

INTERAKCE BIOMATERIÁLŮ SE SIMULOVANÝM TĚLNÍM PROSTŘEDÍM

JAKUB STRNAD, ALENA SKRČENÁ,
JIRÍ PROTIVÍNSKÝ a ALEŠ HELEBRANT

Ústav skla a keramiky, Vysoká škola chemicko-technologická
v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
e-mail: ales.helebrant@vscht.cz

Došlo dne 1.III.2002

Klíčová slova: biomateriály, hydroxyapatit, titan, křemenné sklo

Obsah

1. Úvod
2. Materiály a metody
3. Výsledky
4. Diskuse
5. Závěr

1. Úvod

Jako bioaktivní se označují materiály (bioskla, některé druhy sklokeramiky, chemicky upravený titan), jež vytvářejí vazbu s kostní tkání prostřednictvím vrstvy kostního apatitu, která se tvoří na jejich povrchu po implantaci¹. Proces nukleace a růst krystalů apatitu je iniciován iontovou interakcí mezi bioaktivním materiálem a krví a může být reprodukován v simulované tělní tekutině (SBF – Simulated Body Fluid) (cit.²).

Expozice v SBF je nejčastěji prováděna jako statický experiment, kdy je vzorek umístěn v roztoku o konstantním objemu, nebo je roztok periodicky obnovován³. Je-li poměr povrchu vzorku k objemu roztoku (S/V) dostatečně nízký k udržení konstantních podmínek během expozice, lze obtížně detegovat změny ve složení roztoku způsobené interakcí materiál–SBF. V případě vysokého poměru S/V jsou koncentrační změny měřitelné, dochází však ke změně složení roztoku a ke snížení hnací síly pro nukleaci a růst krystalů apatitu v důsledku přechodu iontů z roztoku do pevné fáze⁴. Statická expozice také méně odpovídá podmínkám při implantaci, kde vždy dochází k proudění tělní tekutiny podél povrchu implantátu.

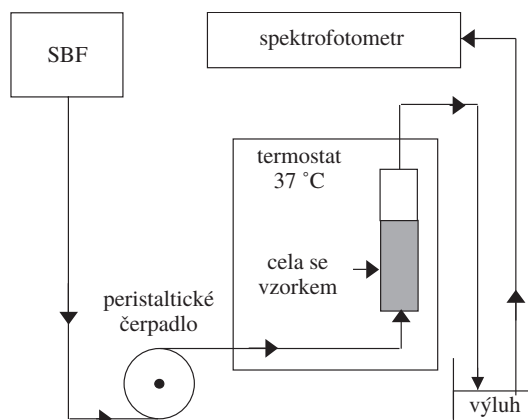
Lze předpokládat, že dynamické uspořádání expozice (tj. v proudící kapalině) poskytne konstantní podmínky interakce materiál–SBF a umožní detekci změn ve složení roztoku během prvních fází interakce.

Cílem práce bylo navrhnout testovací metodu pro biomateriály, která by lépe simulovala interakci mezi povrchem implantátu a tělními tekutinami než dosud používané testy a ověřit schopnost této metody rozlišit materiály bioaktivní a bioinertní.

