

О.В. Саввова<sup>1</sup>, В.М. Шимон<sup>2</sup>, О.В. Бабіч<sup>3</sup>, О.І. Фесенко<sup>1</sup>, А.А. Шерегій<sup>2</sup>

## ВПЛИВ ВИЛУГОВУВАННЯ КАЛЬЦІЙФОСФАТОСИЛКАТНИХ СКЛОКРИСТАЛІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ НА ЗДАТНІСТЬ ДО ЗВ'ЯЗУВАННЯ З АЛЬБУМІНОМ *IN VITRO* ТА БІОСУМІСНІСТЬ *IN VIVO*

<sup>1</sup> Харківський національний університет міського господарства ім. О.М. Бекетова  
вул. Маршала Бажанова, 17, Харків, 61002, Україна

<sup>2</sup> Державний вищий навчальний заклад «Ужгородський національний університет»  
пл. Народна, 3, Ужгород, 88000, Україна

<sup>3</sup> Український науково-дослідний інститут екологічних проблем  
вул. Бакуліна, 6, Харків, 61166, Україна, E-mail: fesenco\_alex@ukr.net

Метою даної роботи є визначення впливу вилугування композиційних біоактивних матеріалів та вільної енергії поверхні на характер зв'язування поверхні з альбуміном *in vitro*.

Вихід іонів кальцію з матеріалу після витримки в дистильованій воді та 10-му % розчині альбуміну визначали методом полум'яної атомно-абсорбційної спектроскопії за допомогою приладу Agilent AA 240FS. Мікрорельєф поверхні оцінювали за показником середнього арифметичного відхилення профілю ( $R_a$ ) і визначали за допомогою профілометра Surtronic 3+. Значення вільної енергії поверхні композиційних матеріалів визначали методом Оуенса–Вендета–Рабеля–Каєбле після витримки в альбуміні. Гістологічні дослідження зразків стегнової кістки щурів, через 30 діб після впровадження імплантату з розробленого матеріалу проводили за допомогою світлового мікроскопа Olympus BX63 та фіксували за допомогою цифрової камери DP73 (Olympus).

У роботі були використані розроблені нами раніше композиційні біоактивні матеріали, на основі порошків кальційфосфатосилкатних стекол, легованих мікродобавками оксидів молібдену, ванадію, лантану, кобальту, стронцію та купруму з додаванням 5 мас. ч. діоксиду цирконію (марка ДЦІ 1). Матеріали пресували з використанням як зв'язуючого розчину карбоксиметилцелюлози та випалювали при 750–800 °С протягом 15 хв. Отримані зразки характеризувалися наявністю тонкодисперсних кристалів гідроксиапатиту в кількості 50–60 об. %.

Встановлено, що розчинність розроблених матеріалів у воді визначається властивостями склофаз (ступенем зв'язаності кремніюкисневого каркаса  $f_{Si}$ ) та вмістом гідроксиапатиту. Процес зв'язування кальцію з альбуміном (масова частка зв'язаного кальцію в розчині 15.67 мг/дм<sup>3</sup>) для розроблених матеріалів визначається характеристиками поверхні матеріалів ( $ВЕП = 74.6$  мДж/м<sup>2</sup>,  $R_a = 3.4$  мкм), особливостями їхньої структури ( $f_{Si} = 0.28$ , кількість кристалів ГАП = 60 об. % з розміром кристалів 1.0 мкм) і характером розчинення.

В результаті експериментального дослідження з використанням методів гістології встановлено, що матеріал АС3-5 є біосумісним, характеризується остеоіндуктивними і остеокондуктивними властивостями. Розроблений матеріал є перспективним при отриманні біосумісних імплантатів для заміщення дефектів кісткової тканини.

**Ключові слова:** склокристалічні матеріали, альбумін, вилугування, біорезорбція, структура, поверхня

### ВСТУП

За останні роки інтенсивно розвиваються напрямки науки і техніки, які спрямовані на створення функціональних імплантатів для відновлення структури та цілісності кісткової тканини людини. Ця першочергова задача програми охорони здоров'я та покращення якості життя людини пов'язана зі зростанням соціальних норм, спрямованих на збереження здорової нації [1].

Для вирішення вказаної задачі визначальним став підхід регенеративної медицини, що базується на використанні біорезорбуючих матеріалів, які здатні ініціювати регенерацію кісткової тканини і заміщатися новоствореною кісткою [2]. В рамках регенераційного підходу особливо актуальним є застосування органічних речовин для отримання біоматеріалів. Це дозволяє поліпшити не тільки їхню біосумісність, механічні властивості, а й досить часто

резорбцію хімічно стійкої неорганічної компоненти кістки – фосфатів кальцію, тобто компонентів, які складно розчиняються в організмі при імплантації [3]. Тому органічні компоненти кістки, яка складається з колагену I типу ( $\approx 95\%$ ), неколагенових білків (альбуміну – основна частина, протеогліканів, глікопротеїнів), глікозаміногліканів, органічних та нуклеїнових кислот і т.і., ефективно використовуються як при створенні біосумісних матеріалів, так і при прогнозуванні їхньої поведінки *in vivo*.

