

УДК 533.9;538.9

КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫЕ ПОКРЫТИЯ, СОЗДАННЫЕ МЕТОДОМ ВЧ-МАГНЕТРОННОГО РАСПЫЛЕНИЯ ГИДРОКСИАПАТИТА: ОСТЕОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ *in vitro* и *in vivo*

М.А. Сурменева*, Р.А. Сурменев*, И.А. Хлусов*, **, В.Ф. Пичугин*, М.Е. Конищев*, М. Эппле***

*Томский политехнический университет

**Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

***Университет Дуйсбург-Эссен, Институт неорганической химии, г. Эссен, Германия

E-mail: surmenev@tpu.ru

Покрытия на основе стехиометрического гидроксиапатита были получены методом ВЧ-магнетронного распыления. Морфология поверхности, фазовый и элементный состав покрытий исследованы методами сканирующей электронной микроскопии, энергодисперсионного рентгеновского анализа, инфракрасной спектроскопии. Элементный состав покрытий определяется составом мишени для распыления. Распределение элементов по поверхности покрытия равномерное. Остеогенные свойства покрытий исследованы методом эктопического костеобразования. Полученные покрытия, обладают биосовместимостью без проявления остеиндуцирующей активности. Структурирование поверхности значительно увеличивает *in vivo* влияние кальцийфосфатных магнетронных покрытий на остеогенную активность стромальных стволовых клеток костного мозга.

Ключевые слова:

Гидроксиапатит, высокочастотное магнетронное рассеяние, биоактивность, остеонитеграция.

Key words:

Hydroxyapatite, radio frequency magnetron sputtering, bioactivity, osteointegration.

Введение

Проблема нанесения на материалы медицинских имплантатов биосовместимых покрытий является актуальной. Покрытия должны быть нетоксичными, не вызывать иммунных реакций, не деградировать при взаимодействии с живой тканью, иметь высокую адгезию к поверхности, не создавать абразивный эффект в подвижных элементах. Гидроксиапатит (ГА) — $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, один из представителей класса кальцийфосфатных материалов, широко используется в качестве исходного материала для синтеза покрытий медицинского назначения. ГА является неорганической составляющей костного матрикса со стехиометрическим соотношением кальция к фосфору $\text{Ca/P}=1,67$, чем и объясняется высокая биосовместимость этого материала.

Различные образцы кальцийфосфатных материалов, в зависимости от их физико-химических свойств (степень кристалличности и пористости, растворимость, шероховатость поверхности, элементный и фазовый состав и т. д.), обладают разной способностью поддерживать костеобразование [1]. Физико-химические и биомедицинские свойства имплантатов взаимосвязаны и находятся в тесной зависимости от способа формирования поверхностного искусственного слоя. Тем не менее, до сих пор не удалось найти ключевое сочетание структуры, морфологии поверхности, толщины и скорости растворения различных покрытий для реализации остеогенного потенциала стромальных стволовых клеток и успешной остеointеграции. Плотная биосовместимая гидроксиапатитовая керамика является малоактивным материалом, при ее использовании крайне замедлены процессы резорбции имплантата и кинетика роста контактной костной ткани [2].

Основными технологическими методами формирования биосовместимых покрытий, являются плазменное напыление [3], метод лазерной абляции [4], методы, основанные на кристаллизации покрытий из различных растворов [5], а также, высокочастотное (ВЧ-) магнетронное распыление [6]. В ряде методов при нанесении покрытия исходное вещество изменяется, и покрытие представляет собой новую, часто многофазную систему. Важно, чтобы применяемый метод позволял сохранять химический состав исходного материала при нанесении покрытия на имплантат. Метод ВЧ-магнетронного распыления отвечает этому требованию, более того, он позволяет варьировать как элементный состав покрытия путем изменения состава исходной мишени для распыления, так и параметры напыления (мощность разряда, рабочий газ и др.) [7]. Другое неоспоримое преимущество этого метода — высокая адгезионная прочность покрытий.

Объектами исследования данной работы служили покрытия, сформированные методом ВЧ-магнетронного распыления мишеней, приготовленных из ГА стехиометрического состава. Целью работы является исследование физико-химических свойств сформированных методом ВЧ-магнетронного распыления покрытий, влияния рельефа искусственной поверхности на реакцию культуры клеток и изучение остеогенного потенциала полученных покрытий.