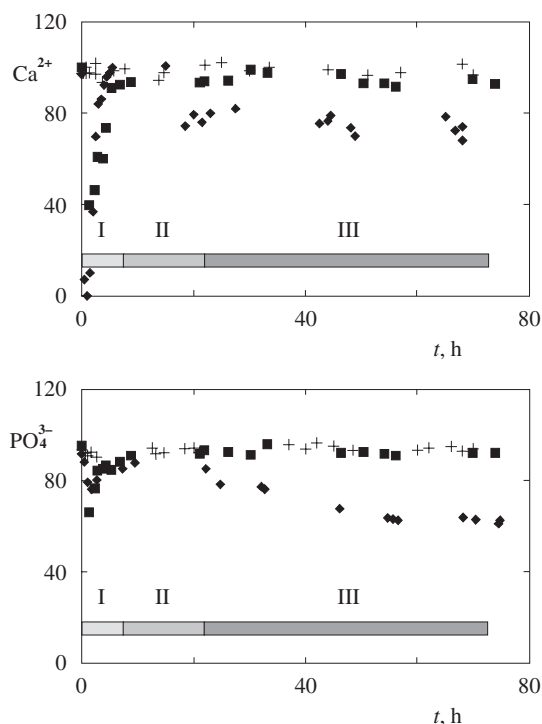
2. Materiály a metody

Při experimentech byly použity vzorky bioaktivního titanu (Ti-bio), gelu TiO₂, slinovaného syntetického hydroxyapatitu (HA1100) a sušeného hydroxyapatitu (HA120). Jako referenční vzorky byly použity obrobený čistý titan (c.p. Ti, grade 3) a drť křemenného skla. Ti-bio vzorky byly připraveny jako třísky z obrábění, omyty v isopropylalkoholu v ultrazvukové myčce, vysušeny na 120 °C, leptány v 2% HF a následně 12 hodin v 5 M-NaOH při 60 °C. Titaničitý gel byl připraven smísením tetrabutyl-orthotitanátu s ethanolom, vodou a kyselinou chlorovodíkovou v molárním poměru 1:47:0,57:0,11. Následně byl vysušen při teplotě 135 °C. Před interakcí s SBF nebyl gel nijak chemicky upravován. Vzorky čistého titanu (Ti) byly ve formě třísek z obrábění, omyté v isopropylalkoholu bez další povrchové úpravy. Vzorky hydroxyapatitu byly připraveny srážením z vodného roztoku a sušením při teplotě 120 °C (HA120) nebo následně slinováním při 1100 °C (HA1100). Zrnitost drtí byla v rozsahu 0,6–1 mm. Velikost povrchu vzorků byla určena adsorpcí kryptonu (vyhodnocení metodou B.E.T). Vzorky bioaktivního titanu (Ti-bio) vykázaly řádově vyšší velikost povrchu (0,4392 m².g⁻¹) než vzorky čistého titanu (0,013 m².g⁻¹). Rovněž vzorek drtě HA120 (93,69 m².g⁻¹) měl významně větší povrch než slinovaný vzorek HA1100 (0,002 m².g⁻¹). U vzorků hydroxyapatitu byla rovněž určena porozita rtuťovou porozimetrií (HA120 – 65 %, HA1100 – 7 %).

Vzorky byly exponovány v roztoku SBF, který byl připraven z následujících chemikálií: KCl, NaCl, NaHCO₃, MgSO₄.7H₂O, CaCl₂, TRIS, NaN₃, KH₂PO₄. Roztok obsahoval 142 mmol.l⁻¹ Na⁺, 5 mmol.l⁻¹ K⁺, 2,5 mmol.l⁻¹ Ca²⁺, 1 mmol.l⁻¹ Mg²⁺, 131 mmol.l⁻¹ Cl⁻, 5 mmol.l⁻¹ HCO₃⁻, 1 mmol.l⁻¹ SO₄²⁻, 1 mmol.l⁻¹ HPO₄²⁻. Tlumící roztok TRIS byl použit k nastavení pH na 7,55–7,60 při 25 °C a azid sodný k inhibici bakteriálního růstu. Vzorky byly exponovány v průtočné cele, kterou protékal konstantním průtokem 0,042 ml.min⁻¹ roztok SBF předehřátý na 37 °C (obr. 1). Vzorky roztoku na výstupu z cely byly odebrány k analýze koncentrace iontů Ca²⁺ atomovou absorpční spektroskopií a iontů PO₄³⁻ spektro-



Obr. 1. Experimentální uspořádání průtočného testu



Obr. 2. Časová závislost koncentrace iontů Ca^{2+} a PO_4^{3-} (mg.l^{-1}) v roztoku SBF na výstupu z cely při expozici vzorků čistého titanu (c.p.Ti), bioaktivního titanu (Ti-bio) a gelu TiO_2 s označením tří fází interakce (I, II, III); ♦ Ti-bio, + c.p.Ti, ■ gel TiO_2

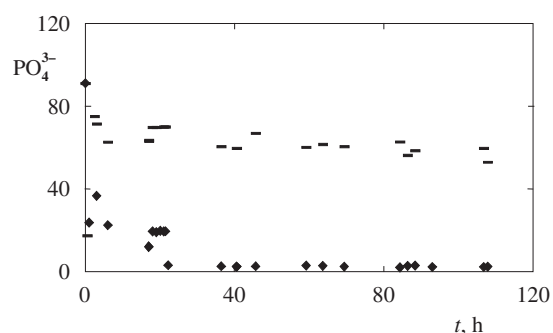
fotometricky. Po expozici byla provedena povrchová analýza vzorků elektronovou mikrosondou (SEM-EDS).

