

М. М. Гребенщикова, Р. А. Нигматуллина, Л. М. Хайдарова

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ОРТОПЕДИИ С ПОКРЫТИЯМИ, ПОЛУЧЕННЫМИ ИОННО-ПЛАЗМЕННЫМ СПОСОБОМ

Ключевые слова: токсичность, плазменная конденсация, нитрид титана, нитрид гафния, пробит анализ, кожа ортопедическая.

Исследована токсичность материалов для ортопедии с покрытиями, полученными ионно-плазменным способом. Проведен пробит-анализ водных вытяжек исследуемых объектов. Экспериментально определены оптимальные безопасные для живых организмов концентрации исходных веществ, применяемых в изделиях медицинского назначения.

Keywords: toxicity, plasma condensation, titanium nitride, hafnium nitride, probit analysis, leather orthopedic.

The toxicity of materials for orthopedics with coatings produced by ion-plasma method was investigated. A probit analysis of aqueous extracts of the objects was conducted. The optimal safe concentrations of materials used in medical devices were experimentally determined.

Проблема исследования биологической безопасности материалов, применяемых в изделиях медицинского назначения, становится всё более актуальной. Материалы не отвечают требованиям безопасности, предъявляемым к изделиям медицинского назначения. Для повышения их биосовместимости применяют покрытия, конденсированные из плазменной фазы, в том числе для полимерных материалов.

При длительном контакте с биологически активными средами живого организма изделия медицинского назначения частично разрушаются, и часть химических веществ, входящих в их состав, мигрирует в окружающие ткани человека. Эти вещества, в основном, металлы.

Металлы играют двойственную роль в физиологии: некоторые являются необходимыми для нормального течения жизни, в то время как большинство из них токсичны при повышенных концентрациях и, следовательно, оказывают отрицательное влияние на активность живых организмов [1].

Избыточное содержание ионов металлов в организме производит токсический эффект. Токсичность объясняется связыванием "металлических ядов" в организме с функциональными группами жизненно важных веществ, что нарушает нормальное функционирование клеток тканей.

Количество, при котором химические ингредиенты становятся действительно опасными для окружающей среды, зависит не только от степени загрязнения ими гидросферы или атмосферы, но также от химических особенностей этих ингредиентов и от деталей их биохимического цикла. Для сравнения степени токсикологического воздействия химических ингредиентов на различные организмы пользуются понятием молярной токсичности, на которой основан ряд токсичности, отражающий увеличение молярного количества металла, необходимого для проявления эффекта токсичности при минимальной молярной величине, относящейся к металлу с наибольшей токсичностью. Факторами окружающей среды,

влияющими на токсичность, являются температура, растворенный кислород, pH, жесткость и щелочность воды, присутствие хелатообразующих агентов и других загрязнителей в воде. Уменьшение парциального давления кислорода и увеличение pH и жесткости воды приводят к понижению токсикологического воздействия веществ-загрязнителей на окружающую среду и живые организмы, обитающие в ней.

Устойчивость живого организма по отношению к токсикантам может быть достигнута при:

- 1) уменьшении поступления токсиканта;
- 2) увеличении коэффициента выделения токсиканта;
- 3) переводе токсиканта в неактивную форму в результате его изоляции или осаждения.

Факторы, влияющие на доступность токсикантов, их усвоение и воздействие на организм, могут быть совершенно разной природы:

·химические (химические свойства, окислительно-восстановительные потенциалы и др.);

·физические (освещенность, температура, турбулентность в растворах);

·биологические (размеры, стадии развития, упитанность, состояние здоровья, акклиматизация).

Канцерогенез – это способность металла проникать в клетку и реагировать с молекулой ДНК, приводя к хромосомным нарушениям клетки. Канцерогенными веществами являются никель, кобальт, хром, мышьяк, бериллий, кадмий.

Различие в канцерогенной активности определяется биодоступностью металлопроизводных: наиболее потенциально активные соединения содержат канцерогенные ионы металла, способные легко внедряться в клетки и реагировать с молекулой ДНК. Например, соли шестивалентного хрома CrO_4^{2-} потенциально более канцерогенны, чем соли трехвалентного хрома CrCl_3 , поскольку первые легче проникают в клетки, а вторые – лишь ограниченно.