Материалы и методы

1. Формирование кальцийфосфатных покрытий

Для напыления покрытий использовалась промышленная установка 08ПХО-100Т-005 с магнетронным источником (5,28 МГц). Для формирования покрытий были установлены следующие параметры: рабочее давление — 0,1 Па (предельное да-

вление в вакуумной камере 10^{-4} Па), расстояние между мишенью и подложками – 40 мм, рабочий газ – аргон, плотность мощности ВЧ-разряда – $0,1...0,5$ Вт·см $^{-2}$. Мишень для распыления была приготовлена путем прессования и последующего спекания синтетического стехиометрического ГА на воздухе при температуре 1100 °С в течение 1 ч на воздухе. После процедуры спекания, материал мишени сохранил структуру ГА с величиной отношения $Ca/P=(1,67\pm0,02)$.

В качестве подложек для напыления использовались монокристаллы KBr (для исследования молекулярных связей в покрытии методом ИК-спектроскопии), пластины Si и технически чистого титана ВТ1-0. Для медико-биологических исследований были подготовлены образцы титана с различным рельефом поверхности: образцы с поверхностью 8 класса шероховатости ($R_a < 1$ мкм), образцы с поверхностью, текстурированной продольными бороздками шириной ~30 мкм и глубиной ~10 мкм (расстояние между бороздками ~120 мкм), а также бороздками глубиной 1 мм, шириной 1 мм (расстояние между бороздками ~1 мм).

Исследования морфологии и элементного состава полученных покрытий проводились с использованием сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) Quanta 200 ESEM FEG фирмы FEI, со встроенной приставкой энергодисперсионного рентгеновского анализа (ЭДРА). Для определения фазового состава сформированного кальцийфосфатного (CaP) покрытия использовался рентгенофазовый анализ (РФА) (дифрактометр Shimadzu XRD-7000). Для интерпретации дифрактограмм использовалась база данных International Center for Diffraction Data (ICDD): номер карточки для синтетического ГА (9-432); для титана (44-1294). Анализ молекулярных связей в покрытиях осуществлялся с использованием метода Фурье ИК-спектроскопии. Спектры оптического поглощения получены на приборе Bruker Vertex 70 в диапазоне 400...4000 см $^{-1}$.

2. Методика медико-биологических исследований

Для сравнительного анализа *in vivo* и *in vitro* были приготовлены образцы площадью 0,8 см 2 с двусторонним магнетронным покрытием на основе ГА.

Цитотоксический тест проводился с применением клеточного материала мышей линии BALB/c. Клетки костного мозга размораживали согласно стандартной процедуре, доводили до концентрации 10^7 кариоцитов/мл с помощью среды DMEM. В клеточную взвесь помещали тестируемые образцы и культивировали в объеме 2 мл культуральной среды в течение 3,5 ч при 37 °С. Контролем служила клеточная взвесь без образцов. Мягким пипетированием равномерно распределяли клетки по объему среды, определяли цитотоксичность образцов в тесте на окрашиваемость 0,4 % трипановым синим согласно ISO 10993-5.

Для исследования реакции клеток на прямой контакт с поверхностью использовалась культура

пренатальных фибробластоподобных клеток легкого человека (ООО «Банк стволовых клеток», г. Томск). Препараты представляют собой популяцию клеток с ограниченным сроком жизни, сохраняющую при пассажах *ex vivo* стабильный кариотип и онкогенно безопасную. Клетки свободны от посторонних вирусных (ВИЧ, гепатит, герпес и др.) и бактериальных агентов (сифилис, микоплазмы, хламидии и др.). После размораживания жизнеспособность клеток, определяемая согласно ISO 10993-5 в тесте с 0,4 % трипановым синим, составила 93 %.