3. Výsledky

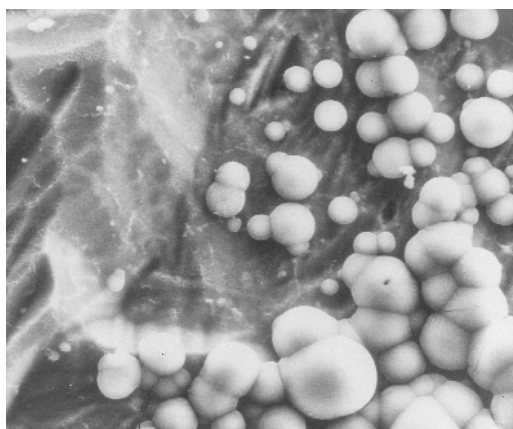
Na časových závislostech koncentrace iontů Ca^{2+} a PO_4^{3-} změřených na výstupu z cely při expozici vzorků Ti-bio bylo možné sledovat tři hlavní fáze (obr. 2). Na počátku interakce materiálu s roztokem došlo k rychlému, avšak dočasněmu poklesu koncentrací obou iontů v SBF. Během druhé fáze došlo k návratu koncentrací přibližně na původní hodnoty ($100 \text{ mg.l}^{-1} \text{Ca}^{2+}$, $88 \text{ mg.l}^{-1} \text{PO}_4^{3-}$). Po indukční době přibližně 25 hodin byl detegován další pokles koncentrace, který se zastavil na hodnotě $60\text{--}63 \text{ mg.l}^{-1} \text{PO}_4^{3-}$. Toto ustálení poklesu indikovalo spotřebu iontů z roztoku konstantní rychlostí, způsobenou růstem krystalů kostního apatitu. Křivka pro gel TiO_2 ukazuje pokles a následný vzestup obou koncentrací na počátku expozice. Po 10 hodinách setrvává koncentrace obou stanovených prvků na zhruba konstantní hodnotě $91\text{--}92 \text{ mg.l}^{-1}$.

Během expozice bioinertních vzorků (čistý titan, křemenné sklo) nebyly detegovány žádné významné rozdíly vstupních a výstupních koncentrací iontů Ca^{2+} a PO_4^{3-} (obr. 2).

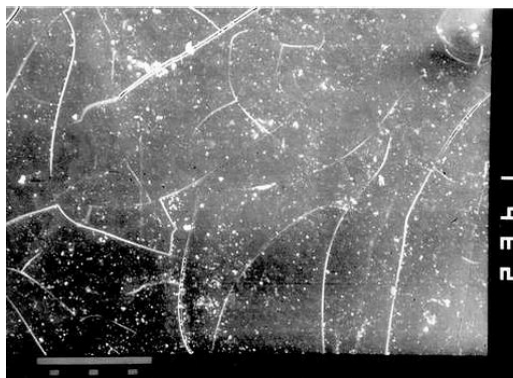
Časové závislosti změřené při expozici vzorků hydroxyapatitu (HA120 a HA1100) vykazovaly podobný průběh jako při expozici vzorků Ti-bio, avšak k precipitaci kostního apatitu docházelo po kratších indukčních dobách a významný počáteční pokles a následný vzrůst koncentrace sledovaných složek zaznamenaný nebyl (obr. 3).



