

УДК: 621.762

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ И ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПОРИСТЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ТИТАНА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

DETERMINATION OF BIOCOMPATIBILITY AND CYTOTOXICITY
OF POROUS TITANIUM-BASED MATERIALS IN EXPERIMENT

Колсанов А.В.
Николаенко А.Н.
Иванов В.В.
Приходько С.А.
Платонов П.В.

Kolsanov AV
Nikolaenko AN
Ivanov VV
Prikhodko SA
Platonov PV

ФГБОУ ВО «Самарский государственный
медицинский университет» Минздрава России

Samara State
Medical University

Цель — оценить пролиферативную активность культур дермальных фибробластов в присутствии композиционных материалов на основе силицидов титана в условиях *in vitro*.

Материалы и методы. Для оценки пролиферативной активности дермальных фибробластов *in vitro* использовались материалы: силицид титана, карбосилицид титана, оксидированный в вакууме и без вакуума, титан марки VT-00 (группа сравнения). Тестирование пролиферативной активности проводили методом прямого контакта. Были рассчитаны индекс пролиферации, время удвоения и количество удвоений культуры за время культивирования. Прикрепление дермальных фибробластов к поверхности тестируемых материалов и наличие их на ней при длительном культивировании оценивали при помощи растровой электронной микроскопии.

Результаты. Исследование морфофункциональных характеристик дермальных фибробластов, культивированных в присутствии образцов представленных материалов, показало, что на протяжении всего эксперимента грубых изменений ни в одной из серий не происходило, клетки сохраняли присущий фибробластам монослойный характер роста, преимущественно веретеновидную форму с 2–4 отростками. Характерно, что все культуры дермальных фибробластов за время эксперимента проходили одинаковое количество удвоений и достигали плотности насыщения через 7 суток после посева,

Aim — to evaluate the proliferative activity of dermal fibroblast cultures in the presence of composite materials based on titanium silicides *in vitro*.

Materials and methods. To assess the proliferative activity of dermal fibroblasts *in vitro*, the following materials were used: titanium silicide, titanium carbosilicide oxidized in vacuum and without vacuum, titanium VT-00 (comparison group). Testing of proliferative activity was carried out by the direct contact method. The proliferation index, the doubling time and the number of culture doubling during the cultivation period were calculated. Attachment of dermal fibroblasts to the surface of the test materials and their presence on it during cultivation was assessed by scanning electron microscopy.

Results. The study of the morphofunctional characteristics of dermal fibroblasts cultured in the presence of the test samples of material showed that during the entire experiment no major changes occurred in any of the series, the cells retained the monolayer growth characteristic of fibroblasts, preferably spindle-shaped with 2–4 shoots. Moreover, all cultures of dermal fibroblasts underwent the same number of doublings during the experiment and reached saturation density

что говорит о хорошей пролиферативной активности клеток в присутствии тестируемых материалов. Результаты растровой электронной микроскопии демонстрируют высокое сродство дермальных фибробластов человека как к силициду, так и к карбосилицидам титана.

Заключение. Отсутствие морфофункциональных изменений дермальных фибробластов и активная пролиферация свидетельствуют об отсутствии цитотоксичности исследуемых сплавов, а способность клеток к адгезии к поверхности материалов — об их хорошей биосовместимости.

Ключевые слова: медицинские имплантаты, биоконпозиционные материалы, силициды титана, дермальные фибробласты.

■ ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в реконструктивно-восстановительной хирургии костной ткани используется широкий арсенал биоконпозиционных материалов. Одними из основных материалов, применяемых при изготовлении медицинских имплантатов для травматологии, ортопедии, челюстно-лицевой хирургии, нейрохирургии, являются: титан, титановый сплав Ti-6Al-4V, никелид титана [1, 2]. Однако в современной медицине проблема полноценной остеоинтеграции данных материалов остается не полностью решенной [3]. Важную роль в интеграции внутрикостных имплантатов играют физико-химические характеристики поверхности имплантата. Для оптимизации реакционных параметров имплантата некоторые производители дополнительно модифицируют поверхность оксидом титана, гидроксипатитом кальция [4, 5]. Рядом авторов для этих целей использовались соединения кремния. Проводились исследования по легированию поверхности имплантата, изготовленного из титанового сплава Ti-6Al-4V композитом силицида титана (TiSi) [6]. Высокая биологическая совместимость титана вызвала особый интерес к изучению его сплавов и соединений [7, 8]. В последнее время научный интерес сконцентрирован на пористых материалах на основе титана. Констатируется, что трехмерный дизайн пор способствует более успешному протеканию процессов остеоинтеграции. Научный и практический интерес на сегодняшний день вызывает новый пористый материал — карбосилицид титана (Ti_3SiC_2). Карбосилицид титана синтезируется в режиме самораспространяющегося высокотемпературного синтеза (СВС) без применения дорогостоящих защитных атмосфер и с минимальными энергозатратами. Слоистый карбид Ti_3SiC_2 относится к новому классу материалов — МАХ-фазам [9]. Структура его представляет собой чередование карбидных пластин и атомных слоев кремния. Наряду с высокой прочностью его отличает ряд уникальных свойств: микропластичность, трещиностойкость, обрабатываемость резанием и др. Данные свойства определяют широкую перспективу внедрения данного материала в медицинскую имплантологию.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка пролиферативной активности культуры дермальных фибробластов в присутствии композицион-