Одним з основних аспектів під час дослідження процесу кальцифікації біоматеріалів *in vivo* є встановлення механізму появи зародків нерозчинних форм фосфатів кальцію на поверхні біоматеріалів. Ця проблема містить цілий ряд фізико-хімічних і біохімічних аспектів. Відомі фізико-хімічні теорії пов'язують формування гетерогенних центрів зародження кристалів гідроксиапатиту (ГАП) на поверхні біоактивних матеріалів з трансформацією попередників кристалічного ГАП, таких як аморфний фосфат кальцію [4]. З урахуванням концентраційної теорії, яка дозволяє оцінити роль концентрації іонів кальцію і фосфатів в міжклітинній рідині, механізм зародження та росту кристалів досліджують в мінеральних кальційнасичених середовищах.

Однак, використання мінеральних розчинів виключає можливість вивчення ролі органічних компонентів в кальцифікації. Додавання органічних компонентів (білків: альбуміну, глобуліну та фібриногену) в ці середовища дозволить адекватно оцінити перебіг процесу кальцифікації в умовах, наближених до середовища живого організму. За результатами дослідження адсорбції бичачого сироваткового альбуміну на різних формах ГАП [5] встановлено, що альбумін краще адсорбується на голковидному ГАП, ніж на ГАП сферичної чи волокнистої форм. Встановлено, що введення іонів силіцію в кристалічну ґратку ГАП викликає зменшення розміру його кристалів майже в 3.5 рази та збільшення питомої поверхні майже в 4.5 рази, що дозволяє покращити здатність до адсорбції молекул альбуміну при порівнянні з немодифікованим ГАП [6].

Слід зауважити, що при вилугуванні катіонів кальцію у результаті взаємодії

біоактивного матеріалу з плазмою крові важливою є підтримка концентрації вільного «іонізованого» кальцію в чітко визначених межах [7]. При зниженні вмісту альбуміну в плазмі крові відповідно відзначається збільшення іонізованого кальцію (не зв'язаного з альбуміном), в той час як загальна його концентрація може знижуватися [8]. Альбумін зв'язує кальцій з дванадцятьма доступними катіон-зв'язуючими сайтами (угрупованнями). Лише катіон гідрогену є постійним джерелом конкуренції: сайти зв'язування кальцію стають менш доступними, а зв'язування альбуміну з кальцієм зменшується, збільшуючи тим самим кількість вільної фракції.

Тому дослідження взаємодії альбуміну з кальційфосфатосилікатними склокристалічними матеріалами медичного призначення є важливою науково-практичною задачею при оцінці здатності до регенерації кісткової тканини при ендопротезуванні.

#### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

**Постановка задачі та методика дослідження.** Метою роботи є встановлення впливу вилугування розроблених комплексних кальційфосфатосилікатних склокристалічних матеріалів та вільної енергії їх поверхні на здатність до зв'язування їх з альбуміном.

Для визначення концентрації іонів кальцію та зміни рН розчину як контрольний розчин обрана дистильована вода. Рівень резорбції дослідних скломатеріалів визначали за втратами маси після витримки у воді ( $V_{д.в}$ , мас. %) після однієї, п'яти та тридцяти діб.

Мікрорельєф поверхні досліджували за допомогою профілометра Surtronic 3+. Середнє значення відхилення профілю поверхні ( $R_a$ ) визначали відповідно до ГОСТ 2789-73.

На процес накопичення кальцію впливають фізико-хімічні властивості матеріалу (ступінь кристалічності, питома поверхня, гідрофобність, пористість) [9, 10]. Фізико-хімічні властивості поверхні, зокрема, вільна енергія поверхні (ВЕП), яка обумовлює ступінь контакту з фізіологічним середовищем, впливають на вибірковість до адсорбції і десорбції комплексів кальцію,

оскільки визначають характер розподілу центрів накопичення кальцію.

Авторами [11] встановлено умови забезпечення ВЕП в необхідних межах ( $60.0 \div 120.0$  мДж/м<sup>2</sup>) склокристалічних матеріалів, зокрема: ступінь зв'язності силіційкисневого каркаса  $f_{Si} = 0.28$ , тонкодисперсна поверхнева кристалізація ГАП з розміром кристалів  $1.0 \div 3.0$  мкм та шорсткість поверхні  $R_a = 3.4$  мкм. Разом з цим важливим фактором зв'язування кальцію з білком на поверхні біоактивних скло-матеріалів є їх здатність до вилуговування катіонів кальцію *in vivo*.

Значення ВЕП дослідних матеріалів після витримки в 10 % розчині альбуміну (альбумін людський 10 %, розчин для інфузій, виробник – компанія «Біофарма») впродовж 5 діб визначали за методом Оуенса–Вендта–Рабеля–Кабле, згідно з яким поверхнева енергія твердого тіла включає два компоненти: дисперсійну та полярну. Даний метод передбачає розрахунок ВЕП на основі кута контакту між поверхнею матеріалу та різними рідинами з наступним обчисленням двох її поверхневих компонентів за допомогою комп'ютерного програмного забезпечення Mathcad. Для підвищення точності отриманих значень було використано шість рідин з відомими полярними та неполярними компонентами поверхневого натягу [12, 13]. Вказані дослідження проводили на базі галузевої науково-дослідної лабораторії з випробування керамічних та скломатеріалів кафедри хімії та інтегрованих технологій Харківського національного університету міського господарства імені О.М. Бекетова (свідоцтво про відповідність системи вимірювань вимогам ДСТУ ISO 10012:2005 № 01-0130/2019).

