

## Структура и физико-химические механизмы взаимодействия костной ткани с титановыми имплантатами в условиях туберкулезного остита

© О.Н. Мусская,<sup>1</sup> В.К. Крутько,<sup>1</sup> А.А. Гайдаш,<sup>2</sup> А.И. Кулак,<sup>1</sup> Н.С. Чекан,<sup>2</sup> К.В. Скромная,<sup>3</sup>  
М.С. Сердобинцев,<sup>2</sup> А.А. Вишневецкий,<sup>2</sup> Т.И. Виноградова,<sup>2</sup> Е.К. Соколович,<sup>2</sup> П.К. Яблонский<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси,  
220079 Минск, Беларусь

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии,  
191036 Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт физико-химических проблем,  
220030 Минск, Беларусь  
e-mail: musskaja@igic.bas-net.by

Поступило в Редакцию 30 июля 2018 г.

В окончательной редакции 23 октября 2018 г.

Принято к публикации 29 мая 2019 г.

Методами сканирующей электронной микроскопии, рентгенофазового анализа, ИК-спектроскопии и термического анализа исследованы структура и физико-химические механизмы взаимодействия костной ткани с титановыми имплантатами в условиях туберкулезного остита. Установлено, что физиологическая регенерация костной ткани на фоне лечения туберкулезного остита сопровождается ростом органической компоненты, охрупчиванием минеральной фазы костного матрикса и его мелкодисперсным распадом. Наличие титановых имплантатов в условиях физиологической нормы способствует активации синтеза апатитовой фазы в регенерирующей кости. Основным механизмом имплантационного остеогенеза при туберкулезном остите является образование неорганической фазы гидроксиапатита преимущественно в участках разрушения титанового сплава.

**Ключевые слова:** титановые имплантаты, гидроксиапатит, карбонатгидроксиапатит, костная ткань, туберкулезный остит.

DOI: 10.21883/JTF.2019.12.48502.304-18

### Введение

Возникновение костных дефектов в результате травм и протекания ряда заболеваний (остеопороз, остеопорит, сахарный диабет, туберкулезный остит и др.) приводит к необходимости медикаментозного лечения либо полной замены поврежденной костной ткани [1,2]. Как правило, при восстановлении костных дефектов обычно используют биоинертные полимеры [3] и неорганические композиты [4,5], а при обширных повреждениях — металлические имплантаты [6,7]. Применение имплантатов на основе титана и его сплавов для замещения поврежденной костной ткани известно достаточно давно [7–9], что связано с их биоинертностью и прочностью. В настоящее время считается, что остеоинтеграция титановых имплантатов обусловлена оксидной пленкой титана, которая выступает как хемосорбент ионов  $\text{OH}^-$ , повышающих гидрофильность его поверхности, благодаря чему обеспечивается высокая адгезия костной ткани к имплантату [8]. В некоторых случаях наблюдается реакция организма на имплантат, что обусловлено микропримесями (железо, хлор) в технически чистом титане либо легирующими добавками (ванадий, алюминий, цирконий и др.) в титановых сплавах [9]. Кроме того, в патологических условиях может запускаться каскад реакций, активно влияющих

на регенерацию костной ткани. До сих пор особенности остеогенеза, протекающего в области контакта костной ткани и титановых имплантатов на фоне сопутствующих заболеваний, остаются малоизученными. В связи с этим целью настоящей работы являлось изучение структуры и физико-химических свойств регенерирующей костной ткани, контактирующей с титановыми имплантатами, в условиях туберкулезного остита на фоне лечения.

### 1. Объекты и методы исследования

Эксперименты проводили на половозрелых самцах кроликов породы Шиншилла на базе экспериментальной лаборатории Научно-исследовательского института фтизиопульмонологии (Санкт-Петербург). Протоколы экспериментов, включая содержание и способ эвтаназии, согласованы с этическим комитетом Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии и соответствуют Правилам содержания лабораторных животных, утвержденным Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации. Животные были разделены на следующие группы (по 3 особи в каждой): 1) контрольная — здоровые кролики, 2) кролики со смоделированным туберкулезным оститом, 3) кролики с внедренными титановыми имплантатами, 4) кролики со смоделированным туберкулезным оститом и внедрен-

ными титановыми имплантатами. Туберкулезный остит моделировали с помощью введения туберкулезных микобактерий в высверленные отверстия бедренных костей. Противотуберкулезная терапия во 2-й и 4-й группах была проведена по стандартной процедуре.