Obr. 3. Časová závislost koncentrace iontů PO_4^{3-} (mg.l^{-1}) v roztoku SBF na výstupu z cely při expozici vzorků hydroxyapatitu; ♦ HA120 a – HA1100



Obr. 4. Snímek apatitových sférolitů vytvořených na povrchu bioaktivního titanu po 74 hodinách expozice v SBF (SEM, zvětšení 1000)



Obr. 5. Snímek povrchu gelu TiO_2 po 72 hodinách expozice v SBF (SEM, zvětšení 1000)

Vzorky titanu exponované v SBF byly analyzovány pomocí SEM-EDS. Apatitové krystaly vytvořené na povrchu vzorku Ti-bio ukazuje obr. 4. V tabulce I jsou shrnuty výsledky analýzy SEM-EDS pro vzorky Ti-bio, c.p.Ti a gelu TiO_2 po expozici v roztoku SBF. Pro vzorek Ti-bio z ní vyplývá poměr Ca/P rovný 1,74. Tato hodnota je blízká poměru Ca/P v hydroxyapatitu.

Tabulka I

Množství vápníku a fosforu (at.%) detegované na povrchu vzorků c.p.Ti, Ti-bio a gelu TiO₂ po 2 minutách, 20 a 74 hodinách expozice v SBF (SEM-EDS, zbytkové prvky jsou titan a kyslík)

Čas	Ti-Bio		c.p. Ti		Gel TiO ₂	
	Ca	P	Ca	P	Ca	P
2 min	1,4	ND ^a	ND ^a	ND ^a	–	–
20 h	6,7	0,7	ND ^a	ND ^a	–	–
74 h	23,0	13,2	–	–	22,6	0,0

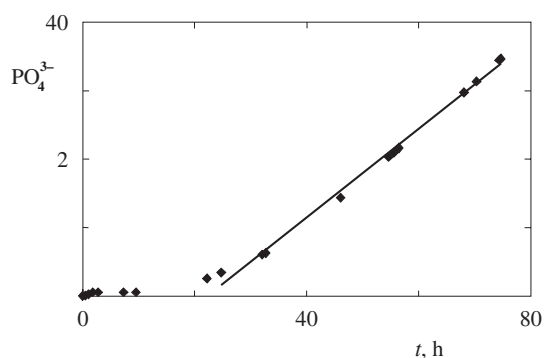
^a Hodnoty nebyly stanoveny

Také povrch gelu TiO₂ byl sledován pomocí metody SEM a EDS. Mikroanalýzou bylo stanoveno množství vápníku a fosforu na jeho povrchu po expozici v SBF (obr. 5, tab. I).

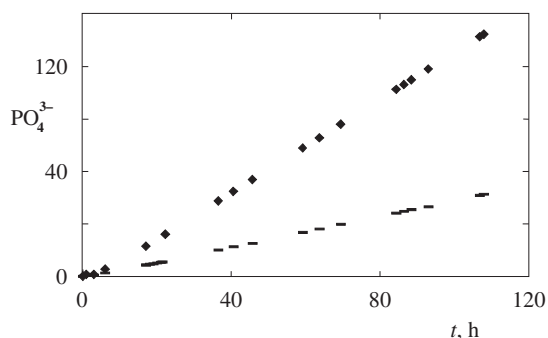
4. Diskuse

V případě vzorků Ti-bio ukazovaly měřené křivky časové závislosti výstupní koncentrace z cely významné zachycení vápenatých a fosforečnanových iontů povrchem vzorku (obr. 2). To může být způsobeno iontovou adsorpcí na povrch hydratované gelové vrstvy TiO₂ vytvořené úpravou vzorku v alkalickém prostředí. Toto zjištění je v souladu s výsledky Kokuba a spol.², kteří detegovali elektronovou mikroanalýzou vápník na povrchu alkalicky upraveného titanu již po 0,5 h expozice v SBF. Přítomnost vápníku a stop fosforu na povrchu vzorků Ti-bio byla potvrzena i elektronovou mikroanalýzou (tab. I). Podstatný pokles koncentrace v SBF v případě Ti-bio v porovnání s čistým titanem může být způsoben přibližně o 2 řády větším povrchem vzorku Ti-bio interagujícího s SBF. Elektronová mikroanalýza však nepotvrdila přítomnost vápníku na povrchu čistého titanu po 2 minutách ani po 20 hodinách (tab. I), a ani po 74 hodinách nedošlo k precipitaci kostního apatitu. Podobné inertní chování vykazoval při expozici v SBF i vzorek křemenného skla.

