

СТРУКТУРА И СВОЙСТВА БИОМАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ МИНЕРАЛЬНОГО КОМПОНЕНТА КОСТНОЙ ТКАНИ

Писарева Е.В.¹, Власов М.Ю.², Волова Л.Т.²

¹ФГБОУ ВПО «Самарский государственный университет», Самара, Россия (443011, Россия, г. Самара, ул. Академика Павлова, 1), e-mail: pella1@rambler.ru;

²ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, «Институт экспериментальной медицины и биотехнологий», Самара, Россия (443079, Россия, г. Самара, ул. Гагарина, 20), e-mail: csrl.sam@mail.ru

Статья посвящена исследованию физико-химического состава минерального компонента костной ткани различных видов животных. Биогенный гидроксиапатит получали по оригинальной методике путем деминерализации костной ткани с последующим осаждением минерального компонента. С помощью комплекса методов электронной микроскопии и атомно-адсорбционного анализа исследовали образцы гидроксиапатита различных видов диких и домашних видов животных, а также человека. Установлено, что в образцах гидроксиапатита кости содержатся микроэлементы, а массовое соотношение кальция и фосфора соответствует их соотношению в нативной костной ткани. Представлены изображения микроструктуры поверхности гидроксиапатита, полученного из костной ткани некоторых животных, и данные энергодисперсионного анализа, отражающие состав образцов.

Ключевые слова: костная ткань, гидроксиапатит, микроэлементы, биоимплантат.

STRUCTURE AND FEATURES OF BIOMATERIALS BASED ON MINERAL COMPONENT OF BONE TISSUE

Pisareva E.V.¹, Vlasov M.Y.², Volova L.T.²

¹Samara State University, Samara, Russia (443011, Samara, st. acad. Pavlova, 1), e-mail: pella1@rambler.ru;

²Samara State Medical University Samara, Russia (443079, Samara, st. Gagarina, 20), e-mail: csrl.sam@mail.ru

The natural mineral component hydroxyapatite was obtained by original method from human and animals bone tissue. It figured out that substance contains 70-80% particles which size less than 100 nm. Qualitative and quantitative analysis of specimens showed the presence of trace elements in same proportion with bone tissue minerals. Hydroxyapatite isolation in different pH level lead to selective precipitation various trace elements which can unspecifically affect on metabolism. By scanning electron microscopy was found that human and animals hydroxyapatite contains calcium and phosphorous in same proportion like in natural bone. The pictures of hydroxyapatite microstructure surface had represented. It submitted that the contribution of data obtained rests on areas of implantology and bone disease prophylaxis.

Keywords: bone tissue, hydroxyapatite, trace elements, bioimplant.

Создание новых костно-пластических материалов является актуальным направлением в стоматологии, травматологии и ортопедии. Однако изучению состава и свойств таких материалов уделяется недостаточное внимание. Применение аллогенных биоактивных кальций-фосфатных материалов (гидроксиапатит, трикальцийфосфат), влияющих на минеральный обмен и обладающих остеоиндуктивностью, имеет преимущества перед искусственными. По сравнению с другими биоматериалами, эти материалы по своему составу идентичны костной ткани млекопитающих и индуцируют биологические реакции, схожие с таковыми при ремоделировании кости. На данный момент в литературе доступен обширный экспериментальный и клинический материал, свидетельствующий об успешном применении как композитных биоматериалов, так и кальций-фосфатной керамики в чистом

виде при лечении пациентов [7]. В то же время недостаточное внимание уделяется возможности использования натуральных минеральных компонентов костной ткани, которые зачастую образуются как отходы при получении деминерализованного костного матрикса.

Одним из важных свойств биоматериалов, определяющих их биосовместимость и способность воздействовать на остеогенный потенциал костных клеток, является соотношение кальция и фосфора. По имеющимся литературным данным, стехиометрическое соотношение указанных элементов в гидроксипатите составляет 1,37, весовое – до 2,15. В аморфном фосфате эти показатели соответственно равны 1,5 и 1,94.

В зависимости от способа получения синтетических и натуральных кальций-фосфатных материалов это соотношение может меняться. В доступной литературе представлены результаты исследований по получению и изучению свойств гидроксипатита различного происхождения [3; 8]. В связи с противоречивостью данных разных авторов важно исследовать соотношение кальция и фосфора как основной критерий биодоступности и биосовместимости имплантационных кальций-фосфатных материалов.

Цель исследования – анализ состава гидроксипатита, полученного путем деминерализации костной ткани животных и человека, с применением сканирующей электронной микроскопии.