В качестве исследуемых материалов были использованы образцы эпифизов бедренных костей, вырезанных из области, контактирующей с поверхностью титановых имплантатов марки BT-6 (Ti-6Al-4V) в течение двух месяцев. Животных выводили из эксперимента с помощью летальных доз золетила.

Сканирующую электронную микроскопию (СЭМ) выполняли на микроскопе LEO 1420 (Германия) с энергодисперсионной приставкой для локального элементного анализа (EDAX). Сколы образцов для микроскопии получали в парах жидкого азота с последующей фиксацией в 2.5% глутаровом альдегиде, обезвоживанием в этаноле и напылением золота.

Рентгенофазовый анализ (РФА) образцов костной ткани, высушенных на воздухе до постоянной массы, проводили на дифрактометре ADVANCE D8 (Bruker, Германия) с использованием излучения  $\text{CuK}\alpha$  с длиной волны 1.5405 Å. ИК-спектры образцов регистрировали на спектрометре Tenzor-27 (Bruker, Германия) в диапазоне 400–4000  $\text{cm}^{-1}$ . Образцы для анализа готовили прессованием порошка растертой костной ткани в таблетки с бромидом калия. Относительную минерализацию коллагеновой матрицы (соотношение апатит/коллаген) оценивали по данным ИК-спектроскопии из соотношения площади характеристических полос (900–1200/1550–1800  $\text{cm}^{-1}$ ), соответствующих колебаниям  $\text{PO}_4$  групп в составе гидроксиапатита (неорганическая фаза) и групп Амид I (органическая фаза), [10]. Термогравиметрию (ТГ), дифференциальную термогравиметрию (ДТГ) и дифференциальный термический анализ (ДТА) проводили на совмещенном термическом анализаторе Netzsch STA 409 PC Luxx (Германия); скорость нагрева 10.0°C/min на воздухе, масса навески  $40 \pm 10$  mg.

## 2. Результаты и их обсуждение

### 2.1. Регенерирующая костная ткань (1-я группа)

По данным СЭМ в регенерирующей костной ткани наблюдаются очаги remodelирования в виде скоплений остеобластов с характерными отростками на поверхности (рис. 1, *a*), а также костные пластинки, растущие в полости межклеточного пространства костного матрикса (рис. 1, *b*).

На рентгенограммах (рис. 2, *a*, дифрактограмма 1) образцов здоровой костной ткани видны уширенные дифракционные пики аморфизированного фосфата кальция с основными рефлексами в области  $2\theta$  30–35°, характерными для гидроксиапатита, как нестехиометри-

