

УДК 66.087.7, 617-089.844

DOI: 10.15372/KhUR2019161

Влияние германия на свойства кальций-фосфатного покрытия титановых имплантатов

Е. А. ЗЕЛИЧЕНКО¹, В. В. ГУЗЕЕВ¹, Я. Б. КОВАЛЬСКАЯ¹, О. А. ГУРОВА¹, С. А. КУЗЬМАНИН², Е. А. НАЗАРОВ²,
Н. В. ВИШНЯКОВ³, Н. Б. РЫБИН³

¹Национальный исследовательский ядерный университет “МИФИ”,
Москва (Россия)

E-mail: zelichenko65@mail.ru

²Рязанский государственный медицинский университет им. академика И. П. Павлова,
Рязань (Россия)

³Рязанский государственный радиотехнический университет,
Рязань (Россия)

(Поступила 28.04.19; после доработки 08.05.19)

Аннотация

Ограниченный срок службы эндопротеза при отсутствии других осложнений объясняется асептической нестабильностью имплантата, возникающей и развивающейся в результате недостаточной остеоинтеграции. Выполнена обработка поверхности имплантатов из сплава ВТ-6 с формированием кальций-фосфатных покрытий, в том числе содержащих германий (0.4 и 2.5 мас. %), с целью проведения сравнительного анализа отклика организма. Поверхность полученных покрытий исследована методом растровой электронной микроскопии. Установлено, что введение германия оказывает существенное влияние на морфологию поверхности покрытий. С помощью световой микроскопии гистологических срезов показано, что процессы остеоинтеграции наиболее интенсивно протекают в группе имплантатов, содержащих в составе кальций-фосфатного покрытия 2.5 мас. % германия.

Ключевые слова: эндопротез, кальций-фосфатные покрытия, имплантаты, германий, остеоинтеграция, костная ткань, микродуговая обработка

ВВЕДЕНИЕ

Дегенеративно-дистрофические заболевания суставов в структуре заболеваний опорно-двигательного аппарата среди взрослых занимают 25.8 %, при этом в последние годы прослеживается тенденция к их увеличению [1]. Диагностика остеоартроза, как правило, на поздних стадиях, отсутствие комплексного подхода в лечении и многие другие факторы приводят в конечном итоге к эндопротезированию.

В 2017 г. в Российской Федерации эндопротезирование тазобедренного сустава было выполнено 70 316 пациентам, из которых 65.5 % –

лица старше трудоспособного возраста; коленного сустава – 42 904 пациентам, среди которых лица трудоспособного возраста составляли 18.5 %. Несмотря на широкий модельный ряд используемых эндопротезов и совершенствование хирургической техники, структура послеоперационных осложнений остается практически неизменной, при этом более половины ревизионных вмешательств (38.8–56.5 %) выполняется по причине асептической нестабильности компонентов эндопротеза [2].

Один из путей профилактики такой нестабильности – создание на поверхности эндопротеза биосовместимых покрытий, препятствующих

щих диффузии материала в окружающие ткани и одновременно стимулирующих процессы остеointеграции. Наиболее перспективными для получения таких покрытий являются материалы на основе фосфатов кальция. Среди них ведущее место принадлежит гидроксиапатиту (ГАП) как основному метаболиту костной ткани.

В последнее время активно ведутся исследования по улучшению характеристик таких материалов за счет введения в их состав разных микроэлементов или заместителей. Например, для повышения прочностных свойств кальций-фосфатных материалов в них вводят частицы диоксида циркония (ZrO_2). Установлено, что с ростом концентрации ZrO_2 прочность покрытий значительно возрастает. Аналогичный эффект наблюдается при введении в состав покрытия оксида алюминия (Al_2O_3), карбида кремния (SiC), а также полиэтилена. Вместе с тем известно, что полиэтилен является биоинертным материалом и приводит к снижению остеointегративной способности покрытий [3–6].

В работе [7] материалы на основе анион-модифицированного ГАП были расположены по степени их биоактивности следующим образом: SiO_4^{4-} -ГАП > CO_3^{2-} -ГАП > ГАП. Отмечен также стимулирующий эффект кремния по отношению к пролиферации хондроцитов.

И. А. Скрипникова с соавторами подчеркивают роль кремния в процессах ремоделирования костной ткани и обосновывают возможность использования кремнийсодержащих добавок в комплексной профилактике остеопороза. Кроме того, доказано участие кремния в развитии соединительной ткани, а также в формировании и минерализации костной ткани. Отмечен положительный эффект кремнийсодержащих добавок на костную массу и маркеры костного метаболизма [8].