Для визначення загального вмісту кальцію до 1 см<sup>3</sup> розчину, в якому зразки протягом 5 діб витримували в альбуміні, додавали 4 см<sup>3</sup> концентрованої нітратної кислоти і 5 см<sup>3</sup> води. Після цього підготовлені зразки розміщали в системі мікрохвильової обробки EthosEasy і проводили розкладання проби дією мікрохвильового випромінювання при 185 °С. Отримані розчини переносили в мірні колби і доводили водою до 15 см<sup>3</sup>. Для визначення вільного кальцію до 0.5 см<sup>3</sup>

розчинів додавали 4.5 см<sup>3</sup> 96 % етилового спирту, для видалення утвореного осаду проби відстоювали протягом 6 діб. Визначення масової частки кальцію в одержаних розчинах проводили методом полум'яної атомно-абсорбційної спектрометрії за допомогою приладу Agilent AA 240FS. Кількість зв'язаного кальцію визначали за різницею між загальною кількістю кальцію та кількістю вільного кальцію.

Для гістологічного дослідження виокремлювали прооперовану стегнову кістку щурів та фіксували в розчині 10 % нейтрального формаліну. Після декальцинації в 4 % розчині метанової кислоти препарувальною голкою видаляли імплантований зразок і вирізали дистальний метафіз. Зневоднення фрагмента кістки з ділянкою імплантації проводили в розчинах етилового спирту зі зростаючою концентрацією, після чого заливали матеріал у целоїдин. Виготовлені гістологічні зрізи завтовшки  $7 \div 10$  мкм забарвлювали гематоксиліном Вейгера й еозинном, пікрофуксином за Ван-Гізоном. Структуру клітин та міжклітинної речовини навколо ділянки імплантації аналізували у світловому мікроскопі Olympus BX63. Для фотографування використано цифрову камеру DP73 (Olympus) і програмне забезпечення «CellSensDimension 1.8.1» (Olympus, 2013). Дослідження проводили на базі лабораторії морфології сполучної тканини ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. Ситенка НАМН України.

**Вибір системи, розробка модельних стекол та матеріалів на їхній основі.** Для синтезу стекол як основи для створення біосумісних склокристалічних матеріалів, було обрано систему  $R_2O-CaF_2-RO-RO_2-R_2O_3-R_2O_5-MoO_3-SiO_2$  (табл. 1) та наповнювач  $ZrO_2$  у кількості 5 мас. ч. на 100 мас. ч. фрити.

Відомо, що ефективність використання кальційфосфатосилікатних скломатеріалів як кісткових ендопротезів пов'язана з їхньою здатністю до регенерації кісткової тканини у скорочений термін та механічними властивостями на рівні відповідних показників кісткової тканини. Це реалізується завдяки особливостям їхньої структури [14], зокрема, наявності у складі  $45 \div 50$  мол. %

оксиду кремнію, який дозволяє забезпечити високу біоактивність скломатеріалів завдяки гідролізу біостекол в міжтканинній рідині. Перебіг вказаного процесу приводить до утворення тонкого гелеподібного шару силікатної кислоти  $\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  на поверхні імплантату. Негативно заряджені

гідроксильні групи силікатної кислоти притягують з міжтканинної рідини іони  $\text{Ca}^{2+}$ , заряд поверхні набуває позитивного значення, потім на поверхню осаджуються фосфат-іони – спостерігається наростання шару нестехіометричного ГАП.

Таблиця 1. Характеристика вихідних стекол, мас. %

	Хімічний склад	Маркуванням стекол				
		АС-1	АС-2	АС-3	АС-4	АС-5
Склоутворювачі	$\sum(\text{SiO}_2 + \text{Al}_2\text{O}_3 + \text{B}_2\text{O}_3)$	57.0	57.0	54.0	56.0	53.0
Фазоутворювачі	$\sum(\text{CaO} + \text{CaF}_2)$	15.5	15.5	18.0	16.0	19.4
	$\text{P}_2\text{O}_5$	9.0	9.0	10.0	9.0	10.0
Модифікатори	$\text{R}_2\text{O} \sum(\text{Li}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{O} + \text{K}_2\text{O})$	11.0	12.0	11.5	11.5	10.5
	$\text{RO} \sum(\text{ZnO} + \text{MgO})$	4.0	2.0	3.1	3.4	2.6
	$\text{RO}_2 \sum(\text{ZrO}_2 + \text{CeO}_2 + \text{TiO}_2 + \text{MnO}_2)$	3.4	4.4	3.3	3.0	4.4
	$\text{MoO}_3$	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01
	$\text{V}_2\text{O}_5$	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02
Мікродобавки	$\text{La}_2\text{O}_3$	0.02	0.01	0.01	0.02	0.01
	$\text{RO} \sum(\text{CoO} + \text{SrO})$	0.04	0.03	0.05	0.03	0.05
	$\text{Cu}_2\text{O}$			0.01		

У лабораторних умовах виготовлено 5 складів кальційфосфатосилікатних модельних стекол з маркуванням АС за традиційною технологією, до якої входить шихтування сировинних матеріалів, варка модельних стекол у корундових тиглях при  $1250 \div 1350$  °С впродовж 6 годин та витримка за цих температур впродовж 0.5 год.

Особливістю структури дослідних стекол після варки є їхня інтенсивна кристалізація, яка визначається значним вмістом кристалічної фази ГАП у кількості  $20 \div 30$  об. %. Після термічної обробки дослідні склокристалічні матеріали серії АС характеризувалися вмістом кристалічної фази ГАП у кількості  $50 \div 60$  об. %.

Композиційні кальційфосфатосилікатні склокристалічні покриття з вмістом наповнювача діоксиду цирконію, стабілізованого ітрієм, мали маркування АС3-1, АС3-2, АС3-3, АС3-4 та АС3-5.