Изучаемые изделия помещали в лунки 24-луночных планшетов (Costar), добавляли клеточную взвесь в концентрации $5 \cdot 10^4$ жизнеспособных кариоцитов в 1 мл остеогенной среды следующего состава: 20 % инактивированной при 56 °С эмбриональной телячьей сыворотки, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты, 10 мМ бета-глицерофосфата, 10^{-6} М дексаметазона, 50 мг/л гентамицина, 280 мг/л L-глутамин, 10 мМ HEPES буфера, DMEM среды до 100 мл. Контролем роста служила культура фибробластоподобных клеток на пластике.

Через 4 суток имплантаты удаляли, сушили на воздухе. Подготовку образцов с клетками, прилипающими к поверхности, для СЭМ проводили согласно [8]. Осуществляли фиксацию адгезирующих к покрытию клеток в течение 30 мин в 2,5 % растворе глutarового альдегида на фосфатном буфере, затем в 1 % растворе четырехоксида осмия в течение 30...40 мин с последующим двукратным отмыванием фосфатным буфером (pH=7,2...7,4). Далее производили обезвреживание клеток в серии водных растворов этанола восходящей концентрации 30, 50, 70, 90, 96 % по 15 мин в каждом и дважды в 100 % ацетоне. Полученные образцы изучали на СЭМ Phillips SEM 515 под углом наклона 35°.

Остеогенные свойства ГА и трикальцийфосфата, составляющих основу минерального матрикса кости, убедительно доказаны феноменом эктопического костеобразования, когда на поверхности CaP материалов формируется костная ткань. Адекватным экспериментальным подходом для определения возможных остеогенных свойств CaP материалов является вариант феномена эктопического костеобразования, когда искусственный образец имплантируется под кожу или внутримышечно без использования ростовых факторов [9]. Так, Ц. Янг с соавт. [10] при имплантации пористых CaP наблюдал эктопический остеогенез у собак, свиней, но не у коз, крыс, мышей или кроликов. Аналогичные данные на собаках получили другие авторы [11]. Некоторые исследователи, напротив, определяли параметры остеоиндукции при внутримышечной или подкожной имплантации CaP кроликам и мышам [9]. Нами были получены воспроизводимые результаты подкожного роста кости у мышей из столбика сингенного костного мозга, предварительно нанесенного на CaP шероховатые поверхности [12].

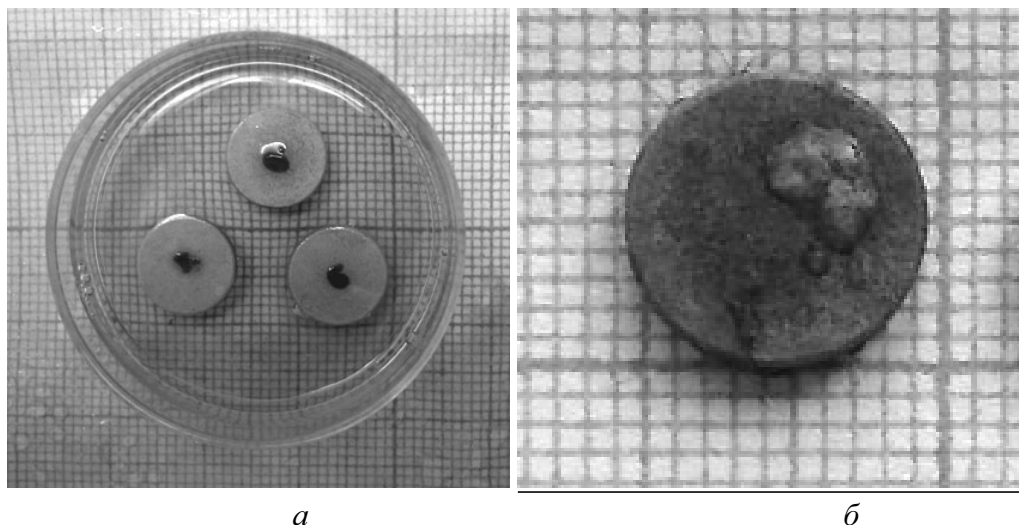


Рис. 1. Вид органной культуры костного мозга мышей на подложке до подкожной имплантации (а) и тканевая пластинка, выросшая на магнетронном СаР покрытии из костного мозга мышей при подкожном введении имплантатов (б)