Канцерогенез зависит как от механизма поступления канцерогенных веществ в клетку, так и

от их количества внутри клетки. Важным фактором в этом аспекте является общая цитотоксическая активность конкретного иона металла. Так, например, если ион металла так же активен и цитотоксичен, как Hg^{2+} , то гибель клетки будет предшествовать канцерогенному ответу [2, 3].

Канцерогенные вещества могут быть разделены на три категории:

- металлсодержащие частицы;
- водорастворимые соединения металлов;
- жирорастворимые соединения.

Наибольшей способностью проникать в клетку обладают водорастворимые соединения. Например, такой водорастворимый ион металла, как хромат-ион CrO_4^{2-} , способен легко проникать в клетки с использованием SO_4^{2-} -транспортной системы. А никель в ионной форме не внедряется в клетки с легкостью и поэтому многие водорастворимые соли никеля не рассматриваются как потенциально канцерогенно опасные. Жирорастворимые соединения металлов, такие, например, как карбонил никеля $\text{Ni}(\text{CO})_4$, легко входят в клетку и поэтому очень токсичны.

В человеческом теле содержится порядка 6 мг хрома, распределенного между многими тканями. Хотя требующиеся дозы не установлены, они должны быть очень малыми. Необходимый уровень хрома трудно оценить химическими или биохимическими методами [4].

Попав в живую клетку, соединение металла первоначально осуществляет некоторую простейшую химическую реакцию, играя роль пускового фактора, на которую затем следует патологический отклик все более сложных биологических молекул и ансамблей молекул, и как конечный результат – введение металла влияет на организм в целом.

Представители всех групп металлов в дозах, превышающих минимальные, отчетливо ядовиты для организма, но если для металла I группы организм более или менее резистентен, то есть имеет определенные молекулярные механизмы, компенсирующие перепады в количествах попадающих в него металлов, то для металлов II и III групп таких механизмов нет, и уже очень небольшие избыточные дозы оказываются фатально неприемлемы.

В отношении почти всех металлов можно утверждать, что они опасны и часто ядовиты. Однако известно, что активность металлов как ядов в большой степени зависит от формы, в которой он попадает в живой организм, то есть от физических и химических свойств металлического соединения и как следствие от химических реакций, в которые оно вступает в организме.

При pH 7 наиболее распространенным соединением является $\text{Cr}(\text{OH})^{2+}$, но в своей инертной, полиядерной, комплексной форме. Даже в форме гексаакваона хрома (III) обмен молекулы воды с растворителем протекает несколько дней. Именно такая инертность ограничивает роль Cr (III) лишь структурными функциями. Если хром все же вовлекается в быстрые реакции, то он выступает в

них как Cr (II). В качестве потенциальных лигандов для хрома могут выступать сахара. Глюкоза сравнительно плохой лиганд для связывания этого металла, но это ограничение может и не играть роли в некоторых комплексах трехвалентного хрома.

Трехвалентный Cr (III) - один из наименее токсичных ионов металлов; сильный окислитель гексавалентный Cr (VI) уже более токсичен. При $\text{pH} < 4$ Cr (III) существует в форме гексаакваона, но по мере увеличения значения pH образуются уже гидроксокомплексы и инертные полиядерные комплексы с кислородными мостиками. В нейтральных растворах Cr (VI) существует в виде CrO_4^{2-} , но в организме человека сильно окисляющий Cr (VI) переходит в Cr (III) [5].

Поскольку необходимость металлов и их токсичность для живых организмов не связаны непосредственно химически, то необходимые ионы металлов отдельно не рассматриваются. Для многих ионов металлов острая токсичность возникает при внезапном поступлении большой дозы металла; при этом появляются иные эффекты и симптомы, чем при хроническом отравлении; хроническое отравление возникает при получении низких доз металла, но в течение продолжительного периода времени.