Analýza roztoku v průběhu interakce gelu TiO₂ ukázala v počátečním stadiu úbytek iontů Ca²⁺ i PO₄³⁻ (obr. 2), který nasvědčoval tomu, že došlo k adsorpci vápenatých a fosforečnanových iontů z roztoku na povrch gelu. Elektronovou mikroanalýzou byl ale na povrchu gelu detegován pouze ion Ca²⁺. Vzhledem k tomu, že nebyl detegován žádný fosfor, předpokládáme, že doba expozice nebyla dostatečná k vytvoření nukleí HA. Tento fakt naznačuje buď srážení fosforečnanů mimo povrch vzorku, případně na místě, které nebylo analyzováno elektronovým paprskem. Je ovšem nutno mít na paměti i skutečnost, že při dynamickém testu bylo použito nízkého průtoku (0,042 ml.h⁻¹), a tak bylo pro analýzu změn v SBF k dispozici velmi malé množství roztoku. Pro spektrofotometrické stanovení bylo nutno ještě toto množství zředit. Absorbance tak byla měřena na hranici stanovitelnosti a zjištěná koncentrace iontů PO₄³⁻ může být zatížena značnou chybou. Jednoznačně je ovšem možné říci, že po adsorpci iontů nenastala ve sledovaném časovém období nukleace HA na povrchu vzorku. Tento fakt je v souladu se závěry předchozí práce⁶,



Obr. 6. Časová závislost množství iontů PO₄³⁻ (mg) spotřebovaných při precipitaci apatitu na povrchu vzorku Ti-bio



Obr. 7. Časová závislost hmotnosti iontů PO₄³⁻ (mg) spotřebovaných při precipitaci apatitu na povrchu vzorků; — HA120 a ♦ HA1100

kteří ukázala, že na srážení HA na povrchu materiálů má větší význam jeho schopnost zvýšit lokální přesycení u povrchu než samotná schopnost adsorpcí složek z roztoku.

Rychlá iontová adsorpce byla také detegována v případě vzorků HA120 a HA1100. Indukční čas, po kterém nastal růst krystalů kostního apatitu, byl však v tomto případě podstatně kratší než v případě vzorků Ti-bio, kde je tato hodnota 24,5 h. Indukční časy pro HA120 a HA1100 jsou 3,8 h, respektive 2,5 h. Lze předpokládat, že rychlá iontová adsorpce vápenatých a fosforečnanových iontů může být první fází procesu tvorby vazby mezi bioaktivním materiálem a kostní tkání. Indukční čas, charakterizující rychlost nukleace HA, po kterém začíná růst krystalů kostního minerálu, závisí na mezifázové energii mezi precipitující fází a substrátem⁶⁻⁸ a může být využit pro kvantifikaci bioaktivního chování studovaného substrátu.

Extrémně dlouhá indukční doba růstu krystalů apatitu (4 týdny), kterou v případě čistého titanu zjistili Li a Ducheyne⁹, může být ve shodě s klinicky pozorovaným chováním čistého titanu, který se jeví jako bioinertní materiál, avšak po delších dobách vhojení a za ideálních podmínek (primární stabilita implantátu, dokonalá kongruence kostního lože) vykazuje schopnost pevného spojení s kostí – tzv. osseointegraci¹⁰.

Dynamické experimentální uspořádání umožnilo jednoduché určení indukčních časů pomocí časové závislosti hmotnosti iontů PO₄³⁻, spotřebovaných při precipitaci apatitu, a její

extrapolací do nulové hodnoty (obr. 6, 7). Hodnota zjištěná pro vzorek Ti-bio (24,5 h) je v dobré shodě s hodnotou určenou při statické expozici stejně upravených vzorků⁶. Indukční čas vzorků hydroxyapatitu byl významně kratší než v případě bioaktivního titanu. To lze vysvětlit větší strukturální podobností precipitující fáze a substrátu v případě, kdy substrátem je syntetický hydroxyapatit. Vyšší rychlost spotřeby iontů PO_4^{3-} precipitací apatitu u vzorku HA120 v porovnání s HA1100 je možné vysvětlit větší plochou povrchu v kontaktu s roztokem (obr. 7).