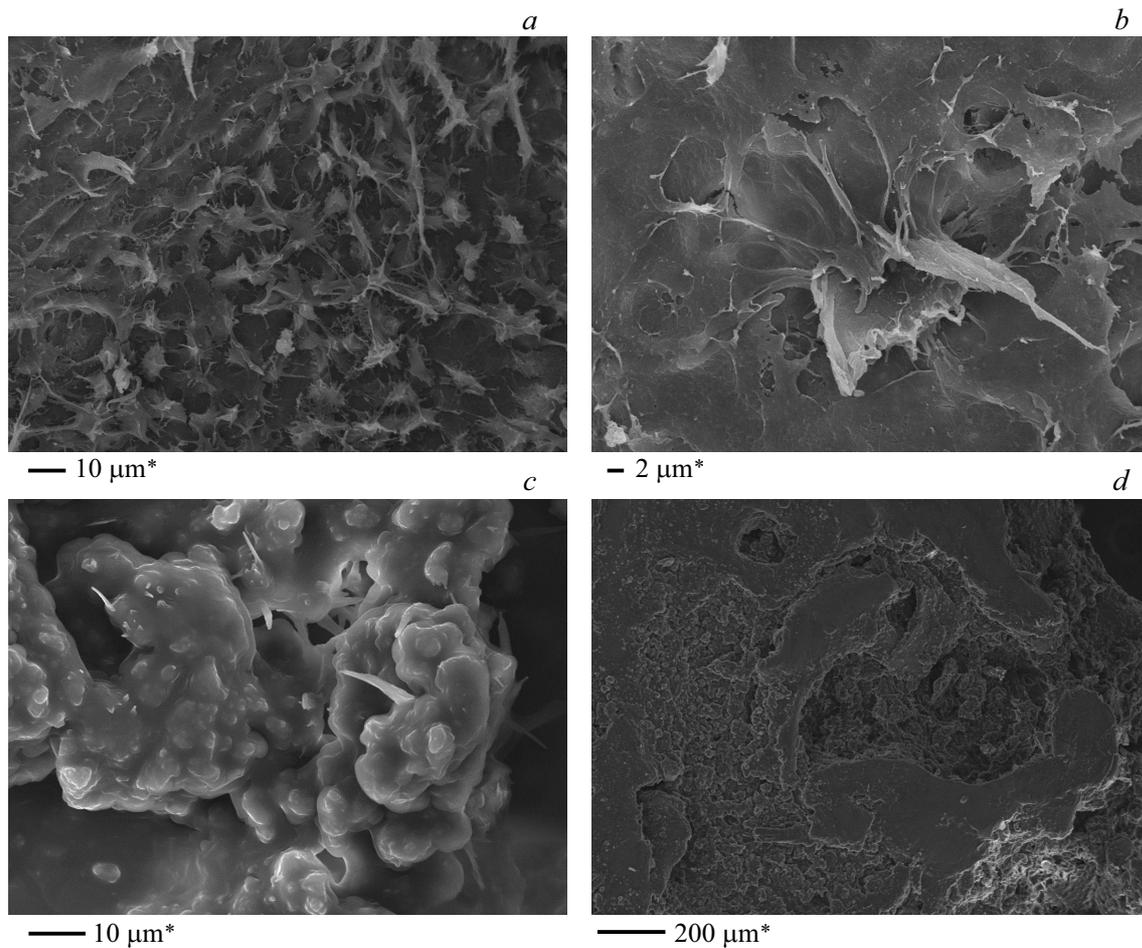
ческого состава (н-ГА), так и карбонатзамещенного (к-ГА) (табл. 1).

Согласно данным ИК-спектроскопии (рис. 2, *b*, кривая 1), в здоровой кости интенсивные полосы в области 3200–3600  $\text{cm}^{-1}$  обусловлены валентными колебаниями ассоциированных О-Н- и N-Н-групп в трехмерной структуре коллагена, а также наличием адсорбированной воды. Полосы при 2927 и 2856  $\text{cm}^{-1}$  соответствуют колебаниям С-Н групп полипептидной цепи, а при 1745  $\text{cm}^{-1}$  — колебаниям С=О- и N-Н-групп аминокислотного остатка глицина в первичной структуре белка. Апатитовая фаза костной ткани проявляется при 455 и 565  $\text{cm}^{-1}$  (плоскостные деформационные колебания  $\text{PO}_4$  групп), при 930–990 и 975–1140  $\text{cm}^{-1}$  (валентные колебания  $\text{PO}_4$ -групп). Свободная О-Н- группа н-ГА на ИК-спектре контрольного образца практически не видна, что свидетельствует об искажении кристаллической решетки гидроксиапатитовой фазы и его связывании с коллагеном за счет водородных связей. Кроме того, к искажениям кристаллической решетки гидроксиапатита приводят также изоморфные замещения О-Н (замещение А-типа) и  $\text{PO}_4$ -групп (замещение Б-типа) на карбонатные группы. На ИК-спектре эти полосы видны при 1545  $\text{cm}^{-1}$  (асимметричные колебания связей С-О карбонатных групп А-типа к-ГА), 1465 и 1410  $\text{cm}^{-1}$  (асимметричные колебания связей С-О карбонатных групп Б-типа к-ГА), при 873  $\text{cm}^{-1}$  (колебания связей О-С-О карбонатных групп Б-типа к-ГА). Следует отметить, что отнесение некоторых полос поглощения только к гидроксиапатитовой составляющей кости является условным, поскольку колебания связей С-О могут быть обусловлены также функциональными группами аминокислотных остатков коллагена. В связи с этим расчетные значения относительной минерализации коллагеновой матрицы носят оценочный характер и соотношение апатит/коллаген в контрольном образце составляет 48/52 (табл. 2).

