

УДК 57.043, 57.044

ОЦЕНКА БИОСОВМЕСТИМОСТИ КОМПОЗИТА НАНОСТРУКТУРНОГО ГИДРОКСИАПАТИТА КАЛЬЦИЯ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ С УГЛЕРОДНЫМИ НАНОТРУБКАМИ КАК ПЕРСПЕКТИВНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ЭНДОПРОТЕЗИРОВАНИЯ

© И.А. Васюкова, А.А. Гусев, Н.А. Захаров, М.Ю. Сенцов

Ключевые слова: наноструктурный гидроксиапатит; биосовместимость; токсичность. Представлены результаты исследования выявления оптимальной для эндопротезирования модификации наноструктурного гидроксиапатита на основе экспериментальной оценки его биосовместимости.

ВВЕДЕНИЕ

Ученые в течение долгого времени искали материалы, способные восстанавливать или даже заменять поврежденные кости, суставы и зубы. Применялись различные металлы и сплавы, полимеры и керамические материалы. Но организм активно борется с любым вторгшимся в него инородным телом: металлы подвергаются коррозии, а пластмассы разрушаются. Традиционно используемые в медицине металлические и полимерные костные имплантаты вызывают до 10 % осложнений в стоматологии, а риск развития воспаления окружающих тканей в ортопедии достигает 20 % и более [1–2]. По литературным данным, биокерамические покрытия на основе гидроксиапатита способны улучшать взаимодействие поверхности имплантатов с костной тканью, а также стимулировать остеогенез особенно в ранние сроки после операций [3]. *Углеродные нанотрубки* (УНТ) по диаметру близки к коллагеновым волокнам, что делает их идеальной основой для роста кости. Плотность нанотрубок близка к плотности графита, т. е. намного ниже, чем плотность титана или стали, которые применяют для замены кости, а также они чрезвычайно прочные, и их имплантация может не только способствовать регенерации, но и повышать механические свойства поврежденной костной ткани. Углеродные нанотрубки к тому же гибкие и эластичные. Таким образом, налицо все основные свойства опорной структуры кости, а наноструктурный гидроксиапатит (нГА) характеризуется биосовместимостью с тканями человека и не вызывает реакции отторжения, поэтому биомиметические образования композитов из УНТ и нГА предположительно можно считать наиболее перспективным для эндопротезирования.

Однако тесное взаимодействие материала с костной тканью организмов требует выяснения степени его биосовместимости и степени его токсичности для организма в целом. Поэтому целью данного исследования стало выявление оптимальной для эндопротезирования модификации наноструктурного гидроксиапатита на основе экспериментальной оценки его биосовместимости.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биологические апатиты нативных тканей млекопитающих являются основными составляющими (~60 %) костной и зубной тканей и представляют собой наноразмерные (~5–50 нм) кристаллы игловидного габитуса с катионными и анионными замещениями в кристаллической структуре гидроксиапатита кальция $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (ГА) [4]. Стехиометрический нанокристаллический ГА (нГА) представляет собой кристаллохимический аналог неорганической компоненты минерализованных тканей млекопитающих и служит модельным объектом для изучения влияния различных факторов на физико-химические и медико-биологические характеристики неорганической компоненты костной и зубной тканей.

Для исследований были использованы многостенные УНТ «Таунит» производства ООО «НаноТех-Центр» с наружным диаметром 20–70 нм, внутренним диаметром 5–10 нм и длиной 5–10 мкм. НК ГА получали в биомиметических условиях (310 К) в системе $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{--H}_3\text{PO}_4\text{--H}_2\text{O}$ по методике [5], моделирующей процесс биоминерализации. Композиты ГА/УНТ с содержанием УНТ 0,1; 1; 5 вес. % получали по аналогичной методике в системе $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{--H}_3\text{PO}_4\text{--УНТ--H}_2\text{O}$.

ИК спектры (спектрометр Nexus Nicolet, диапазон 4000–400 cm^{-1}) продуктов синтеза (стехиометрического ГА и композитов ГА/УНТ) были типичны для стехиометрического нГА с характерными полосами поглощения, обусловленными основными структурными группировками ГА. Результаты химического спектрального анализа (сканирующий электронный микроскоп CamScanS4, микроанализатор Linc Analytical) свидетельствуют об однородности продуктов синтеза (рис. 1).