5. Závěr

Dynamické uspořádání testu v simulované tělní tekutině je vhodné k detekci koncentračních změn v roztoku. Na základě časové závislosti výstupní koncentrace z cely je možné interakci bioaktivního titanu s SBF rozdělit do tří základních fází – *I.* adsorpce vápenatých a v menší míře fosforečnanových iontů materiálem, *II.* indukční doba, *III.* růst krystalů kostního apatitu. Zjištěná schopnost rychlé iontové adsorpce může mít významný vliv na pozdější adsorpci biomolekul, jako např. aminokyselin a proteinů, a může tak ovlivnit či přímo předurčit biokompatibilitu a bioaktivitu materiálu ještě předtím, než dojde k růstu krystalů kostního apatitu. Dynamické uspořádání expozice rovněž umožňuje vyhodnocení parametrů precipitace (indukční doba, rychlost růstu), které mohou být použity k odhadu bioaktivity studovaného materiálu.

Studie vznikla jako součást výzkumného záměru Příprava a vlastnosti moderních materiálů – modelování, charakterizace, technologie (MSM 223100002). Zčásti byla podpořena i Ministerstvem průmyslu a obchodu ČR (FB-CV/64/98).

LITERATURA

1. Kokubo T., Miyaji F., Kim H. M., Nakamura T.: J. Am. Ceram. Soc. 79, 1127 (1996).
2. Kokubo T., Kushitani H., Sakka S., Kitsugi T., Yamamuro T.: J. Biomed. Mat. Res. 24, 721 (1990).
3. Hata K., Kokubo T., Nakamura T., Yamamuro T.: J. Am. Ceram. Soc. 78, 1049 (1995).

4. Strnad J.: *Diplomová práce*. VŠCHT, Praha 1998.
5. Takadama H., Kim H. M., Kokubo T., Nakamura T., v knize: *Bioceramics 13, Proceedings of the 13th Int. Symp. on Ceramics in Medicine* (Giannini S., Moroni A., ed.), str. 51. SciPress, Zürich 2000.
6. Strnad J., Helebrant A., Hamáčková J.: *Glastech. Ber. – Glass Sci. Technol.* 73 C1, 262 (2000).
7. Song L., Campbell A. A., Bunker B. C., v knize: *Hydroxyapatite and Related Materials* (Brown P. W., Constanz B., ed.), str. 197. CRC Press, Boca Raton 1994.
8. Wu W., Nancollas G. H., v knize: *Bioceramics 11, Proceedings of the 11th Int. Symp. on Ceramics in Medicine* (LeGeros R. Z., LeGeros J. P., ed.), str. 469. World Scientific Publishing, New York 1998.
9. Li P., Ducheyne P.: J. Biomed. Mater. Res. 41, 341 (1998).
10. Strnad Z., Strnad J., Povýšil C., Urban K.: *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 15, 483 (2000).

J. Strnad, A. Skrčená, J. Protivínský, and A. Helebrant
(Department of Glass and Ceramics, Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic): **Interaction of Biomaterials with Simulated Body Environment**

A dynamic method for testing of biomaterials in vitro is designed and verified. This method is based on interaction of the material with a flowing solution, which simulates the composition of the inorganic part of human blood plasma. In experiments, bioactive chemically treated titanium (Ti-bio), TiO_2 gel, sintered hydroxyapatite (HA1100) and dried hydroxyapatite (HA120) granules were used. Titanium (grade 3) and silica glass granules were used as reference bioinert materials. With bioactive materials the test confirmed adsorption of Ca^{2+} and PO_4^{3-} ions in the initial phase of interaction and, after induction time (for Ti-bio 24.5 h, HA1100 2.5 h, HA120 3.8 h), the constant growth of bioactive layer of hydroxyapatite. During exposure of bioinert samples no changes in the effluent concentration were detected. The dynamic arrangement also enables a simple evaluation of precipitation parameters (induction time, growth rate), which can be used for bioactivity quantification of the investigated materials.