Для одержання комплексних склокристалічних матеріалів (СКМ) використовували порошки дослідних стекол, подрібнені до залишку не більше 5 % на ситі № 008, та порошок діоксиду цирконію, стабілізованого ітрієм, марки ДЦІ 1 (ТУ 344-2000). Дослідні зразки готували методом напівсухого ізостатичного

пресування ( $P = 35 \div 40$  МПа) у вигляді циліндрів діаметром 4 мм та висотою 10 мм з використанням як тимчасової зв'язки розчину карбоксиметилцелюлози. Термічну обробку зразків проводили в короткотривалому ( $\tau \approx 15$  хв) одностадійному низькотемпературному ( $750 \div 800$  °С) режимі.

#### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

##### *Дослідження впливу структури матеріалів на втрату маси при вилугуванні та вивільнення іонів кальцію.*

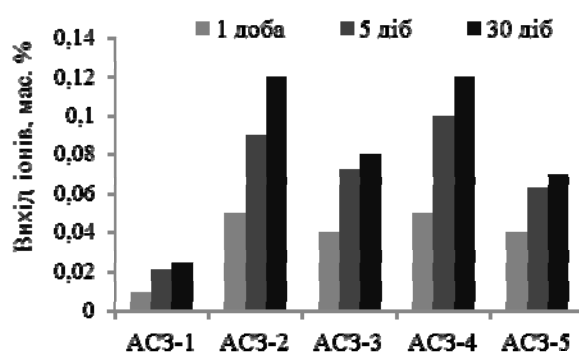
Дослідження резорбції дослідних матеріалів після 30 діб витримки у воді дозволили встановити, що найвищими значеннями втрати маси (табл. 2) характеризуються матеріали АС3-3 та АС3-5, зважаючи на найменший в серії вміст  $\text{SiO}_2$  та порівняно низький ступінь зв'язаності силіційкисневого каркаса  $f_{\text{Si}} = 0.28$ . Для матеріалів АС3-1, АС3-2 та АС3-4 зниження втрати маси у воді може вказувати на зменшення інтенсивності вилугування іонів зі структури скломатеріалів, у тому числі, за рахунок збільшення  $f_{\text{Si}}$  до 0.3. Для матеріалів АС3-3 та АС3-5 підвищення інтенсивності вилугування у ДВ може сприяти інтенсифікації перебігу процесу апатитоутворення на їхній поверхні *in vivo* у скорочений період.

Вихід іонів кальцію для дослідних матеріалів у воду визначаються здебільшого структурою і складом залишкової склофазы. Характерною ознакою для усіх дослідних

матеріалів є формування впродовж п'яти діб кремнеземистого шару, що підтверджується гальмуванням виходу іонів кальцію з п'ятої до тридцяті доби витримки (рис. 1).

**Таблиця 2.** Втрата маси та рН розчинів після витримки матеріалів серії АСЗ у дистильованій воді впродовж 30 діб

Показники	Матеріал				
	АСЗ-1	АСЗ-2	АСЗ-3	АСЗ-4	АСЗ-5
Ступінь зв'язності силіциумкисневого каркасу ( $f_{Si}$ )	0.30	0.30	0.28	0.30	0.28
Втрата маси зразків, мас. %	0.32	0.42	0.45	0.38	0.50
Значення рН розчинів	6.8	7.4	7.3	7.4	7.3



**Рис. 1.** Вихід іонів кальцію після витримки дослідних матеріалів у дистильованій воді

Зважаючи на те, що іони кальцію можуть взаємно заміщуватися з іонами натрію у гідратованому шарі, високий вміст іонів кальцію може бути інгібітором розчинення склофазы та, як наслідок, впливати на зменшення виходу фосфатних груп та гальмування резорбції. Це може спостерігатися для матеріалів АСЗ-2 та АСЗ-4, які характеризуються достатньо високим вмістом катіонів кальцію у розчині з рН  $\sim 7.4$  як після доби витримки у воді так і після 30 діб витримки. Для матеріалу АСЗ-1 незначний вихід іонів кальцію після однієї доби витримки не дозволяє забезпечити підвищення вказаного показника і на 30-ту добу, що не сприятиме утворенню стехіометричних зародків фосфатів кальцію на його поверхні за вказаний період.

Для матеріалів АСЗ-3 та АСЗ-5 оптимальний вихід іонів кальцію у воду на 30-ту добу впливає на забезпечення показника рН  $\sim 7.3$ , що дозволяє створити сприятливі умови кристалізації нестехіо-

метричного гідроксиапатиту (нГАП) на поверхні дослідних матеріалів *in vivo*.

**Дослідження впливу структури поверхні дослідних покриттів на значення їх вільної енергії поверхні.** Стимулювання процесу адсорбції протеїнів на поверхні розроблених склокристалічних матеріалів реалізується за рахунок забезпечення значень показника структурної міцності  $f_{Si} = 0.28 \div 0.30$  для модельних стекел серії АС та показника мікрошорсткості поверхні склокристалічних матеріалів серії АСЗ. Це дозволить забезпечити ріст показника ВЕП за рахунок підвищення електростатичної частки хімічного зв'язку у склі.

Найвищі значення ВЕП в межах  $\approx 70$  мДж/м<sup>2</sup> (табл. 3) характерні для матеріалів АСЗ-3 та АСЗ-5 з  $f_{Si} = 0.28$  та значеннями мікрошорсткості поверхні  $R_a$  близько 3 мкм з незначним розкидом висот для формування однорідної текстури, що здатна забезпечити утворення щільного апатитоподібного шару. А нижчі значення

ВЕР = 55.0÷65.0 мДж/м<sup>2</sup> є характерними для матеріалів АСЗ-1, АСЗ-2 та АСЗ-4 з  $f_{Si} = 0.30$  та  $R_a \approx 2$  мкм.