Результаты РФА и ИК-спектроскопии подтверждаются данными термического анализа (рис. 3). Потеря массы образцов наблюдается в температурных интервалах при 50–200, 200–400, 400–550 и 550–900°C. Сначала происходит потеря структурной воды (9%), на второй стадии удаляются низкомолекулярные органические вещества и неколлагеновые белки, а выше 400°C происходит разложение высокомолекулярных органических веществ и коллагена, что согласуется с литературными данными [11]. Принимая во внимание, что органическая фаза начинает удаляться только на второй стадии, ее содержание при пересчете на обезвоженные образцы составляет 49% (табл. 2).

### 2.2. Регенерирующая костная ткань при туберкулезном остите на фоне лечения (2-я группа)

В образцах костной ткани при леченом туберкулезном остите по данным СЭМ (рис. 1, *c, d*) выявлены морфологические признаки разбалансирования процессов



**Рис. 1.** СЭМ-изображения костной ткани, здоровой (*a, b*) и на фоне лечения туберкулеза (*c, d*): *a* — с очагами ремоделирования костного матрикса; *b* — с новообразованными костными пластинками; *c* — с матриксными пузырьками в цитоплазме и минерально-органическими цитоплазматическими выростами; *d* — с разрастанием костных трабекул.

**Таблица 1.** Фазовый состав и размер кристаллитов минеральной составляющей костной ткани (по данным РФА)

| № группы | Образец  | Соотношение |      | Размер кристаллитов, nm |      |
|----------|--|-------------|------|-------------------------|------|
|          |  | н-ГА/к-ГА   | н-ГА | к-ГА                    | к-ГА |
| 1        | Контрольный  | 55/45       | 13   | 12                      |      |
| 2        | Костная ткань после лечения туберкулеза  | 77/23       | 10   | 15                      |      |
| 3        | Регенерирующая костная ткань с титановыми имплантатами                           | 61/39       | 10   | 11                      |      |
| 4        | Регенерирующая костная ткань с титановыми имплантатами после лечения туберкулеза | 61/39       | 13   | 13                      |      |

ремоделирования со смещением в сторону чрезмерного остеогенеза. Это проявляется в виде хаотичного разрастания костных трабекул, облитерации микропор и микрофитизации костного матрикса.

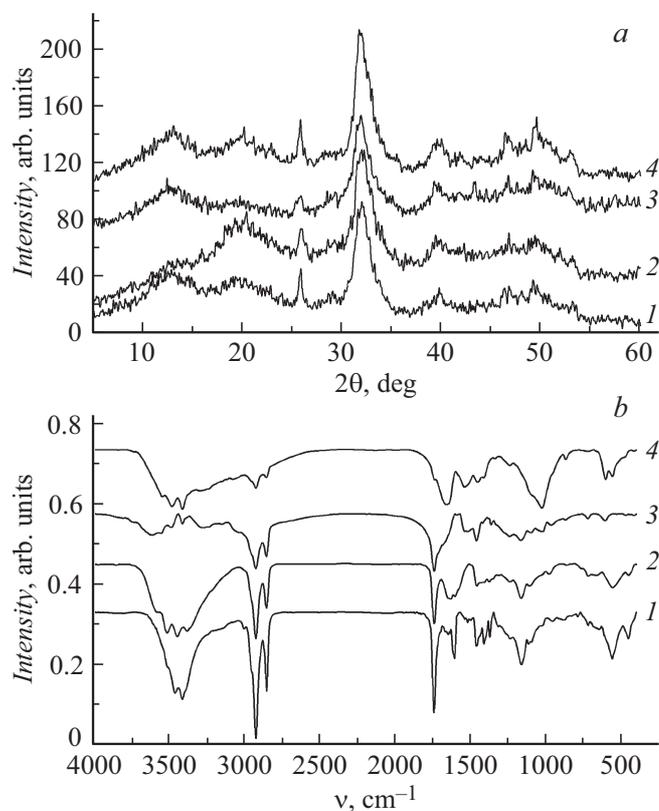
Методами РФА и ИК-спектроскопии установлено, что после лечения туберкулезного остита повышается коли-