Биологически эссенциальные металлы имеют пределы доз, определяющих их дефицит, оптимальный уровень и уровень токсического действия. Токсические металлы в низких дозах не оказывают вредного действия и не несут биологических функций, однако в высоких дозах оказывают токсическое действие. Тем не менее, существуют металлы, которые проявляют сильно выраженные токсикологические свойства при самых низких концентрациях и не выполняют какой-либо полезной функции. К таким токсичным элементам относят ртуть, кадмий, свинец, мышьяк. Они не являются ни жизненно необходимыми, ни благотворными, но даже в малых дозах приводят к нарушению нормальных метаболических функций организма [6].

В связи с этим важным является качественный и комплексный анализ токсических веществ, содержащихся в материалах, используемых для изготовления изделий медицинского назначения.

В настоящее время для контроля уровня токсичности используются, в том числе, методы биотестирования, позволяющие обнаружить физиологически активные формы соединений, влияющие на организм [7,8].

Целью данной работы являлось исследование острой токсичности материалов, применяемых в изготовлении изделий медицинского назначения.

В работе токсичность материалов была исследована методом биотестирования с использованием стандартной тест-культуры *Daphnia magna* Straus. Дафнии относятся к роду ветвистоусых рачков. Короткий биологический цикл развития делает возможным проследивание роста и развития на всех жизненных стадиях.

Оптимальные условия для разведения дафний в лабораторных условиях: pH = 7,2 – 8,0, температура 20 – 24 °С, слабая аэрация, свет 14 – 16 часов в день. В лабораторных условиях дафний подкармливали ежедневно хлореллой или пекарскими дрожжами. Использование ветвистоусых рачков рода *Daphnia magna* в методе биотестирования удобно, так как дафнии широко распространены в природе, легко культивируются, обладают высокой чувствительностью к токсикантам различной природы.

В работе оценка токсичности проводилась по выживаемости и плодовитости. В работе использован метод пробит анализа.

В работе исследовались образцы кожаного материала без покрытий и с покрытиями из нитрида гафния и титана, а также стальные пластины с покрытием из нитрида титана, используемые при изготовлении имплантов. Кожанный материал используется в ортопедии для изготовления деталей протезов, контактирующих с кожей пациента.

Провели нанесение покрытий методом конденсации из плазменной фазы на материалы, применяемые при изготовлении изделий медицинского назначения. Режимы нанесения представлены в таблице 1 [9,10].

Минимальным значением силы тока, необходимого для зажигания дуги, является 60 А. При увеличении данного значения увеличивается содержание капельной фазы в покрытии.

При повышении опорного напряжения стол, на котором закреплен материал, нагревается, что недопустимо для органических подложек, так как при этом начинается деструкция материала. Ионная очистка 600 В предназначена для металлов, то есть при повышении опорного напряжения начинается ионная бомбардировка поверхности. Это очищает поверхность, повышает адгезию покрытия, но при этом сильно повышает температуру материала.

Таблица 1 – Режимы плазменной модификации материалов

Вид материала	Ортопедическая кожа	Сталь
Опорное напряжение, В	0	250
Давление азота, мм.рт.ст	$(2-3) \times 10^{-3}$	$(2-3) \times 10^{-3}$
Время конденсации, с	30х6	1200
Ток дуги, А	60\70	60\70
Материал покрытия	Титан /гафний	Титан /гафний
Ионная очистка, В	-	600

Модифицирована методика промывки ортопедической кожи с контролем температуры

сваривания кожи с покрытиями и без них. Процедура промывки кожи хромового дубления в дистиллированной воде позволила провести частичное удаление ионов хрома, находящихся в несвязанном состоянии в толще дермы.

Проведены измерения массовой доли влаги и массовой доли оксида хрома в образцах кожи, определена температура сваривания. Результаты измерений показали, что нанесение плазменных конденсатов на кожу не приводит к изменению химического состава кож, а процедура промывки влияет на содержание хрома в коже. Температура сваривания кожи хромового дубления несколько ниже, чем тот же показатель у промытой кожи.

Водные вытяжки из исследуемых образцов готовили в соответствии с ГОСТ Р ИСО 10993. Образцы кожи разрезали на мелкие части перед экстракцией для улучшения погружения в экстрагирующую среду.

Произвели расчет необходимых объемов экстрагирующей жидкости в зависимости от стандартной площади поверхности или массы материалов.