Материалы и методы исследования

Аллогенный гидроксипатит из костной ткани человека получали по оригинальной методике, разработанной в ИЭМБ СамГМУ [5]. Этот метод является частью безотходного и экологически безопасного производства имплантатов из биологических тканей. Суть технологии заключается в одновременном получении сразу двух видов биоматериала: деминерализованного костного матрикса и естественного происхождения гидроксипатита, который получается путем осаждения минерального компонента из деминерализующего костную ткань раствора. Предложен способ ультразвуковой дезинтеграции полученных образцов, позволяющий получать материал, состоящий на 70-80% из частиц размером менее 100 нм [6]. На основании этого метода были разработаны модификации для получения гидроксипатита из костной ткани разных видов животных. Были получены образцы биоматериала из компактной и губчатой костной ткани домашних животных (корова, овца), диких животных (лось, кабан), лабораторных животных (кролик, крыса, лягушка), а также различных видов птиц (гусь, курица, индейка, перепёлка).

Качественный состав образцов определяли с использованием энергодисперсионного рентгено-флуоресцентного анализатора БРА-18, количественный анализ проводился с применением классических аналитических методов [1; 2] и атомно-адсорбционного анализа

(«Varian» SpectrAA 200, гидридная приставка VGA 77). Изображение поверхности образцов получали с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6390A, процентный элементный состав анализировали при помощи рентгеновского спектрометра (JEOL).

Результаты исследования и их обсуждение. Количественный анализ минерального состава полученных образцов с применением стандартных аналитических методов показал, что помимо двух основных компонентов – Ca^{2+} и неорганического фосфата, во всех образцах биоматериала содержатся также такие микроэлементы, как магний и железо. Путем качественного анализа выявлено наличие ионов Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} .

Наибольшая концентрация фосфата отмечена в тех видах ГАП из компактной костной ткани, при получении которых использовали фосфатный буфер. При этом соотношение концентраций кальция и фосфора в образцах с добавлением буфера и без него колебалось от 1,34 до 2,00. Следует отметить, что с повышением pH осаждения количество фосфата уменьшалось в тех видах ГАП, которые не обрабатывали фосфатным буфером. Уровень фосфата не зависел от сроков проведения деминерализации. В противоположность данному факту содержание ионов Ca^{2+} несколько уменьшалось в образцах, полученных из раствора второй недели деминерализации костной ткани. Соотношение Ca/P в образцах с добавлением буфера составило от 1,29 до 1,46. Аналогичный показатель для образцов без буфера 1,51-3,05. В целом с повышением концентрации фосфата в образцах содержание Ca^{2+} в них уменьшается. ГАП, выделенный при щелочных значениях, содержит больше Ca^{2+} , чем ГАП, осажденный в нейтральной среде. Поэтому максимальные значения при определении уровня Ca^{2+} зафиксированы нами в тех видах ГАП, которые были выделены из костной ткани человека при щелочных значениях pH без добавления фосфатного буфера.

При определении концентраций ионов Mg^{2+} и Fe^{3+} нами выявлены следующие особенности. Наибольшие значения по Mg^{2+} отмечены в нейтральных образцах с добавлением фосфата, а по Fe^{3+} – в щелочных без добавления последнего. Содержание данных микроэлементов в ГАП не зависит от сроков проведения деминерализации.

В образцах ГАП, полученных из костной ткани крыс, соотношение Ca/P колебалось в пределах от 1,18 до 1,81. При повышении концентрации фосфата содержание Ca^{2+} в образцах уменьшается. В образцах, выделенных при pH 8, содержится больше ионов Ca^{2+} , чем в образцах, полученных при щелочных значениях (pH 12). Содержание ионов Mg^{2+} не зависит от pH осаждения. Обработка фосфатом, напротив, способствует повышению уровня данного элемента в ГАП. В щелочном ГАП нами выявлена бóльшая концентрация Fe^{3+} по сравнению с нейтральными образцами.

Данные состава образцов, полученные с помощью атомно-адсорбционного анализа, свидетельствуют о наличии в составе ГАП кальция, магния, железа, серебра, кобальта, хрома

и цинка в соотношениях, близких к составу минерального компонента кости [4]. Это является немаловажным фактом, поскольку микроэлементы необходимы для нормального протекания многих физиологических и биохимических процессов. Содержание микроэлементов незначительно отличается в образцах ГАП, полученных из костной ткани человека и животных, осаждаемого при разных значениях рН. Однако следует отметить существенное изменение концентрации магния от 1,30 до 2,76 мг/г при изменении условий осаждения с рН 7 до рН 12, аналогичная тенденция выявлена и по содержанию цинка. Таким образом, получение гидроксиапатита при различных значениях рН ведет к избирательному осаждению тех или иных микроэлементов, которые в дальнейшем могут неспецифически влиять на обменные процессы. Это важно в отношении магния, являющегося стимулятором остеогенеза.

