КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ ИМПЛАНТАЦИОННЫХ КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Талашова И. А., Силантьева Т. А.

Федеральное государственное учреждение науки Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия имени академика Г. А. Илизарова Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», г. Курган «Учёные России» - <u>http://www.famous-scientists.ru</u>

В лаборатории биохимии ФГУН «РНЦ «ВТО» им. акад. Г. А. Илизарова Росздрава» разработаны имплантационные материалы на основе кальцийфосфатных соединений, выделенных из костной ткани крупного рогатого скота. Технология получения материалов для имплантации включает в себя деминерализацию костной ткани с применением хлороводородной кислоты, осаждение из раствора кальцийфосфатных соединений, их очистку, высушивание и измельчение.

Изучен качественный и количественный состав полученных материалов с применением сканирующей электронной микроскопии, инфракрасной спектроскопии и метода рентгеновского электронно-зондового микроанализа. Установлено, что материалы представляют собой порошкообразные смеси с включениями гранул диаметром от 100 до 2000 мкм. В состав материалов входят остеотропные элементы кальций, фосфор, магний, сера, которые однородно распределены в материале.

Введение

Одним из актуальных вопросов современной медицины является поиск материалов, пригодных для имплантации при необходимости возмещения дефектов костной ткани. В этом качестве широко применяются имплантаты на основе различных кальцийфосфатных соединений (гидроксиапатит, β -трикальцийфосфат). В настоящее время наиболее интенсивно развивается направление создания биодеградирующих имплантационных материалов, замещающихся новообразованной костной тканью.

Учитывая различную механическую нагрузку на отдельные участки кости, необходимо применять материалы для имплантации с соответствующей скоростью резорбции [2]. Известно, что скорость биодеградации зависит от состава имплантационного материала, а в частности, от содержания в нем кальция и фосфора, а также соотношения количества этих элементов в материале [8]. В связи с этим было проведено исследование качественного и количественного состава имплантационных материалов, разработанных в лаборатории биохимии ФГУН «РНЦ «ВТО» им. акад. Г. А. Илизарова Росздрава» [5].

Материалы и методы исследования

Экспериментальными материалами исследования являлись имплантационные материалы на основе кальцийфосфатных соединений (КФС), выделенных из костной ткани крупного рогатого скота (КРС) с использованием: 1) слабого раствора (0,5 N) хлороводородной кислоты и насыщенного раствора гидроксида натрия (КФС I); 2) слабого раствора (0,5 N) хлороводородной кислоты, насыщенного раствора гидроксида натрия и раствора карбамида (КФС II); 3) концентрированного раствора (6 N) хлороводородной кислоты и раствора гидроксида кальция (КФС III) [9].

Для определения качественного состава КФС использовали инфракрасную спектроскопию (ИКС), как метод, широко применяющийся для изучения различных классов биологически важных соединений: аминокислот, пептидов, белков, нуклеиновых кислот и минеральных солей [4]. Исследования проводили следующим образом: в малахитовой ступке смешивали 0,3 г порошка KBr, добавляли 10 мг образца, полученную смесь таблетировали прессованием под давлением 0,98 МПа в течение 0,5 ч при комнатной температуре, лишнюю влагу из таблетки удаляли под вакуумом. Таблетку закрепляли в держателе прибора и проводили инфракрасную спектроскопию на приборе «Инфралюм ФТ-02» фирмы «Люмэкс» (Россия).*

Количественный состав КФС определяли с использованием метода рентгеновского электронно-зондового микроанализа (РЭМА) [6, 7]. Работу проводили на рентгеновском электронно-зондовом микроанализаторе "INKA Energy 200" ("Oxford Instruments Analytical", Великобритания), смонтированном на сканирующем электронном микроскопе "JSM-840" ("JEOL", Япония), при ускоряющем напряжении 20 кэВ и рабочем расстоянии 15 мм. Для стандартизации результатов и обеспечения 98 % точности измерений калибровку прибора проводили ежемесячно по образцу-эталону волластонита (CaO · SiO₂), а коррекцию силы тока по образцу кобальта через каждые 20 минут работы прибора.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием методов непараметрической статистики, применяя U-критерий Манна-Уитни для независимых выборок, поскольку наблюдаемые признаки не подчинялись нормальному распределению [1]. Количество образцов в каждой из трех групп исследуемых материалов n=15, различия между группами наблюдений считались статистически значимыми при вероятности p_u < 0,01. При статистической обработке результатов исследования применяли пакет прикладных программ StatSoft Statistica 6.0. [3], а также программное обеспечения для анализа и обработки данных AtteStat