Образцы кожи анализировали по графе «пористые изделия неправильной формы», где соотношение при экстракции масса/объем составляет 0,1 г/мл. Образцы пластин анализировали по графе «толщина < 1,0 мм», где соотношение при экстракции площадь поверхности/объем составляет 1, 25 см²/мл.

Пользуясь табличными данными, получили следующие значения.

Таблица 2 – Объем экстрагирующей жидкости для образцов

№ образца	Наименование	Объем экстрагирующей жидкости, мл
1	Кожа хромового дубления	131,56
2	Кожа хромового дубления после процедуры промывки	119,26
3	Металлические пластины с покрытием из нитрида титана	17,6
4	Кожа хромового дубления с покрытием из нитрида титана и гафния на лицевой стороне	115,5
5	Кожа хромового дубления с покрытием из нитрида титана и гафния на обеих сторонах	127,2

Экстракцию проводили в режиме температуры 37 °С в течение 72 часов.

Исследование ИК-спектроскопии водных экстрактов проводили методом Фурье-ИК-спектроскопии с помощью инфракрасного Фурье-спектрометра ФСМ 1202. Рассмотрели связь инфракрасного спектра поглощения и химического состава образцов кожи. Из приведенных ИК-

спектров относительного пропускания видно, что вне зависимости от плазменной обработки, от процедуры промывки кожи хромового дубления опытные образцы водных экстрактов кожи не отличаются по составу относительно друг друга. Пики поглощения образцов лежат в одной области, лишь незначительно отличаясь по интенсивности

Для определения концентрации металлов в исследуемых пробах использовали метод рентгенофлуоресцентного анализа. Исследование проводили с помощью портативного рентгенофлуоресцентного спектрометра с полным внешним отражением S2 PICOFOX.

Оценочные концентрации элементов в образцах представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Оценочные концентрации элементов в образцах, г/л

Код образца	№1	№2	№3	№4	№5
Si				0,7	0,7
S	0,4	0,4	0,08	0,2	0,3
Cl	0,4	0,2	0,2	0,3	0,3
K	0,06	0,1	0,1	0,07	0,07
Ca	0,5	0,9	0,3	0,4	0,5
Ti	0,001	0,01	0,0001	-	0,0001
Cr	0,007	0,003	-	0,003	0,003
Mn	0,001	0,002	-	-	-
Fe	0,15	0,005	0,03	0,002	0,002
Zn	0,002	0,004	0,01	0,001	0,002
Br	0,01	0,01	0,05	0,008	0,008
Sr	0,005	0,01	0,003	0,003	0,003
Ni	0,0001	-	-	-	-
Cu	0,0005	-	-	-	-
Pb	0,002	-	-	-	-

Приготовленные водные экстракты исследовали на токсичность с помощью *Daphnia magna*. Эксперимент проводили с исходными экстрагированными растворами и растворами, разбавленными в 2, 4 и 10 раз дистиллированной водой. По этим результатам были построены графики линейной зависимости пробитного значения гибели дафний от логарифма концентраций исследуемого образца.

На основании полученных данных построили график оценки острой токсичности исследуемых проб (рис. 1).

Пробы №1, №2, №4 оцениваются как токсичные, поскольку в них гибнет больше 50 % дафний по сравнению с контролем. Пробы №3, №5 острого токсического действия не оказывают.

Поскольку экспериментально не удалось получить точного значения кратности разбавления растворов проб, оказывающих токсическое действие и вызывающих 50 %-ную гибель дафний за 96 часов экспозиции, то для получения точного значения ЛК50 без выполнения дополнительных

экспериментов, использовали графический метод определения.