При качественном анализе образцов гидроксиапатита, полученного из костной ткани птиц, на энергодисперсионном рентгено-флуоресцентном анализаторе БРА-18 установлено, что такие элементы, как кальций, фосфор, магний, цинк, обнаруживаются в образцах, полученных из компактной и губчатой костной ткани. В образцах, полученных только из губчатой костной ткани, присутствует больший спектр микроэлементов – обнаружены хром, никель, ванадий, селен, алюминий, сера, марганец. Аналогичные изменения прослеживаются и в образцах из костной ткани животных – кальций, фосфор, магний, железо обнаружены во всех материалах. А дополнительные микроэлементы обнаружены в гидроксиапатите из губчатой кости – хром, кобальт, цинк, никель, олово, барий, алюминий и др. Интересно отметить, что в образцах из костной ткани диких животных (кабан, лось, лягушка) обнаружено наличие кадмия, что может быть связано с особенностями среды обитания и питания животных.

На завершающем этапе исследования был проведён количественный анализ состава образцов при помощи сканирующей электронной микроскопии. С помощью электронного микроскопа JEOL JSM-6390A были получены изображения поверхности образцов. По интенсивности линий спектра вторичного квантового излучения определялись концентрации химических элементов. Для интерпретации результатов измерений использовался пакет программ Smile Shot TM системы энергодисперсионного микроанализа.

На рис. 1, 2 представлены изображения микроструктуры поверхности гидроксиапатита, полученного из костной ткани перепёлки и лягушки, и данные энергодисперсионного анализа, отражающие состав образцов, полученные на электронном микроскопе Jeol в комплекте с рентгеновским спектрометром.

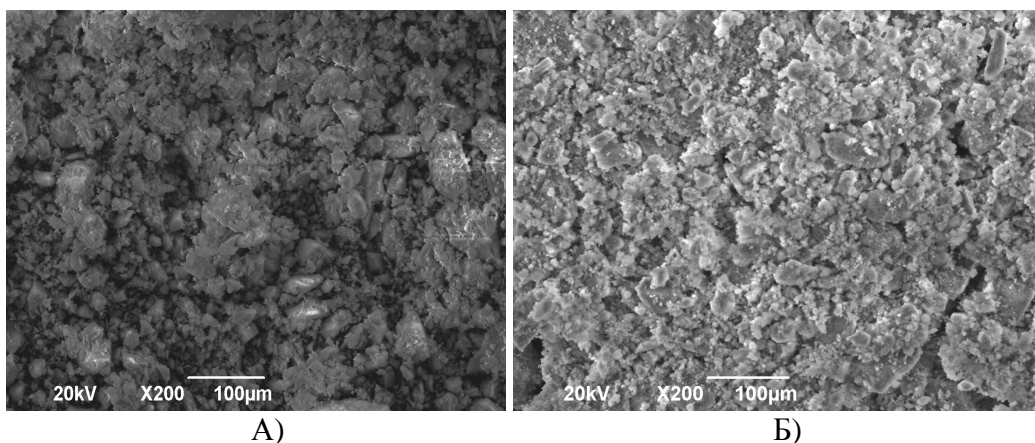


Рис. 1. Изображение поверхности гидроксиапатита компактной костной ткани перепёлки (А) и лягушки (Б), полученное с помощью электронного микроскопа Jeol.