Предложено использовать в качестве добавки в кальций-фосфатное покрытие (КФП) германий, наиболее близкий к кремнию по химической структуре и обладающий при этом более широким спектром биологических эффектов. В литературе приведены доказательства противоопухолевого, гемопоэтического, бактериостатического влияния германия на организм, а также его способность стимулировать пролиферацию фибробластов [9]. Экспериментально доказано, что композиционные покрытия на основе германий-модифицированного ГАП усиливают сцепление имплантатов с костной тканью и стимулируют процессы регенерации [10, 11].

Один из наиболее перспективных методов формирования КФП – микродуговой метод, с

помощью которого получают пористые покрытия, обладающие высокой степенью остеointеграции [12, 13]. Особенностью метода является использование энергии электрических микро-разрядов, которые хаотично передвигаются по обрабатываемой поверхности. Эти микро-разряды оказывают на покрытие и электролит плазмохимическое и термическое воздействие. Толщина покрытий может достигать 80–100 мкм. Исследование свойств покрытий, сформированных микродуговым методом, представляется актуальным и имеет как фундаментальное, так и прикладное значение.

Цель настоящей работы – сравнительный анализ отклика организма на кальций-фосфатные покрытия без модификаций и модифицированные германием.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методика получения покрытий

Экспериментальные пластины размерами $35 \times 5 \times 2$ мм были изготовлены из сплава ВТ-6. Подготовку поверхности имплантатов осуществляли обезжириванием щелочным раствором и химическим травлением в смеси HNO_3 и HF до снятия оксидной пленки с поверхности пластин. После многократной промывки в дистиллированной воде на имплантаты наносили покрытия микродуговым методом [12, 13]. Раствор электролита барботировали инертным газом для формирования качественных покрытий. Таким образом было сформировано три группы покрытий с размерами частиц от 20 нм до 400 мкм в водном растворе ортофосфорной кислоты H_3PO_4 (15 мас. %) и ГАП (9 мас. %):

- 1) без добавления в раствор электролита нанодисперсного порошка оксида германия (II) GeO (I группа);
- 2) с добавлением в раствор электролита нанодисперсного порошка GeO (1 мас. %) (II группа);
- 3) с добавлением в раствор электролита нанодисперсного порошка GeO (5 мас. %) (III группа).

Методы исследования

Исследование микроструктуры поверхности изготовленных образцов и анализ химического состава покрытия проводили в лаборатории электронной микроскопии Регионального центра зондовой микроскопии коллективного пользования Рязанского государственного радиотехнического университета с помощью растрового электронного микроскопа JSM-6610LV (Jeol, Япония) с

рентгеновским энергодисперсионным анализатором Inca X-Max20 (Oxford Instruments, Великобритания).

Исследования остеинтеграции имплантатов с покрытиями проводили на 29 беспородных кошках мужского пола в возрасте от 1.5 до 4 лет массой 2500–3400 г. Содержание животных и уход за ними осуществляли в соответствии с требованиями “Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях” (Страсбург, 18 марта 1986 г.), методических рекомендаций по содержанию лабораторных животных в вивариях научно-исследовательских институтов и учебных заведений, приказа Минздрава СССР от 12.08.1977 г. № 755 и “Всемирной декларации прав животных” от 23.09.1977 г. Операции проводили под внутримышечным наркозом золетилом в дозировке 15 мг/кг с предварительной медикаментозной подготовкой атропина сульфатом в дозировке 0.04 мг/кг и 0.2 % раствором рометара в дозировке 0.1 мл на 100 г массы тела. В верхней трети тазовой конечности разрежали кожу и подлежащие ткани с открытием межвертельной ямки, где сверлом диаметром 4 мм высверливали канал длиной 20 мм в дистальном направлении бедренной кости. С помощью импактора в канале устанавливали штифт. Аналогичное хирургическое вмешательство проводили на противоположной задней конечности, после чего раны послойно ушивали.