Значення дисперсійної складової ВЕР для усіх дослідних матеріалів неістотно різняться, на відміну від значень полярної складової, що є вагомим фактором при біологічних взаємодіях. Числові значення полярної складової ВЕР усіх дослідних

матеріалів превалюють над значеннями дисперсійної складової, що обумовлено збільшенням внеску полярних взаємодій в результаті сповільнення гідрофілізації поверхні [15]. Відомо, що на гідрофільній поверхні адсорбується менше альбуміну, ніж на гідрофобній [16]. Тому саме забезпечення гідрофобізації поверхні дослідних матеріалів дозволяє адсорбувати більше альбуміну.

**Таблиця 3.** Вільна енергія поверхні матеріалів

Матеріал	ВЕР, мДж/м <sup>2</sup>		
	полярна складова	дисперсійна складова	загальне значення
АСЗ-1	38.4	17.0	55.4
АСЗ-2	45.5	20.1	65.6
АСЗ-3	49.2	21.2	70.4
АСЗ-4	42.3	18.2	60.5
АСЗ-5	52.0	22.6	74.6

**Дослідження фракцій кальцію у розчині альбуміну після контакту з дослідними зразками.** Адсорбція, десорбція і конформаційні перебудови білкових компонентів крові, зокрема альбуміну, тісно пов'язані з процесом перерозподілу фракцій кальцію у результаті контакту біоактивних матеріалів з сироваткою крові. Перераховані явища можуть призводити до локальної зміни концентрації іонізованого кальцію поблизу поверхні зразку. Надлишок кальцію в сироватці крові призводить до конформаційних перебудов молекули альбуміну [17]. У результаті відбувається зміна в механізмі зв'язування кальцію білком, що збільшує кількість зв'язаного кальцію на одну молекулу білка.

Після витримки в 10 % розчині альбуміну дослідних матеріалів (А/АСЗ) впродовж 5 діб загальний вміст кальцію в розчині за тенденцією зростання корелює зі значеннями виходу катіонів кальцію у воду: найвищі його значення спостерігаються для розчину альбуміну після витримки матеріалу АСЗ-2 (А/АСЗ-2), найменші – для А/АСЗ-5 (табл. 4). Однак в процесі взаємодії дослідних матеріалів з розчином альбуміну при порівнянні з водою вихід вільного (іонізованого) кальцію значно змінюється. Лише для розчинів А/АСЗ-3 та більшою мірою для А/АСЗ-5 вміст зв'язаного кальцію дещо збільшується порівняно з розчином альбуміну, а вільного – зменшується. Для розчинів А/АСЗ-1, А/АСЗ-2 та А/АСЗ-4 даний ефект є протилежним.

**Таблиця 4.** Вміст форм кальцію після витримки дослідних матеріалів АСЗ в розчині альбуміну

Проба	Масова частка кальцію, мг/дм <sup>3</sup>		
	загальний	вільний	зв'язаний
Розчин альбуміну	16.9	4.95	11.95
Розчин А/АСЗ-1	17.0	12.3	4.7
Розчин А/АСЗ-2	43.8	35.8	8.0
Розчин А/АСЗ-3	24.3	11.4	12.9
Розчин А/АСЗ-4	45.7	36.5	9.2
Розчин А/АСЗ-5	20.3	4.43	15.87

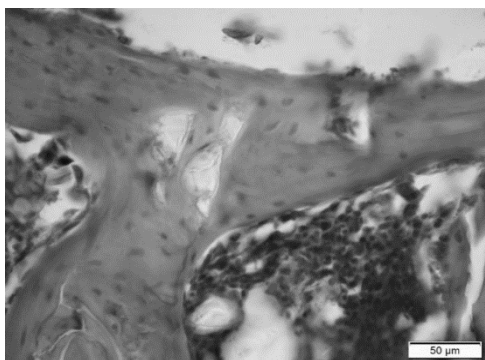
Процес зв'язування кальцію з альбуміном для дослідних матеріалів визначається характеристиками їх поверхні (ВЕР,  $R_a$ ), характером резорбції (вміст зв'язаного

кальцію у розчині), особливостями структури ( $f_{Si}$ , вміст та розмір кристалів ГАП).

Отже, адсорбція альбуміну, у тому числі за рахунок його зв'язування з кальцієм, на

поверхні розробленого матеріалу АСЗ-5 визначає здатність даного матеріалу до формування мінералізованого кальцій-фосфатного шару на його поверхні в скорочений термін. Підтвердженням цих висновків є поведінка матеріалу в умовах *in vivo*, що розглянуто нижче.

**Встановлення біосумісності розроблених матеріалів *in vivo*.** На основі даних гістологічних досліджень встановлено, що через 30 діб після операції навколо ділянки імплантації, по всій довжині її периметра відмічається утворення кісткової тканини (100 %, тобто збільшення її відносного вмісту в 1.3 рази), трабекули якої спрямовані вздовж поверхні введеного матеріалу. Слід зазначити, що мікрочастки остеопластичного матеріалу були «замуровані» у кісткових трабекулах, а також розміщувалися в червоному кістковому мозку міжтрабекулярних просторів (рис. 2).