чество н-ГА (табл. 1) и уменьшается содержание апатитовой фазы (табл. 2). Причем тенденция в соотношении неорганической и органических фаз по данным двух видов анализа (ИК-спектроскопии и ДТА) совпадает.

Следует отметить, что на ИК-спектре (рис. 2, *b*, кривая 2) проявляются полосы, соответствующие колеба-

**Таблица 2.** Расчетные данные относительной минерализации коллагеновой матрицы костной ткани

| № группы | Образец  | Соотношение апатит/коллаген |            |
|----------|--|-----------------------------|------------|
|          |  | Данные ИК                   | Данные ДТА |
| 1        | Контрольный  | 48/52                       | 51/49      |
| 2        | Костная ткань после лечения туберкулеза  | 44/56                       | 38/62      |
| 3        | Регенерирующая костная ткань с титановыми имплантатами                           | 51/49                       | 56/44      |
| 4        | Регенерирующая костная ткань с титановыми имплантатами после лечения туберкулеза | 46/54                       | 45/55      |

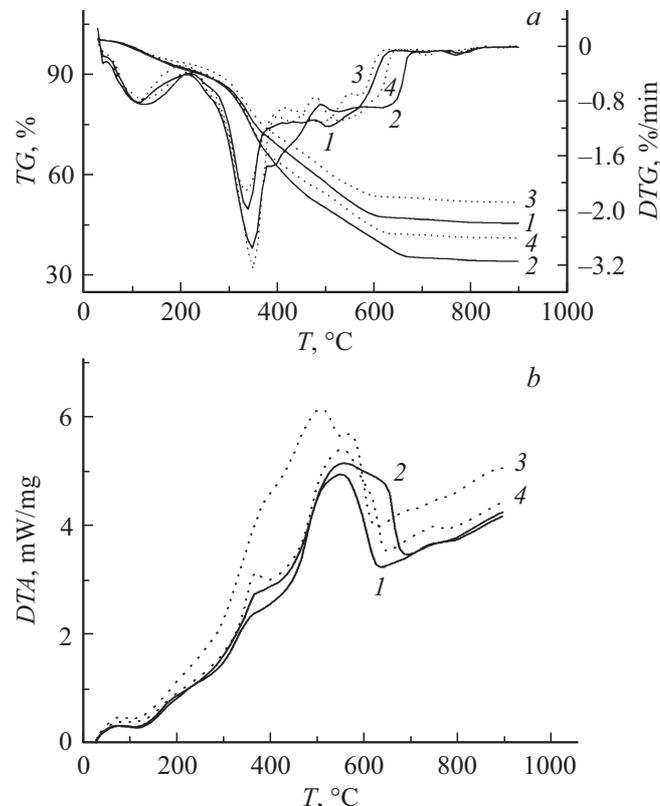


**Рис. 2.** Рентгенограммы (а) и ИК-спектры (b) образцов костной ткани, здоровой (1, 3) и на фоне лечения туберкулеза (2, 4): 1, 2 — физиологическая регенерация; 3, 4 — регенерация с титановыми имплантатами.