^{*} Исследования проводились в ОАО «Синтез», г. Курган, с участием специалистов аналитической лаборатории ОТК.

1.0, (И.П. Гайдышев, 2003), разработанное в лаборатории информационновычислительного центра ФГУН «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова Росздрава».

Результаты и их обсуждение

По результатам ИК-спектроскопии установлено, что вещество КФС I (рис. 1) характеризуется наличием полос поглощения различной интенсивности в областях волновых чисел, которые говорят о следующем: в данном соединении имеются группы (PO₄)²⁻ (полосы поглощения при волновых числах 550-630 см⁻¹, 1000-1120 см⁻¹); гидроксильные группы – ОН (для них характерны полосы поглощения при 1594 см⁻¹, 3250-3600 см⁻¹); карбонат-ионы – СО3²⁻ (полосы поглощения при волновых числах 850-900; 1370-1450 см⁻¹); карбоксильные группы - СОО - (полосы поглощения при 1600 см⁻¹ и 1400 см⁻¹); амиды – (при 1650 см⁻¹, 3000-3500 см⁻¹). Следовательно, данный образец представляет собой фосфатное соединение кальция с примесями в виде небольшого количества карбонатов (невысокая интенсивность полос поглощения) и белковых соединений, представленных в довольно большом количестве. По нашему мнению, это костные неколлагеновые белки, соосадившиеся вместе с минеральными солями кальция.

При анализе ИКС КФС II установлено (рис. 2), что, в отличие от ИКС КФС I, здесь отсутствует полоса поглощения, свойственная веществам белковой природы, интенсивность полосы поглощения карбонат-ионов немного меньше, а полосы поглощения, характерные для фосфатов кальция, представлены линиями сильной интенсивности. Исходя из этих данных, можно сказать, что соединение, полученное по технологии II, очищено от костных белков и имеет в своем составе небольшое количество примесей в виде карбонатов кальция.

При исследовании ИКС КФС III (рис. 3) можно сделать вывод о том, что КФС III отличается от КФС I и КФС II тем, что в нем в большей степени присутствуют карбонат-ионы, а полосы поглощения амидных групп отличаются невысокой интенсивностью в отличие от ИКС КФС I.



Рис. 1. Инфракрасный спектр КФС І



Рис. 2. Инфракрасный спектр КФС II



Рис. 3. Инфракрасный спектр КФС III

Таким образом, проанализировав ИКС соединений КФС I, КФС II и КФС III, можно утверждать, что состав данных соединений напрямую зависит от технологий, применяемых для их выделения из костной ткани КРС. При обработке осажденных из костной ткани фосфатных соединений кальция раствором карбамида и последующей отмывке их дистиллированной водой получаем материал, освобожденный от костных белков. Кальцийфосфатное соединение, полученное с использованием для деминерализации костной ткани 6 N раствора HCl и раствора Ca(OH)₂ для осаждения, обогащено карбонат-ионами.

Так как количественное соотношение кальция и фосфора в имплантационных материалах является одной из определяющих характеристик в способности их к резорбции, необходимо было оценить это соотношение в исследуемых материалах. Для этих целей применяли РЭМА. В ходе исследований получены следующие результаты, представленные в табл.1.

Следует отметить, что концентрации остеотропных элементов кальция и фосфора значимо выше в образце КФС I, а в образце КФС II - превышают значения, полученные для образца КФС III ($p_U < 0,01$). Однако соотношение кальция и фосфора в этих соединениях увеличивается в ряду: КФС III > КФС II > КФС I. Эти результаты позволяют предположить, что полученные материалы по величине скорости резорбции в биологической среде будут располагаться в следующем ряду: КФС I > КФС II > КФС III. Более высокое соотношение Ca/P в составе КФС III можно объяснить тем, что при его получении использовали раствор Ca(OH)₂, который привносит в реакционную среду дополнительно ионы Ca²⁺.