В текущих экспериментах использовались 16 мышей-самцов линии BALB/с из коллекционного фонда лаборатории экспериментального биомоделирования НИИ фармакологии СО РАМН (г. Томск). Животным под эфирным наркозом подкожно вводили по 1 имплантату с нанесенным в асептических условиях столбиком сингенного костного мозга (средняя площадь мозга $7,5 \text{ мм}^2$), взятого из бедренной кости. Для адгезии клеток органную культуру костного мозга на подложке (рис. 1, а) культивировали при 37°C в течение 45 мин в культуральной среде, содержащей 95 % среды DMEM и 5 % эмбриональной телячьей сыворотки. Костный мозг служил источником стромальных стволовых клеток и ростовых факторов. При раздельном подкожном введении подложек или фрагментов костного мозга образования тканевых пластинок не наблюдалось.

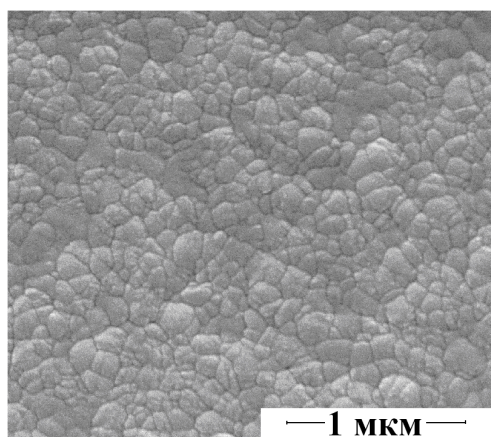
Через 45 дней имплантаты извлекали, снимали тканевые пластинки (рис. 1, б) с поверхности дисков, декальцинировали, заливали парафином и

выполняли тонкие (10 мкм) срезы перпендикулярно поверхности дисков, окрашивали гематоксилином-эозином для гистологических исследований. Позитивным результатом считали рост костного мозга и/или кости на поверхности имплантата, негативным – развитие соединительной, мышечной или жировой ткани. В анализах использовались реактивы «О.С.Ч.».

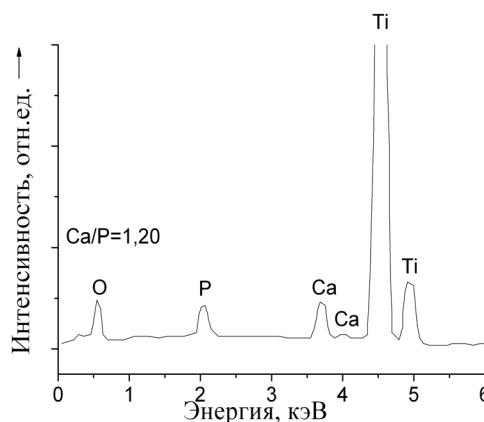
Результаты и их обсуждение

1. Физико-химические свойства покрытий

Типичная морфология покрытий, полученных при ВЧ-магнетронном распылении на подложке из титана, представлена на рис. 2, а. Установлено, что поверхность сформированных методом ВЧ-магнетронного распыления покрытий является однородной, плотной, не содержит видимых дефектов, трещин и сколов; нанесенное покрытие повторяет рельеф поверхности подложки. Основными элементами рельефа являются островки в виде «кулолоб-



а



б

Рис. 2. СЭМ-изображение поверхности (а) и ЭДРА-спектры (б) покрытий, сформированных методом ВЧ-магнетронного распыления

разных» зерен. Средний размер зерен зависит от режимов напыления, лежит в интервале от 10 до 140 нм и определяется мощностью магнетронного разряда и временем напыления. Исследования динамики роста покрытия показывают, что на начальных этапах роста (15 мин напыления) покрытие полностью закрывает поверхность подложки. Согласно ЭДРА-спектрам, рис. 2, б, покрытия состоят из кальция, фосфора и кислорода. Значение отношения $\text{Ca}/\text{P}=1,20$ для сформированных покрытий ниже, чем для стехиометрического ГА ($\text{Ca}/\text{P}=1,67$). Известно, что чем меньше отношение $n(\text{Ca})/n(\text{P})$, тем более растворимым является фосфат кальция [13].