Через 90 сут животных выводили из опыта с соблюдением правил и рекомендаций ветеринарной и биомедицинской этики. На основе проксимальных отделов бедренных костей подготавливали поперечные пластины толщиной 5 мм, которые затем декальцинировали, обезвоживали в растворах этанола и просветляли в ксилоле. Материал заливали пластифицированным парафином и нарезали микропомом. Гистологические срезы толщиной 7–10 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и исследовали методом световой микроскопии на микроскопах Carl Zeiss AXIO Observer.A1m (Германия) и “ЛОМО Биолам И” (Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На микрофотографиях, полученных методом растровой электронной микроскопии, видно, что покрытие на имплантатах I группы представляет собой рельефную структуру, состоящую из полых сферолитоподобных глобул фосфатов кальция с размерами ~ 10–40 мкм (рис. 1, а).

Покрытия имплантатов II и III групп представляют собой аналогичную рельефную структуру фосфатов кальция со значительной деформацией глобул, в пространствах между которыми появляются частицы вытянутой формы, локализующиеся на поверхности. Во II группе имплантатов частицы имеют размеры $(2-3) \times (5-10)$ мкм (см. рис. 1, б). В III группе имплантатов размеры этих частиц несколько больше и составляют $(2-5) \times (5-20)$ мкм (см. рис. 1, в). Анализируя микрофотографии поверхности имплантатов II и III группы, можно сделать вывод о неравномерном распределении частиц вытянутой формы. Видно, что увеличение содержания германия оказывает существенное влияние на морфологию поверхности покрытия.

Элементный состав покрытий оценивался по данным энергодисперсионных спектров на участках между глобулами. Согласно полученным данным (табл. 1), во II и III группах имплантатов содержится германий – 0.4 и 2.5 мас. % соответственно. Можно предположить, что он частично восполняет дефицит кальция в покрытии.

Результаты гистологических исследований показали, что кальций-фосфатный материал I группы имплантатов (рис. 2, а) представляет собой фрагменты трубчатой кости со скоплениями молодых костных балок на ее внутренней поверхности. Гаверсовы каналы, сформированные костными балками, имеют прерывистый неравномерный слой мелкозернистого базофильного вещества, что указывает на начальное включение материала в регенерирующую костную ткань.

Кальций-фосфатный материал с содержанием германия 0.4 мас. % (II группа имплантатов, см. рис. 2, б) характеризуется более явными изменениями, сопутствующими перестройке и биологической резорбции молодой костной ткани. Слой мелкозернистого базофильного вещества обнаружен на всей внутренней поверхности трубчатой кости и включен во внутреннюю поверхность гаверсовых каналов. Наружная часть трубчатой кости представляет собой зрелую костную ткань.

На рис. 3 представлен кальций-фосфатный остеопластический материал с максимальным из исследованных содержанием германия на поверхности новообразованной костной трабекулы. На поверхности кости имеются массивные наложения крупнозернистых фрагментов композитного покрытия, которые интегрированы без соединительнотканых прослоек непосредственно в костный матрикс новообразованных трабекул

