний біологічний гідроксиапатит практично припиняли резорбувати в штучній плазмі. Показники розчинності фосфатно-кальцієвого цементу також були меншими за попередні, але процеси резорбції на цьому етапі спостереження подовжувались. Керамічний синтетичний гідроксиапатит адсорбував штучну плазму крові (SBF) і таким чином продовжував стабільно додавати у масі, що збільшило від'ємні значення динаміки розчинення (рис. 2–4).

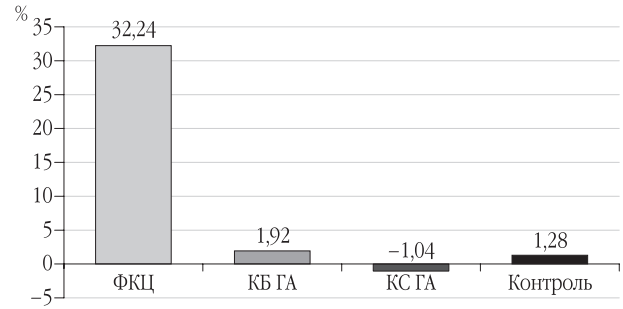


Рис. 2. Питоме втрата маси гідроксиапатитними композитними матеріалами на 7 добу спостереження

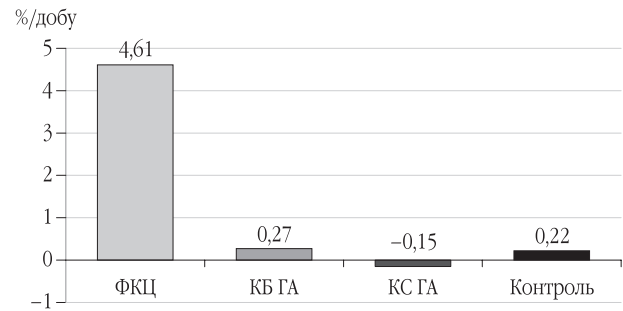


Рис. 3. Динаміка розчинення гідроксиапатитних композитних матеріалів на 7 добу спостереження

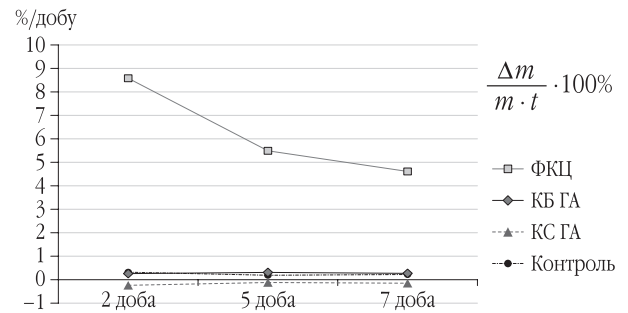


Рис. 4. Динаміка розчинення біологічних, синтетичних керамічних та цементних гідроксиапатитних матеріалів у SBF на 2, 5, та 7 добу спостереження

Таблиця 2
Показники розчинності остеоапатитних композитних матеріалів *in vitro* на 7 добу спостереження

Показники	Серії дослідження				Оцінка р
	ФКЦ	КБ ГА	КС ГА	контроль	
Початкова маса, г	$3,04 \pm 0,03$	$3,09 \pm 0,04$	$3,07 \pm 0,02$	$3,06 \pm 0,02$	0,91
Фактична маса, г	$2,06 \pm 0,03$	$3,03 \pm 0,04$	$3,11 \pm 0,02$	$3,03 \pm 0,02$	0,0017
Втрата маси, г	$0,98 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,003$	$+0,03 \pm 0,001$	$0,04 \pm 0,001$	0,0001
Питоме втрата маси, %	$32,24 \pm 0,43$	$1,92 \pm 0,07$	$-1,04 \pm 0,04$	$1,28 \pm 0,03$	0,0001
Динаміка розчинення, %/добу	$4,61 \pm 0,06$	$0,27 \pm 0,001$	$-0,15 \pm 0,006$	$0,22 \pm 0,002$	0,0002

Примітка: р — оцінка статистичної значимості різниці між групами за критерієм Вілкоксона–Манна–Уїтні. Жирним шрифтом виділена статистично значима різниця між групами.

Висновки

1. Результати дослідження розчинності біологічних, синтетичних керамічних та цементних композитних гідроксиапатитних матеріалів у штучній плазмі крові (SBF) свідчать про кращі резорбційні властивості фосфатно-кальцієвого цементу — на 2, 5 та 7 добу спостереження матеріал продовжував втрачати масу з поступовим зниженням показників.

2. Керамічний біологічний гідроксиапатит у динаміці також втрачав масу, хоча показники резорбції матеріалу значно поступались таким фосфатно-кальцієвого цементу на кожному терміні спостереження.

3. Динаміка розчинення керамічного синтетичного гідроксиапатиту була стабільно негативною — на 2, 5 та 7 добу спостереження матеріал додавав у масі шляхом адсорбції поверхнею SBF, тим самим створюючи негативну динаміку розчинення

Література

1. *Вересов А. Г.* Химия неорганических материалов на основе фосфатов кальция / *Вересов А. Г., Путляев В. И., Третьяков Ю. Д.* // Рос. хим. журн. (Журн. Рос. хим. общ-ва им. Д. И. Менделеева). — 2004. — Т. 48, № 4. — С. 52–64.
2. *Герцен И. Г.* Экспериментальные аспекты застосування нових композитних матеріалів для пластики дефектів кісток / *Герцен И. Г.* // Травма. — 2010. — Т. 11, № 1. — С. 17–19.
3. Цементы на основе фосфатов кальция для медицинского применения / *Баринов С. М., Комлев В. С., Гурин А. Н.* [и др.] // Нанотехнологии в онкологии : тезисы докл. науч.-практ. конф. (Москва, 23–26 октября 2010 г.). — М., 2010. — С. 3–13.
4. *Bobner M.* Design of ceramic-based cements and putties for bone graft substitution / *M. Bobner* // Eur. Spine J. — 2010. — Vol. 10. — P. 114–121.
5. Design of a modular reactor for biofilm formation studies in biomaterials / *Barros J., Manuel C. M., Grenbo L.* [et al.] // European Cells and Materials. — 2012. — Vol. 23 (Supl. 2). — P. 11.
6. *Kokubo T.* How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity / *T. Kokubo, H. Takadama* // Biomaterials. — 2006. — Vol. 27, Issue 15. — P. 2907–2915.
7. The effect of injectable calcium phosphate cement on bone anchorage of titanium implants: an experimental feasibility study in dogs / *Arisan V., Aniel A., Wolke J.* [et al.] // Int. J. Oral Maxillofac. Surg. — 2010 (ahead of print).
8. *Yoshimura M.* Hydroxyapatite and related materials / *Yoshimura M., Suda H.* // Eds. *P. V. Brown, B. Constantz.* — CRC : Press Inc., 1994. — P. 45–72.