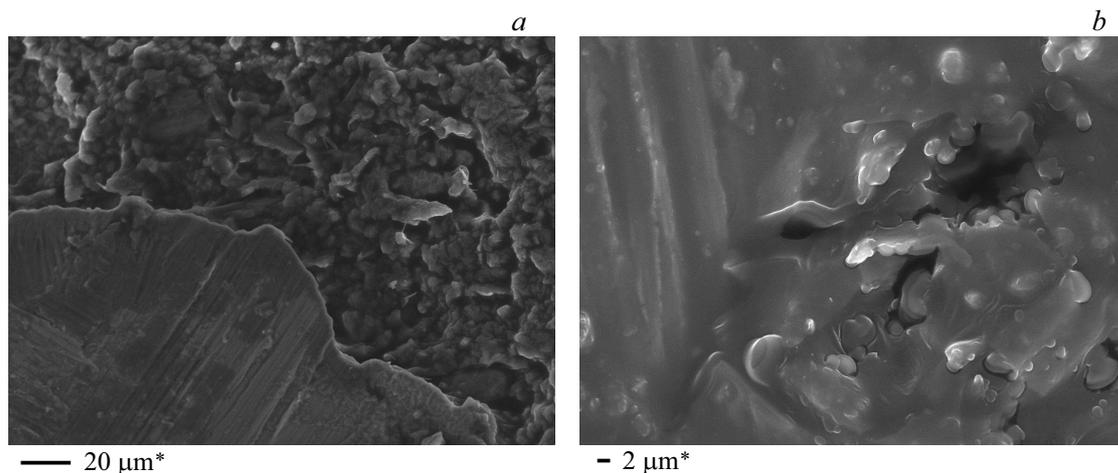
ниям функциональных групп к-ГА смешанного АБ-типа. Присутствие карбонатных групп в кристаллической решетке гидроксиапатита способствует некоторому сближению атомов кальция и кислорода в составе гидроксильных групп, что приводит к формированию центров „известкования“. Появление подобных структурных сдвигов может изменять микромеханические свойства минеральной фазы костного матрикса и усиливать ее „вязжущие“ свойства.

### 2.3. Регенерирующая костная ткань с внедренными титановыми имплантатами (3-я группа)

При внедрении титановых имплантатов в костную ткань здоровых животных по данным СЭМ (рис. 4, а) в пограничной области выявляются характерные костные пластинки, свидетельствующие об активной регенерации. Важно, что структура титанового имплантата оста-



**Рис. 3.** ТГ, ДТГ (а) и ДТА (b) образцов здоровой (1, 3) и на фоне лечения туберкулеза (2, 4) костной ткани: 1, 2 — физиологическая регенерация; 3, 4 — регенерация с титановыми имплантатами.



**Рис. 4.** СЭМ-изображения пограничной области имплантата со здоровой костной тканью в зоне роста (*a*) и структуры глубоких слоев спила титанового имплантата на фоне лечения туберкулезного остита (*b*).

ется однородной, без щелей и трещин, что свидетельствует о ее сохранности в физиологических условиях.

По данным РФА (рис. 2, *a*, дифрактограмма 3) в образцах костной ткани, извлеченных из зоны имплантата, интенсивность основного рефлекса немного ниже по сравнению с образцами 1-й и 2-й групп и наблюдается тенденция к увеличению содержания н-ГА относительно к-ГА (табл. 1). Это указывает на стремление костной ткани к восстановлению апатитовой фазы в матриксе регенерирующей кости.

На ИК-спектре (рис. 2, *b*, кривая 3) уменьшается интенсивность полос в области валентных колебаний О-Н и N-H-групп при  $3600\text{--}3200\text{ см}^{-1}$ , отвечающих за водородную связь. Полосы, соответствующие карбонатным группам, наблюдаются только для Б-типа к-ГА. Кроме того, по сравнению с контрольным образцом снижается интенсивность полос, отвечающих колебаниям функциональных групп как органической составляющей, так и минеральной фазы костной ткани. Следовательно, при имплантации титановых матриц происходит повышение степени аморфности апатитовой составляющей костной ткани. По расчетным данным как ИК-спектроскопии, так и ДТА (табл. 2) содержание неорганической фазы повышается по сравнению с образцами предыдущих групп (без имплантатов). Это означает, что в сравнении с физиологической регенерацией титановые имплантаты оказывают стимулирующее воздействие на процессы репаративной регенерации.