**Рис. 2.** Фрагмент дистального метафізу стегнової кістки щура через 30 діб після введення зразка АСЗ-5 (збільшення 200; забарвлення гематоксилином та еозином; у кістковій тканині пластинчастої структури на межі з ділянкою імплантації розташовані частинки матеріалу АСЗ-5)

Відмінною особливістю матеріалу АСЗ-5 була його поступова резорбція з утворенням по периметру та в зовнішніх відділах кісткової тканини та проникненням у внутрішні ділянки тканинної рідини,

малодиференційованих клітин, фібробластів та сполучної тканини. Виявлено, що відносний вміст кісткової тканини в регенераті навколо досліджуваного зразка СКМ підвищувався зі збільшенням періоду спостереження та за результатами морфометричного аналізу на 14-ту добу в 2.71 рази перевищував показник 7-ої доби. Через 30 діб після імплантації зразки СКМ були оточені кістковою тканиною.

## ВИСНОВКИ

На основі кальційфосфатосилікатних стекел, легованих мікродобавками оксидів молібдену, ванадію, лантану, кобальту, стронцію та купруму, синтезовано резорбційні композиційні тонкодисперсні склокристалічні матеріали з вмістом біоактивної кристалічної фази гідроксиапатиту 50÷60 об. %. Встановлено, що розчинність дослідних матеріалів у дистильованій воді визначається ступенем зв'язаності силіційкисневого каркасу та вмістом фосфатів кальцію. Визначено, що оптимальний вихід іонів кальцію у воду на 30-ту добу впливає на забезпечення показника рН ~ 7.3 та створює сприятливі умови для мінералізації кісткової тканини на поверхні дослідних матеріалів *in vivo* в скорочений період. Процес зв'язування кальцію з альбуміном для дослідних матеріалів визначається особливостями їхньої структури, які суттєво впливають на характер вилуговування, та характеристиками поверхні.

У результаті гістологічного дослідження встановлено, що матеріал АСЗ-5 характеризується остеоіндуктивними й остеокондуктивними властивостями.

Впровадження даних біосумісних композиційних склокристалічних матеріалів дозволить підвищити адсорбцію протеїнів до їхньої поверхні та скоротити строки зрощування біоматеріалу з кісткою.

## Influence of calciumphosphate-silicate glass-ceramic materials on the capability to bind albumin *in vitro* and *in vivo* biocompatibility

O.V. Savvova, V.M. Shimon, O.V. Babich, O.I. Fesenko, A.A. Sheregiy

*O.M. Beketov National University of Urban Economy in Kharkiv  
17 Marshala Bazhanova Str., Kharkiv, 61002, Ukraine*

*State Institution of Higher Education «Uzhhorod National University»  
3 Narodna Square, Uzhhorod, 88000, Ukraine*

*Ukrainian Scientific Research Institute of Ecological Problems  
6 Bakulina Str., Kharkiv, 61166, Ukraine, fesenco\_alex@ukr.net*

*These studies are aimed on the development of bioactive complex glass-ceramic calcium-phosphate-silicate materials, which are characterized by a reduced fusion with bone tissue *in vivo*. The aim of this work is to determine the effect of the level of resorption of complex calcium-phosphate-silicate materials and free surface energy on the nature of their binding to albumin *in vitro*.*

*The calcium ion yield from the material after exposure to distilled water, after one, five, and 15 days, and after exposure in 10 % -albumin solution, after 5 days, was carried out by flame atomic absorption spectrometry using an Agilent AA 240FS device. The surface microrelief was evaluated by the average mean of the profile ( $R_a$ ) and determined using a Surtronic 3+ profilometer. The value of the free energy of the surface for complex materials was determined after exposure to albumin by the Owens–Wendt–Rabel–Kaelble method. Histological examinations were performed using an Olympus BX63 light microscope. The structure of cells and intercellular fluid was recorded using a digital camera DP73 (Olympus) and software “Cell Sens Dimension 1.8.1”. Samples of the femur of rats, 30 days after implant implantation, which was made of the developed glass-ceramic material, were stained with Weigertpicro-fuchsin and eosin, Van Giesonpicro-fuchsin.*

*To obtain the initial model glasses, the  $R_2O-CaF_2-RO-RO_2-R_2O_3-R_2O_5-MoO_3-SiO_2$  system was selected as the basis of glass-ceramic materials, and 5 compositions were synthesized at the temperature of 1250–1350 °C. To obtain combined glass-ceramic materials, model glass powders were used with addition of 5 wt. % (per 100 wt. % model glass) yttrium stabilized zirconia (DTS 1). The powders were pressed using carboxymethyl cellulose as a binder and fired at 750–800 °C for 15 minutes. The samples obtained were characterized by the presence of hydroxyapatite crystals in an amount of 50–60 vol. %.*

*The solubility of the developed materials in water is determined by the properties of the glass-phase (the degree of silicon-oxygen skeleton bonding) and the hydroxyapatite content has been found. The process of binding calcium to albumin (the mass fraction of bound calcium in a solution of 15.67 mg/dm<sup>3</sup>) for the developed materials is determined by the characteristics of the surface of the materials ( $FSE = 74.6 \text{ mJ/m}^2$ ,  $R_a = 3.4 \text{ mcm}$ ), the features of their structure ( $f_{Si} = 0.28$ , the number of HA crystals = 60 vol. %, with a crystal size of 1.0  $\mu\text{m}$ ) and the nature of dissolution. An *in vivo* study of the samples confirmed the possibility of creating biocompatible materials with a reduced splicing time with bone tissue.*

*As a result of an experimental study using histological methods, it has been determined that the ASZ-5 material is biocompatible, characterized by osteoinductive and osteoconductive properties.*