На рис. 3 представлены карты распределения элементов («*mappings*») в CaP покрытиях, напылен-

ных методом ВЧ-магнетронного распыления на подложку из титана.

Как видно из данных рис. 3, наблюдается равномерное распределение элементов в покрытии.

Ранее [14] нами было показано, что структура покрытий определяется мощностью разряда и временем напыления. Так, покрытия, напыляемые при низком значении плотности мощности ($0,1 \text{ Вт}\cdot\text{см}^{-2}$) рентгеноаморфны. Увеличение плотности мощности до $0,5 \text{ Вт}\cdot\text{см}^{-2}$ позволяет получать кристаллические покрытия со структурой ГА с преимущественной ориентацией кристаллитов в направлении (002) [14]. С увеличением времени напыления (до 180 мин) степень кристалличности покрытий увеличивается (рис. 4, а), появляются рефлексы ГА при $25,8^\circ$ (002), $53,1^\circ$ (004), $31,8^\circ$ (211),

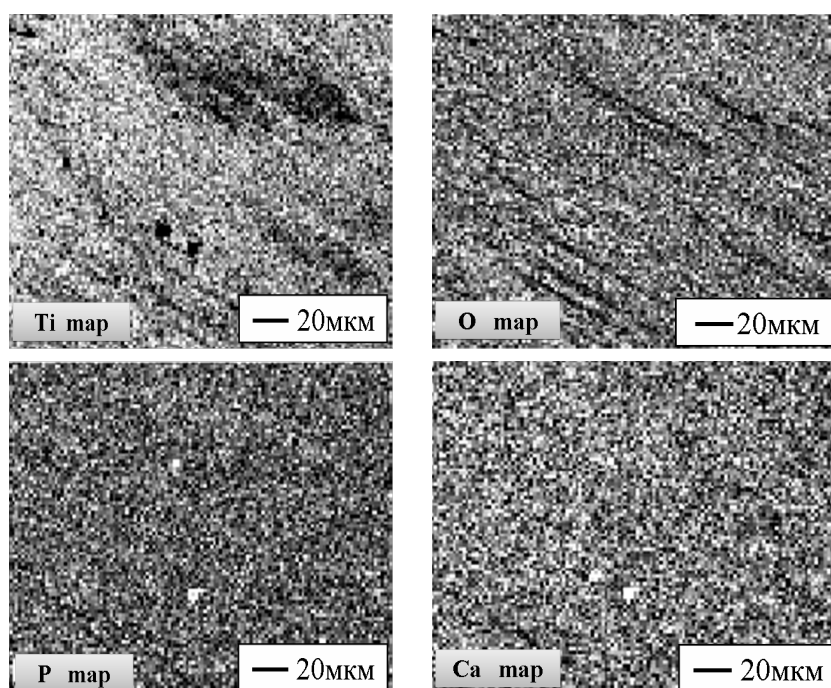


Рис. 3. Карта распределения химических элементов в CaP покрытии, осажденном методом ВЧ-магнетронного распыления