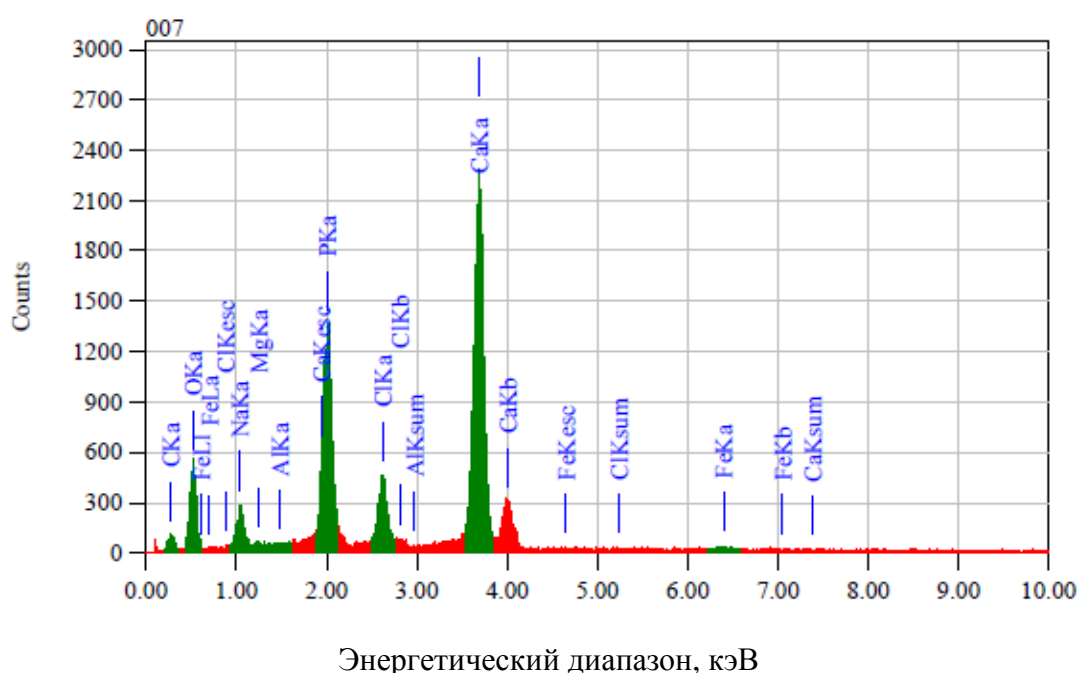


Рис. 2. Данные энергодисперсионного анализа гидроксиапатита костной ткани лягушки (сканирующий электронный микроскоп JEOL JSM-6390A в комплекте с рентгеновским спектрометром)

Основной задачей было исследование в различных образцах атомарного соотношения Са/Р. Для этого прежде всего были исследованы образцы, полученные из компактной костной ткани разных видов животных и человека, поскольку именно из компактной кости отмечается максимальный выход кальция и фосфора, тогда как губчатая – даёт более богатый спектр микроэлементов. Следует отметить, что это соотношение во всех образцах находилось в физиологических пределах и было достаточно близко к эталонному соотношению 1,67. Так, для ГАП из компактной костной ткани человека соотношение составило 1,67, для образцов из компактной кости лося – 1,9, барана – 1,89, кролика – 1,79. У образцов из костной ткани птиц атомарное соотношение Са/Р составило соответственно для

гуся, индейки и перепёлки - 2,02, 1,34 и 1,77. У образцов из костной ткани лягушки показатель оказался самым близким к эталонному соотношению, встречающемуся у человека, и составил 1,66.

Заключение. Проведено комплексное исследование состава гидроксиапатита, полученного из костной ткани человека, разных видов животных и птиц с применением стандартных аналитических методов, рентгено-флуоресцентного и атомно-адсорбционного анализа. Показано, что натуральный гидроксиапатит человека и животных содержит микроэлементы, характерные для костной ткани. Путём энергодисперсионного анализа установлено атомарное соотношение Са/Р в образцах биоматериала. Установлено, что в образцах гидроксиапатита, полученных из компактной костной ткани животных и птиц, это соотношение близко к физиологическому значению, характерному для образцов из компактной костной ткани человека, и колеблется в пределах от 1,34 до 2,02.

Список литературы

1. Вишневская Т.М., Ляшевская Т.Н. Определение содержания кальция в сыворотке крови с помощью мурексид-глицеринового реактива // Лаб. дело. — 1976. — № 7. — С. 444.
2. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. — Минск : Беларусь, 1982. — С. 121—125.
3. Павлова Т.В., Мезенцев Ю.А., Павлова Л.А., Кривецкий В.В., Павлов И.А., Паначев С.В. Морфофункциональное состояние костной ткани при введении коллагеново-гидроксиапатитных нанокомпозитов // Научные ведомости Белгородского государственного университета. — 2009. - № 4 (59). — С. 28—33.
4. Писарева Е.В., Волова Л.Т., Власов М.Ю., Соколовская А.Б. Нанобиоматериал на основе минерального компонента костной ткани // Известия Самарского научного центра РАН. — 2011. — Т. 13. - № 4 (4). — С. 1203-1207.
5. Патент РФ № 2000103451/14, 20.06.01.
6. Патент РФ № 2008124263/14, 20.11.09.
7. Цогоев В.К. Обоснование использования биорезорбируемых средств при непосредственной и ранней отсроченной дентальной имплантации : автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 2007. — 26 с.
8. Lee S.W., Kim S.G., Balazsi C., Chae W.S., Lee H.O. Comparative study of hydroxyapatite from eggshells and synthetic hydroxyapatite for bone regeneration // Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology. — 2012. - Т. 113. - № 3. — P. 348-355.

Рецензенты:

Клёнова Н.А., д.б.н., профессор кафедры биохимии, биотехнологии и биоинженерии ФГБОУ ВПО «СамГУ», г. Самара;

Языкова М.Ю., д.б.н., профессор кафедры биохимии, биотехнологии и биоинженерии ФГБОУ ВПО «СамГУ», г. Самара.