Незначительные включения Mg были обусловлены, по-видимому, примесями, вносимыми УНТ. По данным химического и термического (термоанализатор NETZSCH Simultaneous Thermal Analyser STA 409) анализов, полученные продукты синтеза содержали адсорбированную воду, а содержание углерода в композитах ГА/УНТ незначительным образом отличалось от его содержания в исходных продуктах синтеза (табл. 1).

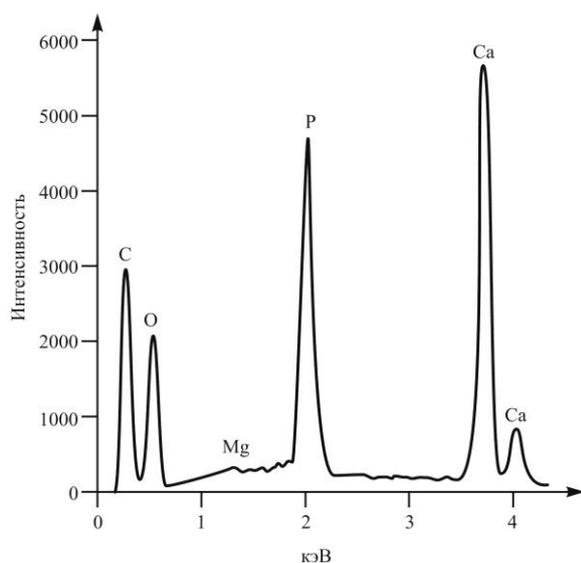


Рис. 1. Результаты химического спектрального анализа однородных образцов композитов ГА/УНТ, содержащих 0,1 вес. % УНТ

По данным просвечивающей электронной микроскопии (электронный микроскоп JEOL JEM 1210), в ходе синтеза композитов ГА/УНТ на неоднородностях поверхности УНТ (рис. 2а) происходит образование НК ГА (рис. 2б) в виде частично ориентированных агломератов НК ГА (рис. 2в).

С ростом концентрации УНТ в композите (рис. 3а) увеличивается разупорядоченность нГА в агломератах, проявляющаяся в появлении «муаровой бахромы» на картинах дифракции электронов (рис. 3б).

Результаты рентгеновского анализа порошкообразных продуктов синтеза (автоматизированный дифрактометр ДРОН-4, CuK_α -излучение, графитовый монохроматор, управляющая программа EXPRESS, модифицированный полнопрофильный анализ, оценка размеров блоков Коши (D_{hkl})) свидетельствуют об образовании в ходе синтеза однофазного стехиометрического НК ГА гексагональной сингонии, пр. гр. $R6_3/m$ (0 % УНТ) либо композитов ГА/УНТ, содержащих стехиометрический нГА и УНТ (0,1; 1; 5 вес. %) (табл. 1). Вдоль оси «с» нГА удлинены и имеют размеры и кристаллографические характеристики, близкие к таковым

для нанокристаллических апатитов нативной кости [4]. Параметры элементарной ячейки синтезированного ГА близки по значениям к табличным данным (JCPDS, № 9–432).

Исследуемые материалы подвергали стерилизации сухим жаром в сушильном шкафу при температуре 180 °С в течение 20 мин., после чего для сохранения стерильности их упаковывали для стерилизации в бумажные пакеты, запаянные методом термосварки. Затем непосредственно перед введением тест-объектам из сухого вещества готовилась суспензия, содержащая наноструктурный гидроксиапатит, после чего она подвергалась ультразвуковому методу стерилизации (характеристики: ультразвуковая частота – 42 kHz, время стерилизации – 3 мин.).

Прежде чем начать эксперименты по выявлению острой токсичности, были проведены опыты по определению LD_{50} (средняя смертельная (летальная) доза токсического вещества) [6–10].

Эксперимент по определению острой токсичности проводился в двух параллельных экспериментах: при внутрибрюшинном и пероральном введении самцам нелинейных лабораторных мышей исследуемого материала.