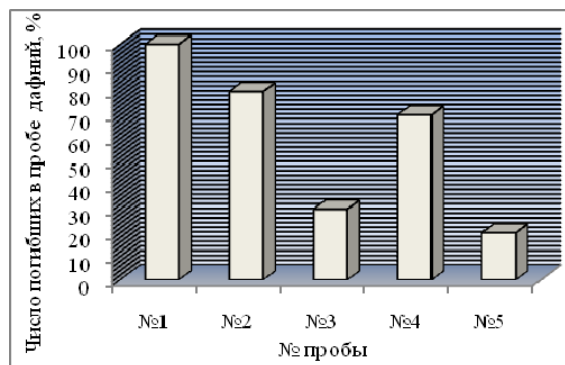


Рис. 1 – Оценка острой токсичности исследуемых проб

Определили значения ЛК₅₀, которая вызывала смертность 50 % дафний и значения БК₁₀, при которых данная проба становилась безвредной (утрачивала острую токсичность) и вызывала гибель не более 10 % тест-объектов.

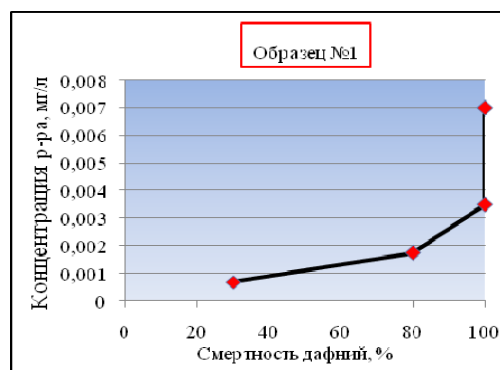


Рис. 2 – Зависимость смертности дафний от концентрации экстрагированного раствора образца №1

По критерию выживаемости токсическим действием обладала проба №1, содержащая образцы хромовой кожи (рисунок 2). Было оказано достоверное угнетающее действие на тест-объекты, которое выражалось в смертности рачков. Исходная концентрация раствора была абсолютно летальной для рачков *Daphnia Magna*. Гибель дафний в контрольном растворе составила 100 %. Минимальная концентрация раствора, при которой выживаемость дафний равна 70 %, составляет 0,0007 мг/л.

Анализ динамики изменения токсичности показал, что меньшей токсичностью, чем проба №1, обладает проба №2. Наблюдается угнетение жизнедеятельности дафний, но при этом отмечена тенденция к ослаблению токсичности. Это объясняется частичным раздубливанием кожи хромового дубления после промывки, в результате чего удаляется часть свободной кислоты и солей.

Гибель дафний в пробах №3 и №5 невелика или практически отсутствует. Выживаемость дафний составила 70 % и 80 % соответственно. Анализ проб воды показал отсутствие токсического эффекта.

Экспериментальные результаты показали, что раствор пробы №4 без разбавления оказывает угнетающее действие на выживаемость дафний. При разведении 1:4 токсичность снижается.

Выводы

1) При проведении исследования по определению устойчивости *Daphnia magna* к водному раствору бихромата калия $K_2Cr_2O_7$, смертность рачков в контроле (К) не превысила 10%. Лабораторная культура дафний считается пригодной для биотестирования проб воды.

2) По результатам биотестирования установлено, что выживаемость дафний сводится к нулю в водном экстракте кожи хромового дубления (смертность дафний 100 %). Это показывает наличие токсического эффекта у хрома. После процедуры промывания кожа хромового дубления давала меньший процент токсичности (80 %), однако не исключала ее полностью и поддерживала на достаточно высоком уровне. Эксперимент позволяет сделать вывод о необходимости тщательной промывки или применения иных методов дубления кожи, обеспечивающих менее токсичные эффекты воздействия.

3) Пробы, содержащие в своем составе нитрид титана и нитрид гафния, острого токсического эффекта не проявили (смертность дафний 30 % и 20 %), что подтверждает возможность применения титана и гафния для нанесения покрытий в изделиях медицинского назначения. Биологически активное покрытие, основанное на конденсации из плазменной фазы нитридов титана и гафния, обладает антимикробным эффектом и выполняет защитную функцию. Покрытие позволяет защитить металл от реагентов, вызывающих коррозию, и является барьером для выхода продуктов коррозии в полости тканей живого организма. Это определяет совместимость материала с тканями живого организма.

4) Установлено, что водная вытяжка из кожи хромового дубления с покрытием из нитрида титана и гафния на лицевой стороне без разбавления оказывает угнетающее действие на выживаемость дафний (смертность дафний 70 %). При разведении 1:4 токсичность заметно снижается (до 40 %). Из вышесказанного следует, что некоторые металлы оказывают токсическое действие лишь в определенных концентрациях. Методы биотестирования позволяют установить безопасные для живых организмов концентрации.