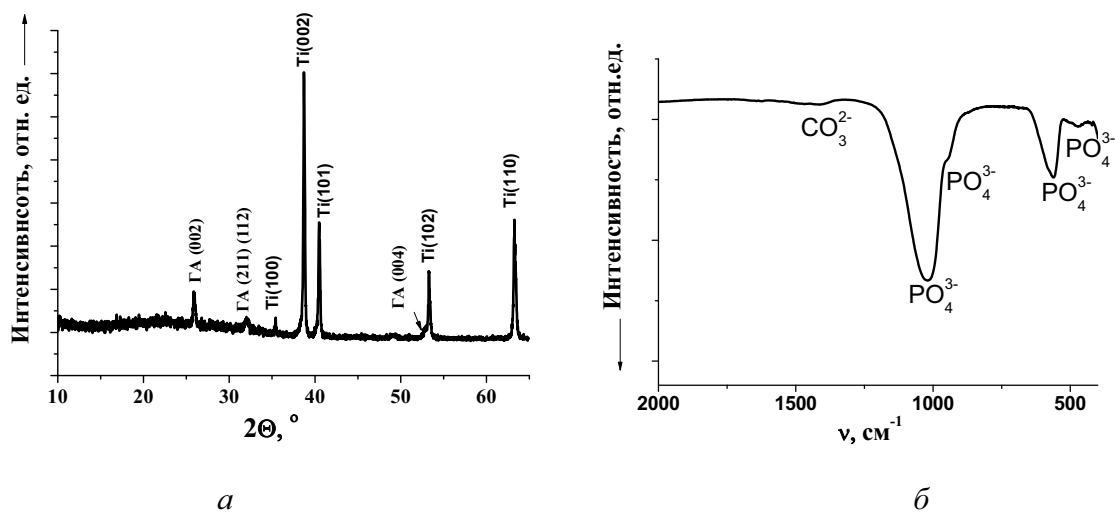


Рис. 4. Рентгенограммы (а) и ИК-спектры поглощения (б) покрытий, сформированных методом ВЧ-магнетронного распыления

32,2° (112), 32,9° (300), причем последние три рефлекса перекрываются. Результаты РФА покрытий, напыленных при плотности мощности 0,5 Вт·см⁻², представлены на рис. 4, а. Кроме рефлексов, соответствующих кристаллическому ГА, на дифрактограммах не обнаружены рефлексы, относящиеся к другим кальцийфосфатам (трикальцийфосфат, тетракальцийфосфат и т. д.) или кристаллическому СаО.

ИК-спектры поглощения покрытий показывают присутствие в покрытиях молекулярных связей, типичных для ГА (рис. 4, б). В спектрах поглощения типичными являются линии, соответствующие деформационным и валентным колебаниям ионов PO₄³⁻ при 570 см⁻¹ (ν₄), 601 см⁻¹ (ν₄) и 1031 см⁻¹ (ν₃). Процесс напыления приводит к частичной потере части групп ОН, что обнаружено для всех режимов напыления (слабо разрешаются полосы колебаний ионов ОН при 631 и 3571 см⁻¹). Структура покрытия в данном случае соответствует частично гидроксидированному ГА с химической формулой Са₁₀(PO₄)₆(ОН)_{2-2x}О_xV_x, где V – вакансии (0 < x < 1).

2. Медико-биологические исследования покрытий
in vitro и *in vivo*

2.1. Санитарно-химические испытания

Результаты культурального исследования показали, что магнетронные СаР покрытия, нанесенные на металлическую подложку, не оказывали статистически значимого токсического действия на клетки костного мозга мышей по сравнению с контролем токсичности среды. Средние показатели токсичности магнетронных покрытий при культивировании в среде DMEM в течение 3,5 ч, $X \pm SD(m)$, $n=15$ следующие: процент погибших клеток X для магнетронных СаР покрытий составляет $8,88 \pm 9,61$ (2,48), что ниже значения, соответствующего для контроля токсичности среды $9,45 \pm 11,14$ (4,98). Отсутствие цитотоксичности образцов *in vitro* позволило изучить биосовместимость и специфическую активность магнетронных покрытий *in vivo* в тесте подкожного эктопического остеогенеза.

Исследование реакции тканей на подкожную имплантацию изучаемых изделий подтвердило их высокую биосовместимость *in vivo*, поскольку через 45 суток не отмечалось признаков воспалительной реакции ни в одной из групп наблюдения.

2.2. Влияние рельефа поверхности титановых имплантатов с магнетронным кальцийфосфатным покрытием на их биологическую активность

Изучение прямого взаимодействия фибробластоподобных (имеющих морфологию фибробластов) клеток с магнетронными СаР покрытиями показало, что их форма зависит от рельефа искусственной поверхности. Фибробластоподобные клетки, располагающиеся в углублениях покрытия, имели округлую или овальную форму (рис. 5, а), характерную для жидкой клеточной взвеси. В местах, где нет углублений, клетки принимали вытянутую форму (рис. 5, б). Образование псевдоподий свидетельствовало об их активном морфологическом созревании в области контактов с искусственным СаР покрытием (рис. 5).

«Гладкие» магнетронные покрытия (индекс шероховатости Ra порядка 1 мкм) в тесте эктопического подкожного костеобразования у мышей не обладали способностью индуцировать рост тканевых пластинок из столбика сингенного костного мозга, предварительно нанесенного на поверхность имплантат *in vitro*.