**Keywords:** glass-ceramic materials, albumin, leaching, bioresorption, structure, surface



## Влияние выщелачивания кальцийфосфатосиликатных стеклокристаллических материалов на способность к связыванию с альбумином *in vitro* и биосовместимость *in vivo*

А.В. Саввова, В.М. Шимон, Е.В. Бабич, А.И. Фесенко, А.А. Шерегий

Харьковский национальный университет городского хозяйства им. А.М. Бекетова  
ул. Маршала Бажанова, 17, Харьков, 61002, Украина  
Государственное высшее учебное заведение «Ужгородский национальный университет»  
пл. Народная, 3, Ужгород, 88000, Украина  
Украинский научно-исследовательский институт экологических проблем  
ул. Бакулина, 6, Харьков, 61166, Украина, fesenco\_alex@ukr.net

Целью данной работы является определение влияния выщелачивания композиционных биоактивных материалов и свободной энергии поверхности на характер связывания поверхности с альбумином *in vitro*.

Выход ионов кальция из материала после выдержки в дистиллированной воде и 10 % растворе альбумина определяли методом пламенной атомно-абсорбционной спектрометрии с помощью прибора Agilent AA 240FS. Микрорельеф поверхности оценивали по показателю среднего арифметического отклонения профиля ( $R_a$ ) и определяли с помощью профилометра Surtronic 3+. Значение свободной энергии поверхности композиционных материалов определяли по методу Оуенса–Вендета–Рабеля–Каэбле после выдержки в альбумине. Гистологические исследования образцов бедренной кости крыс, через 30 суток после внедрения имплантата из разработанного материала проводили с помощью светового микроскопа Оlymtrus ВХ63 и фиксировали с помощью цифровой камеры DP73 (Olymtrus).

В работе были использованы разработанные нами ранее композиционные биоактивные материалы, на основе порошков кальцийфосфатосиликатных стекол, легированных микродобавками оксидов молибдена, ванадия, лантана, кобальта, стронция и меди с добавлением 5 мас. ч. диоксида циркония (марка ДЦИ 1). Материалы прессовали с использованием как связующего раствора карбоксиметилцеллюлозы и обжигали при 750–800 °С в течение 15 мин. Полученные образцы характеризовались наличием тонкодисперсных кристаллов гидроксиапатита в количестве 50–60 об. %.

Установлено, что растворимость разработанных материалов в воде определяется свойствами стеклофазы (степенью связности кремний кислородного каркаса  $f_{Si}$ ) и содержанием гидроксиапатита. Процесс связывания кальция с альбумином (массовая часть связанного кальция в растворе 15.67 мг/дм<sup>3</sup>) для разработанных материалов определяется характеристиками поверхности материалов ( $CЭП = 74.6$  мДж/м<sup>2</sup>,  $R_a = 3.4$  мкм), особенностями их структуры ( $f_{Si} = 0.28$ , количество кристаллов ГАП = 60 об. % с размером кристаллов 1.0 мкм) и характером растворения.

В результате экспериментального исследования с использованием методов гистологии установлено, что материал АС3-5 является биосовместимым, характеризуется остеоиндуктивными и остеокондуктивными свойствами. Разработанный материал является перспективным при получении биосовместимых имплантатов для замещения дефектов костной ткани.

**Ключевые слова:** стеклокристаллические материалы, альбумин, выщелачивание, биорезорбция, структура, поверхность

### ЛІТЕРАТУРА

1. Savvova O., Babitch O., Fesenko O. et al. Biocompatible glass-ceramic coatings. Calcium-phosphate-silicate coatings on titanium for dental implants. – Riga: SIA OmniScriptum Publishing, 2018. – 67 p.
2. Rey C., Combes C., Drouet C., Glimcher M.J. Bone mineral: update on chemical composition and structure // Osteoporos. Int. – 2009. – V. 20, N 6. – P. 1013–1021.
3. Martínez-Vázquez F.J., Cabañas M.V., Paris J.L. et al. Fabrication of novel Si-doped hydroxyapatite/gelatin scaffolds by rapid prototyping for drug delivery and bone regeneration // Acta Biomater. – 2015. – V. 15. – P. 200–209.
4. Savvova O.V., Bragina L.L., Shadrina G.N. et al. Surface properties of biocompatible calcium-silicon-phosphate glass ceramic materials and coatings // Glass Ceram. – 2017. – V. 74, N 1. – P. 29–33.