5) Для определения концентрации металлов в исследуемых пробах использовали метод рентгенофлуоресцентного анализа, который выявил концентрации всех элементов, присутствующих в образцах. По результатам исследования

концентрация хрома в коже хромового дубления после процедуры промывки в 2,3 раза ниже, чем в непромытой коже (0,007 и 0,003 г/л соответственно). При этом концентрация титана в промытой коже превышает в 10 раз соответствующую концентрацию в непромытой коже.

6) Исследование ИК спектров относительного пропускания методом ИК-Фурье-спектроскопии показало, что опытные образцы водных экстрактов кожи не отличаются по составу от контрольного, а также относительно друг друга. Пики поглощения контрольного и опытных образцов лежат в одной области, лишь незначительно отличаясь по интенсивности.

7) Полученные результаты показали, что токсичность применяемых материалов зависит от состава и концентрации. Проведенные исследования являются доказательством актуальности выбранных объектов и методов проведения эксперимента.

Литература

1. Николаев Л. А. Металлы в живых организмах / Л. А. Николаев. – М.: Просвещение, 1986. – 127 с.
2. Келина Н. Ю. Токсикология в таблицах и схемах: учебное пособие / Н. Ю. Келина, Н. В. Безручко. – Ростов н/Д: Феникс, 2006. – 144 с.
3. Полина И. Н. Токсикология: учебное пособие / Сыкт. Лесн. ин-т; И. Н. Полина. – Сыктывкар, 2012. – 128 с.
4. Бингам Ф. Т. Некоторые вопросы токсичности ионов металлов / Ф. Т. Бингам, М. Коста, Э. Эйхенбергер. – М.: Мир, 1993. – 368 с.
5. Menu L. Disorders of Mineral Metabolism / L. Menu. – Vol. 1 // Academic Press. – New York, 1981. P. 233.
6. Нечаев А. П. Пищевая химия / А. П. Нечаев, А. А. Кочеткова. – СПб.: ГИОРД, 2004. – 640 с.
7. Ляшенко О. А. Биоиндикация и биотестирование в охране окружающей среды: учебное пособие / О. А. Ляшенко. – СПб.: СПб ГТУРП, 2012. – 67 с.
8. Шадманова Т.Х. Экологические основы биоиндикационных исследований / Т. Х. Шадманова, Ю. С. Чуйков // Астраханский Вестник экологического образования. – 2012. – №2. – С. 160.
9. Гребенщикова М.М. Разработка рекомендаций по промышленному применению плазменных технологий для изготовления кожевенного материала и изделий повышенной биологической безопасности ортопедического и медицинского назначения/ М.М. Гребенщикова // Вестник Казанского технологического университета. Федер. агентство по образованию, Казан. гос. технол. ун-т. - Казань: КГТУ– 2012.- №13
10. Гребенщикова М.М. Технология получения кожевенного материала для изделий протезно-ортопедического назначения с биологически совместимыми свойствами/ М.М. Гребенщикова, И.Ш. Абдуллин, Р.А. Кайдыров, Э.Б. Гатина // Вестник Казанского технологического университета. – 2012.- №3 – С.101-103.

© М. М. Гребенщикова - канд. техн. наук, доц. каф. плазмохимических и нанотехнологий высокомолекулярных материалов КНИТУ, grebenshikova.marina@yandex.ru; Р. А. Нигматуллина - канд. техн. наук, дир. ООО «Руно»; Л. М. Хайдарова – студ. плазмохимических и нанотехнологий высокомолекулярных материалов КНИТУ.

© М. М. Grebenshchikova - ph.D., docent of The Department of Plasma Technology and Nanotechnology of High Molecular Weight Materials KNRTU, grebenshikova.marina@yandex.ru; L. M. Khaidarova - ph.D., headmaster of LLC «Runo»; R. A. Nigmatullina - student of Faculty Of Nanomaterials And Nanotechnologies KNRTU.