Мы предположили, что это связано с потерей клеток с искусственной поверхности вследствие биомеханической нагрузки на сдвиг, возникающей при подкожной имплантации изделия. Для проверки гипотезы на образцы перед формированием покрытия были нанесены параллельные или пересекающиеся борозды глубиной и шириной до 1 мм. Через 45 суток инкубирования в подкожной жировой клетчатке у мышей на поверхности имплантатов удалось выявить тканевые пластинки, гистологически представляющие собой кость с лакунами, заполненными красным костным мозгом, рис. 6.

Вследствие текстурирования поверхности вероятность образования кости на магнетронных СаР

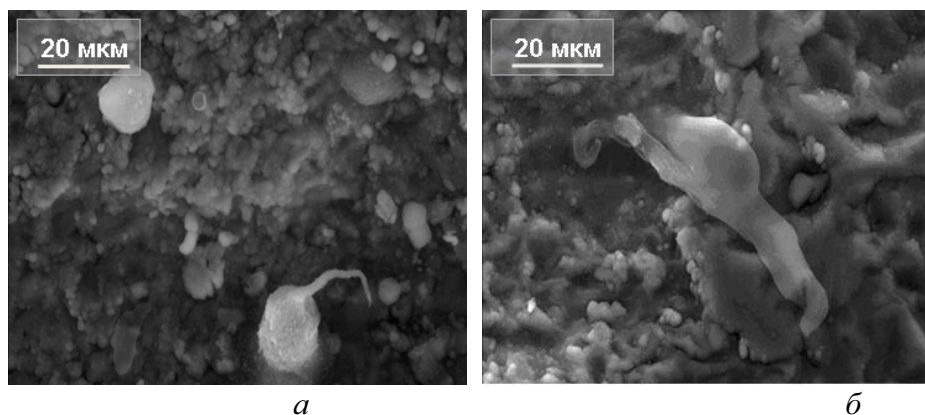


Рис. 5. СЭМ-изображение культуры фибробластов на СаР магнетронной поверхности: (а) фибробласты округлой формы и с псевдоподией; (б) клетка вытянутой формы

покрытиях возросла до 83 %, что соответствует величинам для шероховатых микроугловых СаР поверхностей [15].

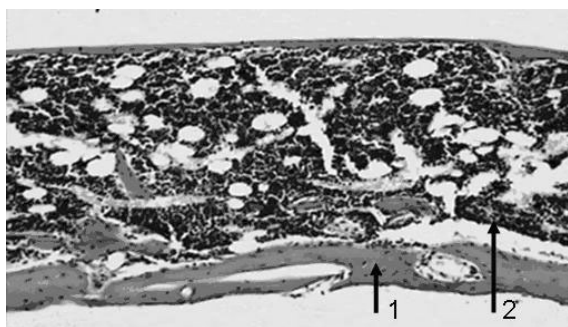


Рис. 6. Фрагмент гистологического среза тканевых пластинок, выросших на СаР магнетронных поверхностях в тесте эктопического костеобразования у мышей. Определяется замкнутая костная пластинка (1) с лакунами, заполненными красным костным мозгом (2). Окраска гематоксилином – эозином

Выводы

На металлических имплантатах методом ВЧ-магнетронного распыления при плотности мощности $0,1...0,5 \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-2}$ сформированы покрытия на основе чистого гидроксиапатита. Элементный состав покрытий (кальций, фосфор, кислород) определяется составом мишени для распыле-

ния. Распределение элементов по поверхности покрытия равномерное. Увеличение плотности мощности до $0,5 \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-2}$ позволяет получать кристаллические покрытия со структурой гидроксиапатита с преимущественной ориентацией кристаллитов в направлении (002). Нанесенное покрытие однородно, морфология поверхности определяется рельефом поверхности подложки.

С биомедицинской точки зрения, магнетронные СаР покрытия являются биосовместимыми, растворимыми, биоактивными при непосредственном контакте фибробластоподобных (имеющих морфологию фибробластов) клеток с их поверхностью. Структурирование поверхности усиливает остеогенные свойства магнетронных СаР покрытий *in vitro* и *in vivo*. В основе механизмов костеобразования лежит, по-видимому, стимуляция процессов ремоделирования костной ткани через активацию остеокластов.