Наименование	Количество	Содержание элементов, %		Соотношение
материала	наблюдений, n	Bec.		Ca/P
		Кальций	Фосфор	
КФС І	15	33,18*	15,71*	2,11
КФС II	15	28,26	12,36#	2,29
КФС III	15	28,07	9,63	2,91
* - значения, статистически значимо отличающиеся от соответствующих значений КФС				
II и КФС III ($p_U < 0,01$); # - значения, статистически значимо отличающиеся от соответ-				
ствующих значений КФС III ($p_{\rm U} < 0.01$).				

Таблица 1 Содержание кальция и фосфора в имплантационных материалах

Данные о содержании кальция и фосфора в исследуемых имплантационных материалах свидетельствуют о том, что материал КФС I наиболее близок по содержанию в нем кальция и фосфора к неорганическому костному матриксу интактных животных, в котором соотношение количества кальция и фосфора составляет 2,15.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Гланц, С. Медико-биологическая статистика : пер. с англ. / С. Гланц. - М.: Практика. - 1998. - 459 с.

2. Островский, А. В. Остеопластические материалы в современной пародонтологии и имплантологии / А. В. Островский // Новое в стоматологии – 1999. - № 6. – С. 39-52.

3. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2002. - 312 с.

4. Современные физические методы в геохимии: учебник / под ред. В. Ф. Барабано-

ва. - Л. : Изд-во Ленинградского ун-та, 1990. - 391 с.

5. Талашова, И. А. Обоснование способов получения имплантационных материалов из костной ткани и сыворотки крови : автореф. дис... канд. биол. наук / И. А. Талашова; ТюмГУ. – Тюмень, 2006. – 24 с.

6. Тронева Н. В. Электронно-зондовый микроанализ неоднородных поверхностей (в свете теории распознавания образов) / Н. В. Тронева, М. А. Тронева. – М.: Металлургия, 1996. – 205 с.

7. Шахламов, В. А. Применение метода рентгеноспектрального локального микроанализа в биологии и медицине / В. А. Шахламов, С. В. Буравков // Архив АЭГ. - 1983. -Т. LXXXIV, № 4. - Режим доступа: http://lab.wolf.ru/Test/Papers/Microanalysis.htm

8. Щепеткин, И. А. Кальцийфосфатные материалы в биологических средах / И. А. Щепеткин // Усп. совр. биологии. – 1995. – Т. 115, Вып. 1. - С. 58-73.

9. Заявка № 2005200254 000267 РФ, МПК⁷ А 61 К 6/033; 35/32; 37/00 Биоимплантат для возмещения дефектов минерализованных тканей и способ его получения / Шевцов В.И., Талашова И.А., Лунева С.Н., Ковинька М.А. (РФ). – Заявл. 11.01.2005.

Qualitative and quantitative composition of calcium phosphate implantation materials Talashova I.A., Silantyeva T.A.

Federal State Establishment of Science Russian Scientific Center "Restorative Traumatology and Orthopraxy named after Academician Ilizarov G.A. of Federal Agency on Public Health Service and Social Development", Kurgan, Russia

In the laboratory of FSIS «RSC «RTO»» there were developed implantation materials on the basis of Ca-P compounds isolated from bone tissue of great cattle. The technology of preparation of materials for implantation includes demineralization of bone tissue using hydrochloric acid, sedimentation of Ca-P compounds, theirs' purge, exsiccation and blending.

Quantitative and qualitative composition of derived materials was investigated using scanning electronic microscopy, infrared spectroscopy and electron X-ray microanalysis. It was evaluated that the materials are presented as powdered mixtures with incls 100-2000 μ m of diameter. The materials include osteotropic elements: calcium, phosphorus, magnesium, sulphur, that are spreaded in the material homogeneously.