Для каждой части данного исследования формировались по девять разновозрастных групп животных (экспериментальные и одна контрольная группы), состоящие из 6 половозрелых нелинейных самцов лабораторной мыши каждая. На протяжении всего эксперимента все животные содержались в стандартных условиях (ГОСТ Р50258-92) при соблюдении десятидневного карантина. Для выявления токсического эффекта анализировалось общее состояние животных, особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности, наличие и характер судорог, координации движений, тонус скелетных мышц, размер зрачка, положение хвоста, потребление корма и воды [7–14]. Наблюдение проводилось ежедневно в течение 14 дней с момента введения тестируемого вещества. Каждый материал исследовался в двух концентрациях (0,25 и 0,025 мг/кг), в качестве контроля использовали физиологический раствор. В первом случае введение материала производилось однократно с помощью внутрижелудочного зонда, количество вводимого раствора – 1 мг/мышь, во втором случае – выполнялась однократно инъекция исследуемого материала, количество вводимого раствора – 1 мг/мышь.

Таблица 1

Кристаллографические и морфологические характеристики нанокристаллического стехиометрического ГА: нГА (0 % УНТ) и нанокompозиты ГА/УНТ (0,1; 1; 5 % УНТ)

Номер образца	Содержание УНТ в исходных продуктах синтеза, вес. %	Параметры элементарной ячейки, Å		Размер блоков Коши кристаллов ГА, нм*		Брутто-формула продуктов синтеза (по данным химического и термического анализов)
		<i>a</i>	<i>c</i>	<i>C</i>	⊥ <i>C</i>	
1	0	9,421	6,888	39	22	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
2	0,1	9,414	6,876	37	19	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \cdot 0,08\text{C} \cdot 8\text{H}_2\text{O}$
3	1	9,414	6,886	35	17	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \cdot 0,8\text{C} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
4	5	9,419	6,885	27	15	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \cdot 4\text{C} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Примечание: * Размер кристаллов ГА в стехиометрическом нГА (1) и композитах ГА/УНТ (2–5) параллельно (|| *C*) и перпендикулярно (⊥ *C*) кристаллографической оси «с» ГА.

Работу с животными проводили с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС). Через 14 дней все тест-объекты были вскрыты для выявления возможных патологий внутренних органов и выявления очагов воспаления [7, 13]. Мышей выводили из эксперимента под эфирным наркозом и забивали путем декапитации в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенных экспериментов вычислить LD_{50} (средняя смертельная (летальная) доза токсического вещества) не удалось, что свидетельствует о низкой токсичности испытуемых наноматериалов.

В течение 14 дней после введения исследуемых веществ фиксировали характерные показатели острой токсичности (табл. 2).

Согласно предварительным результатам проведенных исследований, ни одна из модификаций в исследуемых дозах острого токсического эффекта не оказала, что свидетельствует о хорошей биосовместимости тестируемых материалов. При патоморфологическом исследовании не было выявлено никаких статистически значимых изменений относительной массы внутренних органов (сердца, печени, почек, селезенки, легких), а также не было выявлено никаких видимых патологий. В качестве примера представлены органы контрольного (рис. 4а) и экспериментального (рис. 4б) животного (из группы, получающей нанокompозит ГА/УНТ (5 вес. %) в концентрации 0,25 мг/кг).

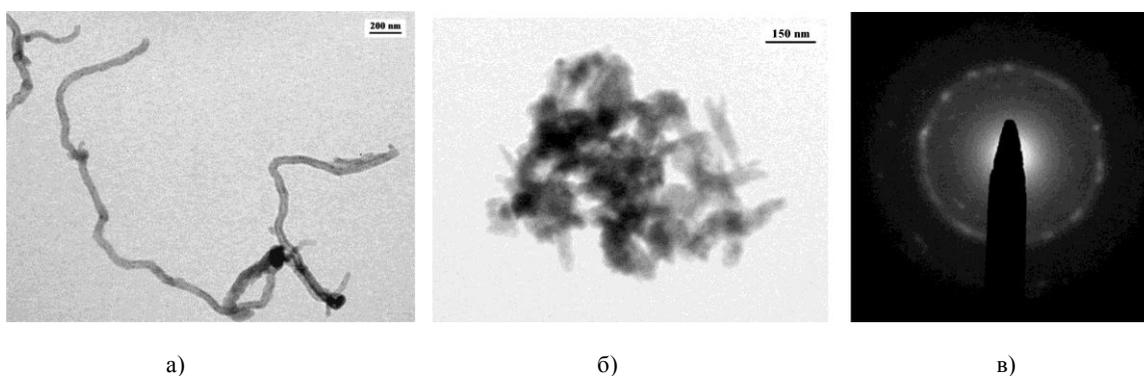


Рис. 2. Данные просвечивающей электронной микроскопии для УНТ и образцов композитов ГА/УНТ с содержанием УНТ 0,1 вес. % (а, б) и типичная картина дифракции электронов образца композита ГА/УНТ с содержанием УНТ 0,1 вес. % (в)