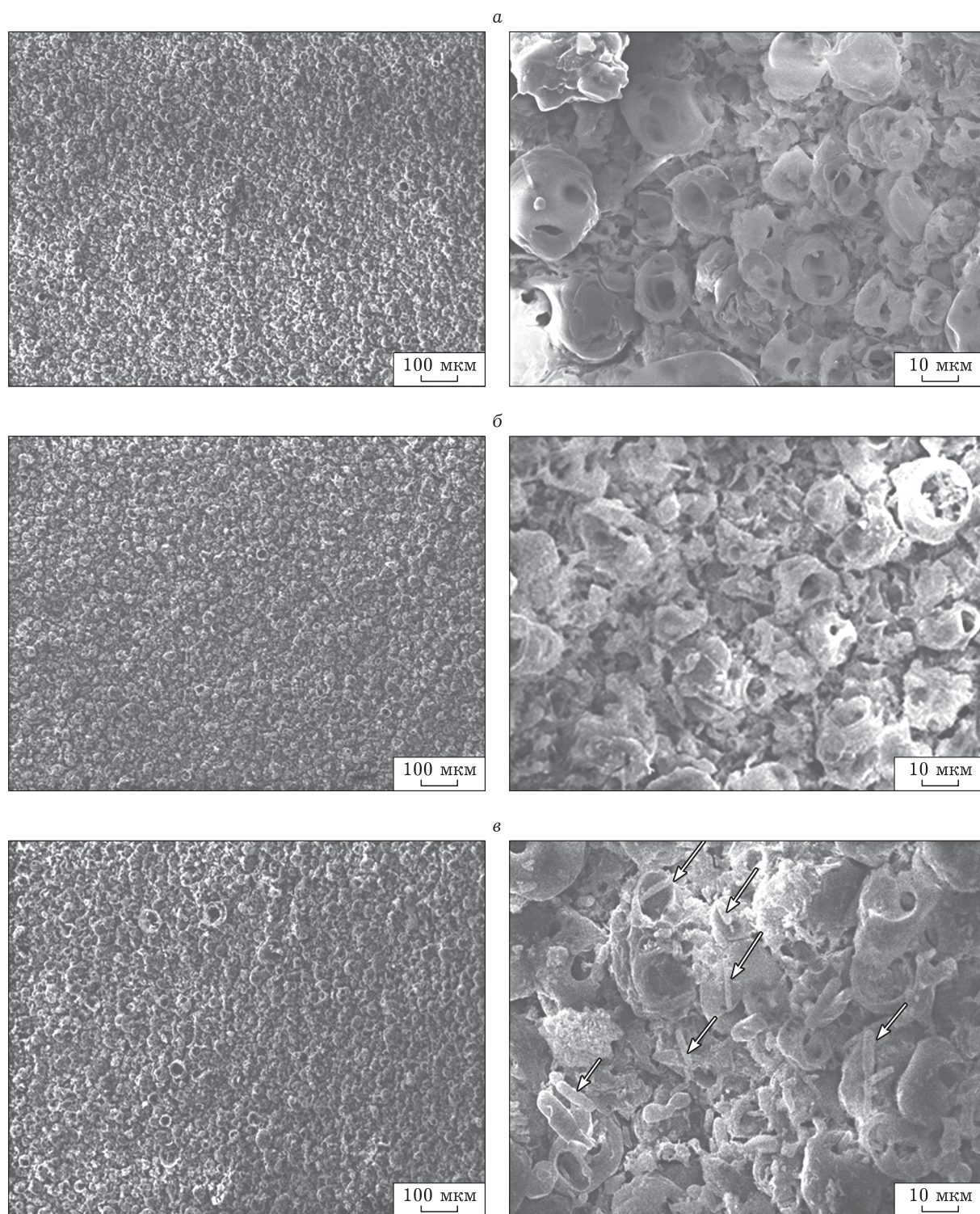


Рис. 1. Микрофотографии поверхности имплантатов I (а), II (б) и III (в) групп. Стрелками показаны вытянутые частицы, содержащие германий.

ретикулофиброзной костной ткани. Остеоциты этих балок расположены неупорядоченно, что указывает на продолжающийся рост и ремоделирование костной ткани. Молодые фибробласты находятся в толще материала покрытия.

Полученные данные свидетельствуют в пользу полной остеоинтеграции материала, что подтверждает наши предположения о целесообразности введения германия в состав покрытия для стимуляции пролиферации фибробла-

ТАБЛИЦА 1

Элементный состав покрытий на имплантатах трех групп

Группа имплантатов	Состав электролита, (мас. %)	Содержание элементов, мас. %					
		O	P	Ca	Ge	Al	K
I	H_3PO_4 (15) + ГАП (9)	57.6	28.4	12.5	Отс.	1.3	0.2
II	H_3PO_4 (15) + ГАП (9) + Ge (1)	56.0	25.4	16.9	0.4	1.0	0.3
III	H_3PO_4 (15) + ГАП (9) + Ge (5)	54.4	24.7	17.1	2.5	1.0	0.3