5. Sanjaya K.S., Debasish S. Study of BSA protein adsorption/release on hydroxyapatite nanoparticles // *Appl. Surf. Sci.* – 2013. – V. 286. – P. 99–103.
6. Ле Ван Тхуан, Трубицын М.А., Габрук Н.Г. и др. Исследование особенностей сорбции альбумина на синтетических наноразмерных кремнийзамещенных гидроксиапатитах // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2015. – Т. 15, № 1. – С. 100–109.
7. Gonyar L.A., Gray M.C., Christianson G.J. et al. Albumin, in the presence of calcium, elicits a massive increase in extracellular bordetella adenylate cyclase toxin // *Infect Immun.* – 2017. – V. 85, N 6. – P. 1–19.
8. Allison S.P., Lobo D.N. Albumin administration should not be avoided // *Crit. Care.* – 2000. – V. 4, N 3. – P. 147–150.
9. Wang K., Zhou Ch. A review of protein adsorption on bioceramics // *Interface Focus.* – 2012. – V. 2, N 3. – P. 259–277.
10. Clase C.M., Norman G.L., Beecroft M.L., Churchill D.N. Albumin-corrected calcium and ionized calcium in stable haemodialysis patients // *Nephrology Dialysis Transplantation.* – 2000. – V. 15, N 11. – P. 1841–1846.
11. Savvova O., Shadrina G., Babich O., Fesenko O. Investigation of surface free energy of the glass – ceramic coatings for medical purposes on titanium // *Chem. Chem. Technol.* – 2015. – V. 9, N 3. – P. 349–354.
12. Anil S., Anand P.S., Alghamdi H., Jansen J.A. Implant dentistry – a rapidly evolving practice. Ch. 3 // *Dental Implant Surface Enhancement and Osseointegration.* – Rijeka: InTech, 2011. – P. 83–108.
13. Яковец Н.В., Крутько Н.П., Опанасенко О.Н. Определение свободной поверхностной энергии порошкообразных смолисто-асфальтовых веществ методом Оуэнса–Вендта–Рабеля–Каелбле // Свиридовские чтения. – 2012. – Вып. 8. – С. 253–260.
14. Savvova O.V., Babich O.V., Shadrina G.N. Effect of nucleation mechanism on the structure of polyfunctional calcium phosphate glass materials // *Funct. Mater.* – 2014. – V. 21, N 4. – P. 421–426.
15. Gerhardt Lutz-Christian, R. Boccaccini Aldo. Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering // *Materials.* – 2010. – V. 3, N 7. – P. 3867–3910.
16. Друшляк И.В. Адсорбция альбумина человека на поверхность биоматериалов с различными физико-химическими и гемосовместимыми свойствами: дис. канд. физ. – мат. наук. 03.00.02 / Московский ордена трудового красного знамени физико-технический институт. – Москва, 1997. – 24 с.
17. Саркисов П.Д. Биосовместимость. – Москва: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 1999. – 368 с.

#### REFERENCES

1. Savvova O., Babich O., Fesenko O., Bragina L., Voronov H. *Biocompatible glass-ceramic coatings. Calcium-phosphate-silicate coatings on titanium for dental implants.* (Riga: SIA Omni Scriptum Publishing, 2018).
2. Rey C., Combes C., Drouet C., Glimcher M.J. Bone mineral: update on chemical composition and structure. *Osteoporos. Int.* 2009. **20**(6): 1013.
3. Martínez-Vázquez F.J., Cabañas M.V., Paris J.L., Lozano D., Vallet-Regí M. Fabrication of novel Si-doped hydroxyapatite / gelatine scaffolds by rapid prototyping for drug delivery and bone regeneration. *Acta Biomater.* 2015. **15**: 200.
4. Savvova O.V., Bragina L.L., Shadrina G.N., Babich E.V., Fesenko A.I. Surface properties of biocompatible calcium-silicon-phosphate glass ceramic materials and coatings. *Glass Ceram.* 2017. **74**(1): 29.
5. Sanjaya K.S., Debasish S. Study of BSA protein adsorption/release on hydroxyapatite nanoparticles. *Appl. Surf. Sci.* 2013. **286**: 99.
6. Le Van Thuan, Trubitsyn M.A., Gabruk N.G., Doan Van Dat, Oleynikova I.I., Gudkova E.A., NguenFuk Kao, Fam ThiThuan. Investigation of the features of sorption of albumin on synthetic nanosized silicon-substituted hydroxyapatites. *Sorption and chromatographic processes.* 2015. **15**(1): 100.
7. Gonyar L.A., Gray M.C., Christianson G.J., Mehrad B., Hewlett L.E. Albumin, in the presence of calcium, elicits a massive increase in extracellular bordetella adenylate cyclase toxin. *Infect Immun.* 2017. **85**(6): 1.
8. Allison S.P., Lobo D.N. Albumin administration should not be avoided. *Crit. Care.* 2000. **4**(3): 147.
9. Wang K., Zhou Ch. A review of protein adsorption on bioceramics. *Interface Focus.* 2012. **2**(3): 259.
10. Clase C.M., Norman G.L., Beecroft M.L., Churchill D.N. Albumin-corrected calcium and ionized calcium in stable haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2000. **15**(11): 1841.
11. Savvova O., Shadrina G., Babich O., Fesenko O. Investigation of surface free energy of the glass – ceramic coatings for medical purposes on titanium. *Chem. Chem. Technol.* 2015. **9**(3): 349.
12. Anil S., Anand P.S., Alghamdi H., Jansen, J.A. Implant dentistry – a rapidly evolving practice. Ch. 3. In: *Dental Implant Surface Enhancement and Osseointegration.* (Rijeka: InTech, 2011).

13. Yakovets N.V., Krutko N.P., Opanasenko O.N. Determination of the free surface energy of powdered resinous asphaltene substances by the Owens – Wendt – Rabel – Kaelble method. *Sviridov readings*. 2012. **8**: 253. [in Russian].
14. Savvova O.V., Babich O.V., Shadrina G.N. Effect of nucleation mechanism on the structure of polyfunctional calcium phosphate glass materials. *Funct. Mater.* 2014. **21**(4): 421.
15. Gerhardt Lutz-Christian, R. Boccaccini Aldo. Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Materials*. 2010. **3**(7): 3867.
16. Drushlyak I.V. Ph.D. (Phys.–Math.) Thesis. (Moscow, 1997). [in Russian].
17. Sarkisov P.D. *Biocompatibility*. (Moscow: Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, 1999).

Надійшла 11.11.2019, прийнята 25.05.2020