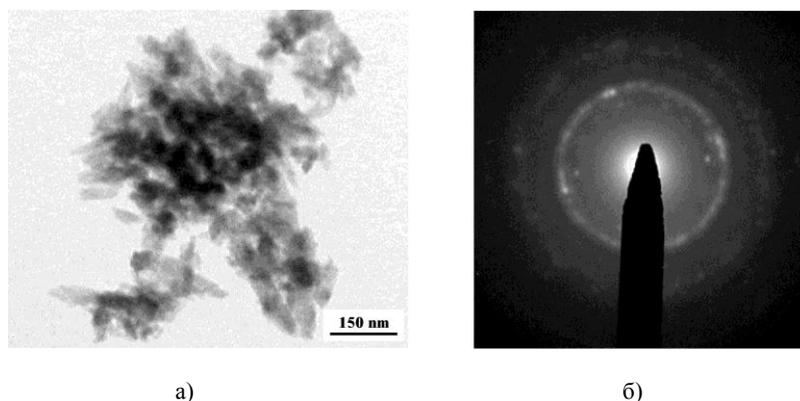


Рис. 3. Данные просвечивающей электронной микроскопии для композита ГА/УНТ (а) и типичная картина дифракции электронов композита ГА/УНТ с содержанием УНТ 1 вес. % (б)

Таблица 2

Показатели острой токсичности, контролируемые на протяжении эксперимента

Показатель	Контроль	Эксперимент
Летальный исход	–	–
Общее состояние животного	Норма	Норма
Особенности поведения	Не выявлены	Не выявлены
Подвижность	Норма	Норма
Судороги	Не наблюдались	Не наблюдались
Потребление корма и воды	Норма	Норма
Тонус скелетных мышц, размер зрачка, положение хвоста	Норма	Норма