По данным ДТА (рис. 3) видно, что для всех образцов костной ткани дегидратация происходит до  $200^\circ\text{C}$  практически с одинаковыми скоростями. Обращает на себя внимание, что, начиная с  $350^\circ\text{C}$ , скорость распада коллагеновых белков в разных группах отличается. В частности, при регенерации костной ткани на фоне туберкулеза в образцах регистрируется более интенсивный распад органической фазы по сравнению с контрольной группой. Существенные различия наблюдаются для образцов в диапазоне  $600\text{--}900^\circ\text{C}$ : при имплантационном

остеогенезе по сравнению с контрольным образцом остается большее количество неорганической фазы в сухом остатке, т.е. в этих условиях образование неорганической фазы происходит быстрее, чем в контрольном образце.

#### 2.4. Регенерирующая костная ткань с внедренными титановыми имплантатами на фоне лечения туберкулезного остита (4-я группа)

По данным СЭМ (рис. 4, *b*) основными особенностями в этой группе образцов являются множественные эрозии и литические каналы с фестончатыми краями дефектов в глубинных слоях титановых имплантатов. Принципиально важно, что новообразованная костная ткань прорастает вглубь коррозированного имплантата. При этом наблюдается миграция мелких клеток-предшественников остеогенной направленности в щели диаметром до  $5\text{--}10\text{ }\mu\text{m}$ . В участках большого объема клетки дифференцируются в зрелые остеобласты с костными пластинками эмбрионального типа. В целом структура контактной области с имплантатом неоднородна, что создает условия для значительного варьирования кислотно-основного равновесия тканевой жидкости. В частности, области со щелочной средой будут способствовать коррозии титана, о чем свидетельствует преимущественное осаждение гидроксиапатита в зонах коррозии.

Согласно данным РФА, в регенерирующей костной ткани с внедренными титановыми имплантатами при туберкулезном остите по сравнению с физиологической регенерацией (3-я группа) происходит некоторое повышение степени кристалличности неорганической фазы и размера кристаллитов н-ГА и к-ГА (рис. 2, *a*, дифрактограмма 4, табл. 1). На ИК-спектре (рис. 3, кривая 4) наблюдается смещение сильной амидной полосы I, соответствующей карбонильному поглощению

при  $1745\text{ cm}^{-1}$ , и полосы валентных колебаний С-О при  $1165\text{ cm}^{-1}$  по сравнению с аналогичными образцами здоровой костной ткани. Отсутствие пика при  $1540\text{ cm}^{-1}$ , согласно [10], указывает на преобладание Б-типа к-ГА в данных образцах. Повышение содержания неорганической фазы (табл. 2) в образцах регенерирующей костной ткани с внедренными титановыми имплантатами после лечения туберкулезного остита свидетельствует о менее интенсивном росте соединительной коллагеновой ткани по сравнению с костной тканью без имплантата в этих условиях. Кроме того, образцы костной ткани 4-й группы характеризуются более высокой термостойкостью, связанной с плотной упаковкой коллагеновых волокон, что затрудняет удаление летучих продуктов распада органических соединений из образцов [12]. На кривых ДТА это проявляется в смещении тепловых эффектов в область высоких температур на 3-й и 4-й стадиях. Обращает на себя внимание, что при регенерирующем туберкулезном остите уменьшение неорганической фазы наблюдается в большей степени, чем при имплантационном остеогенезе при туберкулезном остите, т.е. титан в условиях туберкулеза в большей мере по сравнению с физиологической нормой способствует образованию фазы гидроксиапатита.