Исследование выполнено при поддержке федеральных целевых программ «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (гос. контракты № П2081 от 03.11.2009; № П861 от 25.05.2010; шифр заявки 2010-1.3.1-207-003-003); «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» (гос. контракт № 02.512.11.2285 от 10.03.2009), гранта РФФИ 09-04-00287а, а также гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (№ МК-6360.2010.8).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Daculsi G. New technology for calcium phosphate bioactive ceramics in bone repair // Proc. EMBEC'99, Vienna, Austria, 4–7 November 1999. – Vienna, 1999. – V. 37. – Part II. – P. 1598–1599.
2. Currey, J. D. Bones: Structure and mechanics. – NJ: Princeton University Press, 2002. – 436 p.
3. Sun L., Berndt C.C., Gross K.A., Kucuk A. Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings // J. Biomed. Mater. Res. – 2001. – V. 58. – № 5. – P. 570–592.
4. Nelea V., Morosanu C., Ilescu M., Mihailescu I.N. Hydroxyapatite thin films grown by pulsed laser deposition and radio-frequency magnetron sputtering: comparative study // Appl. Surf. Sci. – 2004. – V. 228. – № 1–4. – P. 346–356.
5. Xu G., Aksay I., Groves J. Continuous crystalline carbonate apatite thin films. A biomimetic approach // J. Amer. Chem. Soc. – 2001. – V. 123. – № 10. – P. 2196–2203.
6. Pichugin V.F., Surmenev R.A., Shesterikov E.V., et al. The preparation of calcium phosphate coatings on titanium and nickel-titanium by rf-magnetron-sputtered deposition: Composition, structure and micromechanical properties // Surf. Coat. Tech. – 2008. – V. 202. – P. 3913–3920.
7. Пичугин В.Ф., Ещенко Е.В., Сурменев Р.А. и др. Использование высокочастотного магнетронного распыления для формирования на поверхности титана тонких кальций-фосфатных биосовместимых покрытий // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. – 2007. – № 11. – С. 1–5.
8. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. и др. Теория и практика микроскопии эритроцита / под ред. В.В. Новицкого, Н.В. Рязанцевой. – Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2008. – 152 с.
9. Li Y., Zhang X., Chen W., et al. The influence of multiphase calcium phosphate bioceramics on bone formation in non-osseous tissues // Transactions of the 19th Annual meeting of society for biomaterials. – Birmingham, USA, 1993. – P. 165.
10. Yang Z., Yuan H., Tong W., et al. Osteogenesis in extraskeletal implanted porous calcium phosphate ceramics: variability among different kinds of animals // Biomaterials. – 1996. – V. 17. – P. 2131–2137.
11. Klein C., De Groot K., Chen W., et al. Osseous substance formation induced in porous calcium phosphate ceramics in soft tissues // Biomaterials. – 1994. – V. 15. – P. 31–34.
12. Хлусов И.А., Карлов А.В., Поженко И.С., Суходоло И.В., Хлусова М.Ю. Зависимость остеогенных свойств клеток костного мозга от рельефа и растворимости кальций фосфатных покрытий // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 141. – № 1. – С. 107–112.
13. Вересов А.Г., Пуляев В.И., Третьяков Ю.Д. Химия неорганических материалов на основе фосфатов кальция // Российский химический журнал. – 2004. – Т. 48. – № 4. – С. 52–64.
14. Сурменев Р.А., Сурменева М.А., Пичугин В.Ф. и др. ВЧ-магнетронные кальций-фосфатные покрытия на материалах медицинских имплантатов // Известия Томского политехнического университета. – 2009. – Т. 315. – № 2. – С. 138–141.
15. Khlusov I.A., Zagrebina L.V., Shestov S.S., Naumov S.A. Physical-chemical manipulations with microbial and mammalian cells: from experiments to clinics // Stem Cell Applications in Disease and Health / Ed. W.B. Burnside, R.H. Ellsley. – N.Y.: Nova Science Publishers Inc, 2008. – P. 37–80.

Поступила 28.04.2010 г.