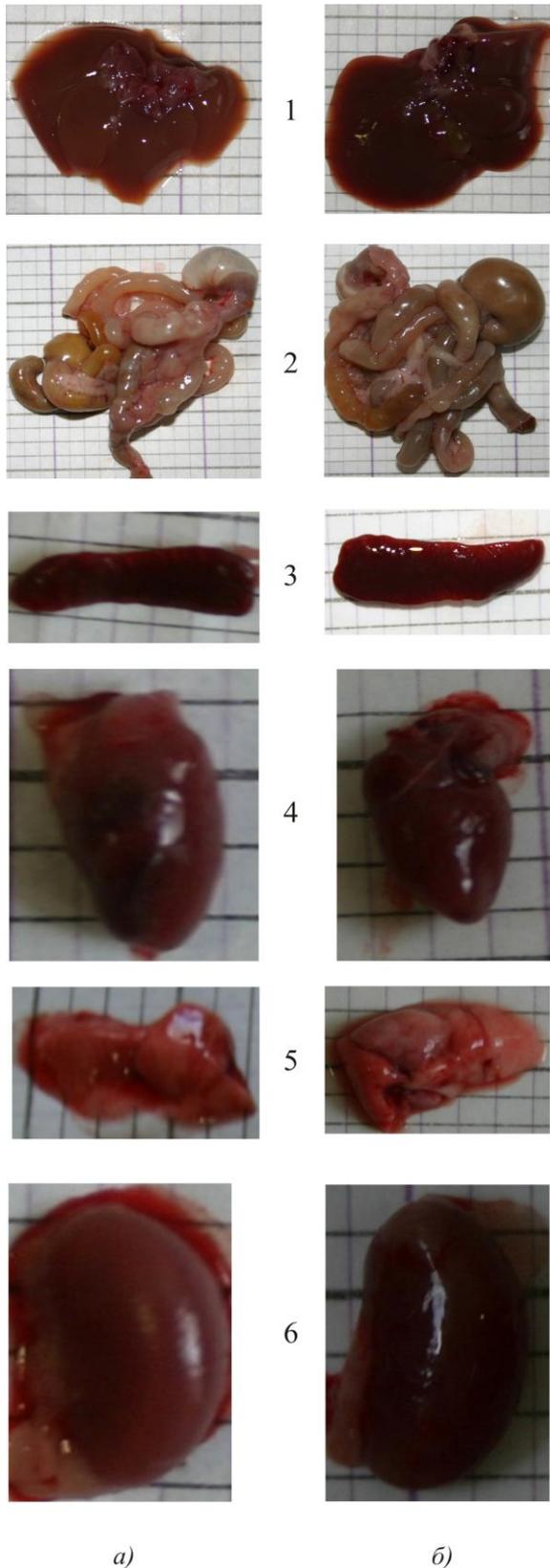


Рис. 4. Органы животных (1 – печень; 2 – ЖКТ; 3 – селезенка; 4 – сердце; 5 – легкие; 6 – почка) из контрольной (а) и экспериментальной (б) групп

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании вышесказанного можно сделать следующие *выводы*.

1. Тестируемые образцы не оказывают острого токсического действия на тест-объекты при пероральном и внутривентральном введении ни в одной из исследуемых дозировок.

2. Согласно предварительным результатам все представленные модификации могут быть признаны безопасными.

3. Для эндопротезирования наиболее перспективным предлагаем считать композит из многостенных углеродных нанотрубок и наноструктурного гидроксиапатита.

4. Для применения исследуемых материалов *in vivo* необходимо тестирование на его биосовместимость и возможную токсичность в хроническом эксперименте.

Несмотря на значимость полученных результатов, данное исследование не может дать полной информации о биосовместимости гидроксиапатита. Требуется провести исследования по изучению хронической токсичности различных модификаций гидроксиапатита, т. к. возможно неблагоприятное кумулятивное действие композита, а в перспективе – моделирование имплантаций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Загородний Н.В., Ильин А.А., Карпов В.Н. [и др.] Титановые сплавы в эндопротезировании тазобедренного сустава // Вестник травматологии и ортопедии. 2000. № 2. С. 73-76.
2. Нузжин В.И., Троценко В.В., Попова Т.П., Каграманов С.В. Ревизионное эндопротезирование тазобедренного сустава // Вестник травматологии и ортопедии. 2001. № 2. С. 66-71.
3. Yoshikawa H., Tamai N., Murase T., Myoui A. Interconnected porous hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering // J. R. Soc. Interface. 2009. V. 6. Suppl. 3. P. 341-348.
4. Dorozhkin S.V. Calcium orthophosphates // J. Mater. Sci. 2007. V. 42. P. 1061-1095.
5. Захаров Н.А., Сенцов М.Ю. Взаимодействие гидроксиапатита кальция и метилцеллюлозы при их совместном осаждении // Сорбционные и хроматографические процессы. 2011. Т. 11. № 2. С. 177-184.
6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению фармакологических веществ / под общ. ред. Р.У. Хабриева. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ОАО «Изд-во «Медицина», 2005. 832 с.
7. Жаров А.В., Иванов И.В., Стрельников А.П. Вскрытие и патоморфологическая диагностика болезней животных / под ред. А.В. Жарова. М.: Колос, 2000. 400 с.
8. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия фармакологических средств / под общ. ред. Б.А. Курляндского (РРПОХБВ). М., 1997.
9. Методы определения токсичности и опасности химических веществ (токсикометрия) / под ред. И.В. Саноцкого. М.: ОАО «Изд-во «Медицина», 1970.
10. Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов: метод. указания. М.: ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2009. 43 с.
11. Оценка безопасности наноматериалов: метод. рекомендации. М.: ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2007.
12. Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов. М.: ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2010. 123 с.

13. Порядок отбора проб для характеристики действия наноматериалов на лабораторных животных: метод. указания. М.: ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2010.
14. Методические рекомендации по выявлению наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека. М.: ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2009. 35 с.

БЛАГОДАРНОСТИ: Исследование выполнено при финансовой поддержке Минобрнауки РФ и Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере.

Поступила в редакцию 14 октября 2012 г.

Vasyukova I.A., Gusev A.A., Zakharov N.A., Sentsov M.Y.
EVALUATION OF BIOCOMPATIBILITY OF NANOSTRUCTURED CALCIUM HYDROXYAPATITE COMPOSITE $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ WITH CARBON NANOTUBES AS A PROMISING MATERIAL FOR ARTHROPLASTY

The results of the study to determine the optimal replacement modified nanocrystalline hydroxyapatite-based experimental evaluation of its biocompatibility are presented.

Key words: nanostructured hydroxyapatite; biocompatibility; toxicity.