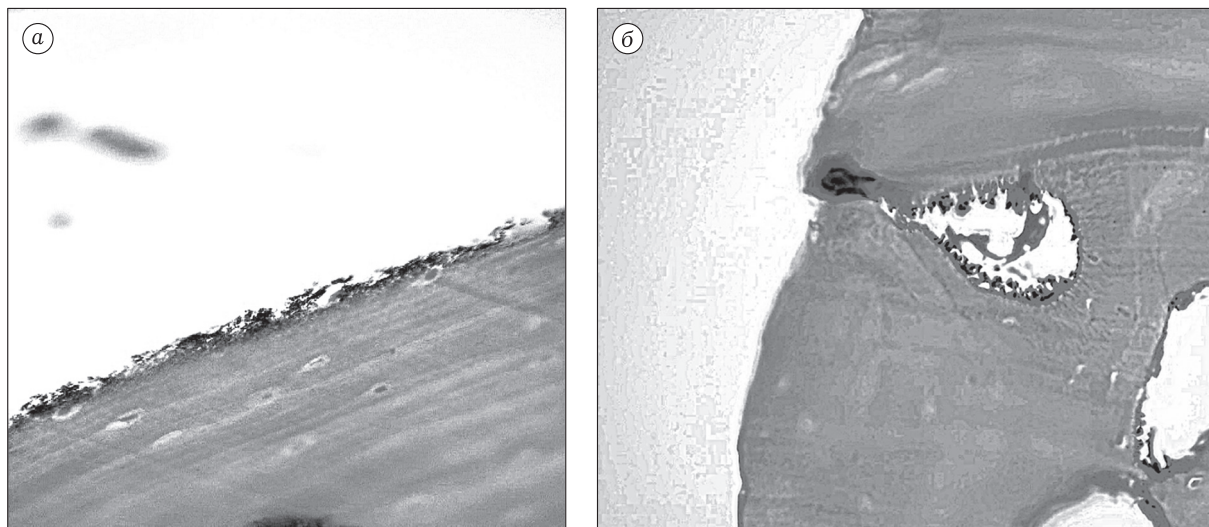


Рис. 2. Внутренняя поверхность трубчатой кости с неравномерным слоем мелкозернистого базофильного вещества (имплантат I группы) (а); включение мелкозернистого базофильного вещества во внутреннюю поверхность гаверсовых каналов трубчатой кости (имплантат II группы) (б). Ув. 150.

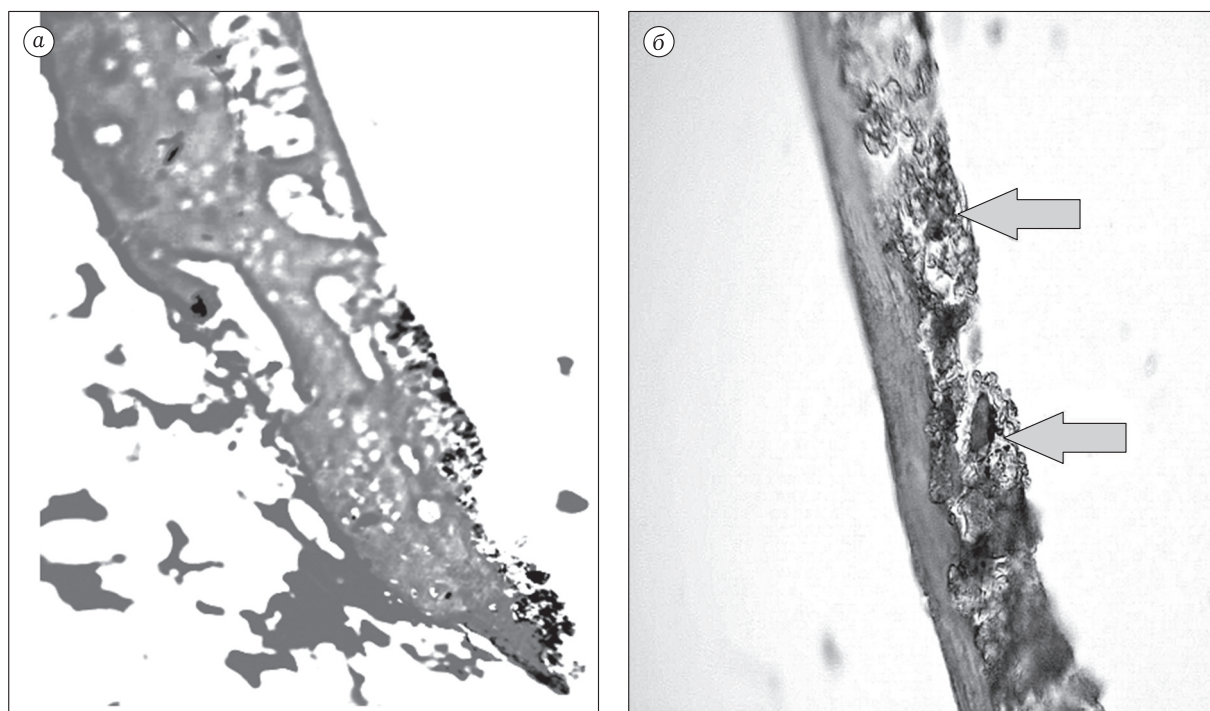


Рис. 3. Кальций-фосфатный остеопластический материал с содержанием германия 2.5 мас. % на поверхности новообразованной костной трабекулы при ув. 200 (а) и 400 (б).

стов. Введение германия активизирует процесс остеointеграции.