## Заключение

Регенерация костной ткани в физиологических условиях и при туберкулезном остите реализуется на фоне различных структурно-фазовых преобразований неорганической и органической фаз. Регенерация костной ткани на фоне лечения туберкулезного остита характеризуется уменьшением содержания апатитовой фазы с преобладанием н-ГА (до 77%), стремящегося к стабильной стехиометрической форме. При этом костный матрикс разрушается по хрупкому механизму с мелкодисперсным распадом.

Имплантационный остеогенез в физиологических условиях сопровождается интенсивным образованием неорганической фазы при соотношении н-ГА/к-ГА, стремящимся к норме.

При туберкулезном остите титановые имплантаты подвергаются щелочной коррозии с локальным осаждением гидроксиапатита, что является ключевым фактором, запускающим репаративный остеогенез.

## Финансирование работы

Работа выполнена при поддержке программы ГПНИ „Химические технологии и материалы“ (задание 1.04).

## Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## Список литературы

- [1] Gaidash A.A., Sinita L.N., Babenko O.A., Lugovskoy A.A. // J. Osteoporosis. 2011. Vol. 2011. Article ID 162041. 7 p. DOI: 10.4061/2011/162041
- [2] Seung Min Jung, KyoungWoon Kim, Chul-Woo Yang, Sung-Hwan Park, Ji Hyeon Ju // J. Immunol. Res. 2014. Article ID 263625. 15 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/263625>
- [3] Агапова О.И. // СТМ. 2017. Т. 9. № 2. С. 190–206. <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.2.24> [Agapova O.I. // СТМ. 2017. Vol. 9. N 2. P. 190–206.]
- [4] Крутько В.К., Кулак А.И., Мусская О.Н. // Неорганические материалы. 2017. Т. 53. № 4. С. 427–434. DOI: 10.7868/S0002337X17040091 [Krut'ko V.K., Kulak A.I., Musskaya O.N. // Inorganic Materials. 2017. Vol. 53. N 4. P. 429–436.]
- [5] Мусская О.Н., Кулак А.И., Крутько В.К., Лесникович Ю.А., Казбанов В.В., Житкова Н.С. // Неорганические материалы. 2018. Т. 54. № 2. С. 130–137. DOI: 10.7868/S0002337X18020033 [Musskaya O.N., Kulak A.I., Krut'ko V.K., Lesnikovich Yu.A., Kazbanov V.V., Zhitkova N.S. // Inorganic Materials. 2018. Vol. 54. N 2. P. 117–124.]
- [6] Sargeant T.D., Guler M.O., Oppenheimer S.M., Mata A., Satcher R.L., Dunand D.C., Stupp S.I. // Biomaterials. 2008. Vol. 29. N 2. P. 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.09.012>
- [7] Yanovska A.A., Stanislavov A.S., Sukhodub L.B., Kuznetsov V.N., Illiashenko V.Yu., Danilchenko S.N., Sukhodub L.F. // Mater. Sci. Eng. C. 2014. Vol. 36. P. 215–220. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.12.011>
- [8] Barrerea F., Snelc M.M.E., Van Blitterswijk C.A., De Groota K., Layrollea P. // Biomaterials. 2004. Vol. 25. P. 2901–2910. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.09.063
- [9] Shizuko Ichinose, Takeshi Muneta, Ichiro Sekiya, Soichiro Itoh, Hideki Aoki, Motoki Tagami // J. Mater. Sci. Mater. Med. 2003. Vol. 14. N 1. P. 79–86. <https://doi.org/10.1023/A:1021557605458>
- [10] Boskey A.L., Donnelly E., Boskey E., Spevak L., Yan Ma, Wei Zhang, Joan Lappe, Recker R.R. // JBMR. 2016. Vol. 31. N 5. P. 1070–1081. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2759>
- [11] Лемешева С.А., Голованова О.А., Туренков С.В. // Химия в интересах устойчивого развития. 2009. № 17. С. 327–332.
- [12] Лемешева С.А., Голованова О.А., Муромцев И.В., Туренков С.В. // Вестник Омского ун-та. 2010. № 2. С. 106–112.