Лучшие характеристики биологического отклика у имплантатов с покрытиями III группы (среднее число клеток, пролиферативная активность, морфология клеток) свидетельствуют о более высоких значениях свободной поверхностной энергии для данной группы имплантатов в сравнении с имплантатами I и II групп. Полученные данные согласуются с результатами исследований, подтверждающими, что параметр свободной поверхностной энергии, являющийся фундаментальной характеристикой поверхностных свойств материалов, оказывает существенное положительное влияние на адгезию фибробластов, скорость пролиферации клеток и клеточную активность [14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Введение германия в состав КФП оказывает существенное влияние на структуру данного покрытия. Проведенные гистологические исследования показывают целесообразность введения германия в состав КФП для стимуляции клеточной пролиферации. Установлено, что наиболее интенсивно процесс остеointеграции протекает в области имплантатов с покрытиями, содержащими 2,5 мас. % германия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Еськин Н. А., Андреева Т. М. Состояние специализированной травматолого-ортопедической помощи в Российской Федерации // *Вестн. травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова*. 2017. № 1. С. 5–12.
- 2 Ардашев С. А., Ахтямов И. Ф., Гильмутдинов И. Ш. Тотальное эндопротезирование тазобедренного сустава у пациентов с повышенным индексом массы тела и ожирением // *Вестн. травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова*. 2018. № 2. С. 63–70.
- 3 Баринов С. М., Комлев В. С. Биокерамика на основе фосфатов кальция. М.: Наука, 2005. 204 с.
- 4 Баринов С. М. Керамические и композиционные материалы на основе фосфатов кальция для медицины // *Успехи химии*. 2010. № 79 (1). С. 15–32.
- 5 Булгаков В. Г., Гаврюшенко Н. С., Шальнев А. Н., Цепалов В. Ф. Трибохимический компонент развития окислительного стресса при имплантации искусственных суставов. Часть 1. Определение радикалообразующей способности частиц износа различных ортопедических материалов // *Вестн. травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова*. 2010. № 1. С. 44–48.
- 6 Булгаков В. Г., Ильина В. К., Гаврюшенко Н. С., Шальнев А. Н., Омельяненко Н. П. Трибохимический компонент развития окислительного стресса при имплантации искусственных суставов. Часть 2. Проокислительный и антипролиферативный эффект частиц износа ортопедических материалов // *Вестн. травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова*. 2010. № 3. С. 29–33.
- 7 Ковалева Е. С. Сравнительный анализ биоактивности материалов. // *Поверхность. Рентген, синхротрон. и нейтрон. исслед.* 2007. № 11. С. 72–75.
- 8 Скрипникова И. А., Гурьев А. В. Микроэлементы в профилактике остеопороза: фокус на кремний // *Остеопороз и остеопатии*. 2014. № 2. С. 36–40.
- 9 Лукевич И. Я., Гар Т. К., Игнатович Л. М. Биологическая активность соединений германия. Рига: Знание, 1990. 191 с.
- 10 Назаров Е. А., Кузьманин С. А. О некоторых биоактивных покрытиях имплантатов (обзор литературы) // *Росс. медико-биолог. вестн. им. акад. И. П. Павлова*. 2016. Т. 24. № 1. С. 149–154.
- 11 Кузьманин С. А., Назаров Е. А., Веснов И. Г. Экспериментальное исследование сил сцепления композиционного материала из фосфата кальция и германия с костью // *Росс. медико-биолог. вестн. им. акад. И. П. Павлова*. 2016. Т. 24, № 2. С. 92–100.
- 12 Каменчук Я. А., Зеличенко Е. А., Гузеев В. В. Сравнительный анализ свойств кальций-фосфатных и композитных кальций-фосфатных хитозановых покрытий, получаемых методом электрохимического осаждения // *Перспектив. материалы*. 2009. № 6. С. 66–70.
- 13 Каменчук Я. А., Зеличенко Е. А., Гузеев В. В., Дружинина Т. В. Многоуровневое Са-Р-покрытие для остеосинтеза и исследование его свойств при лечении переломов длинных трубчатых костей // *Биотехнология*. 2010. № 5. С. 89–96.
- 14 Вырва О. Е., Зыкова А. В., Сафонов В. И. Модификация поверхностных свойств материалов путем нанесения многослойных покрытий для их применения в ортопедии // *Ортопедия, травматология и протезирование*. 2009. № 4. С. 62–65.