ных материалов на основе силицидов титана в условиях *in vitro*.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной работе для исследования использовались материалы: силицид титана (TiSi), карбосилицид титана, оксидированный без вакуума (Ti_3SiC_2), карбосилицид титана, оксидированный в вакууме (Ti_3SiC_2), титан марки BT-00 (группа сравнения). Материалы были получены на базе отраслевой научно-исследовательской лаборатории «Инженерный центр самораспространяющегося высокотемпературного синтеза» СамГМУ. Пористые материалы были произведены методом СВС, при этом использовались порошки следующих марок: титан (ПТМ-2) с чистотой 98,92% и размером частиц 6–15 мкм, кремний (КР0) с чистотой 98,8% и размером частиц 1–15 мкм, сажа (П-800) с размером частиц 0,09–0,13 мкм. Исходные шихты в соотношениях $3Ti+1,15Si+2C$ (в расчете на образование карбосилицида титана) и $Ti+2Si$ смешивались в шаровой мельнице 4 часа. Из полученных составов спрессовывали образцы диаметром 23 мм и массой 10 г. Реакция СВС инициировалась электрической спиралью в оболочке из кварцевого песка на воздухе. Партия образцов была синтезирована в лабораторном СВС-реакторе объемом 4,5 литров в вакууме до 0,01 МПа. Полученные материалы исследовали с помощью растрового электронного микроскопа с приставкой энергодисперсионного анализатора и дифрактометра. Макроструктура всех синтезированных образцов представляла собой пористый каркас с наличием открытых и закрытых пор. Средняя пористость составляла 60–65%. Открытые поры занимали 83–92% от общей площади порового пространства. Средний размер пор колебался от 100 до 300 мкм. Характер строения пористого каркаса повторял колебания волны горения при синтезе материала.

Микроструктура синтезированных материалов представляла собой пластины карбосилицида титана, окруженные кристаллами карбида титана (TiC). На поверхности отчетливо визуализируется оксидная поверхностная пленка (толщина 3–5 мкм). Партия образцов была синтезирована при пониженном атмосферном давлении для уменьшения влияния атмосферных газов на поверхность материала. Поверхность порового пространства при синтезе была оксидирована в слабом

вакууме в реакторе атмосферными газами. При этом толщина оксидной пленки уменьшена в 2–3 раза.

Исследования проводились в лаборатории культур клеток «Института экспериментальной медицины и биотехнологий» СамГМУ. Эта лаборатория в соответствии с требованиями GMP и GLP оснащена комплексом «чистых помещений» класса Б, в которых размещено необходимое оборудование, позволяющее создавать зоны чистоты класса А согласно ГОСТ Р ИСО 14644. В качестве тест-системы использованы дермальные фибробласты человека 7 пассажа, выращенные из биоптатов кожи здоровых доноров. Получение первичного материала проводилось с соблюдением всех международных и российских этических требований и после одобрения Комитета по биоэтике при СамГМУ.

Тестирование пролиферативной активности проводили методом прямого контакта (ГОСТ Р ИСО 10993.5–99) в 12-луночных планшетах с плоским дном квалификации «для культур клеток». Дермальные фибробласты высевали в лунки планшетов (посевная доза 1×10^4 кл./см²) и культивировали при 37°C и постоянной влажности в условиях CO₂-инкубатора с использованием полной ростовой среды (среда 199 с добавлением 10% термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки). Образцы материалов помещали на монослой через 24 часа после посева, после чего продолжали культивирование в течение 7 суток. Ежедневно производили визуальную оценку и фотографирование культуры с помощью инвертированного микроскопа: оценивали структурные особенности клеток и монослоя в целом, считали количество клеток в культуре с помощью окулярной сетки Автандилова, затем вычисляли плотность монослоя на единицу площади (мм²).

На основании полученных данных рассчитывали индекс пролиферации, время удвоения и количество удвоений культуры за время культивирования.

Прикрепление дермальных фибробластов к поверхности тестируемых материалов и наличие их на ней при длительном культивировании оценивали при помощи растровой электронной микроскопии (РЭМ). Образцы размером 3,5х3,5х2 мм заселяли дермальными фибробластами из расчета 200 тыс. клеток на образец и помещали в полипропиленовые пробирки объемом 5 мл со средой 199 с коническим дном и закручивающейся крышкой. Биообъекты, предварительно вынутые из лунок планшетов, отмывали от среды раствором Хенкса 2 раза по 30 с, после чего фиксировали 2,5% водным раствором глутарового альдегида 10 минут и проводили по батарее спиртов возрастающей концентрации (60% – 80% – 96% – абсолютный спирт; 2 минуты в каждом спирте). После абсолютного спирта сушили на воздухе на фильтровальной бумаге до полного высыхания. Непосредственно перед РЭМ поверхность образцов напыляли золотом.

Статистическую обработку результатов проводили методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента после установления нормального распределения показателей. Результаты были представлены в виде среднего арифметического (М) и среднего квадратического отклонения ($M \pm \sigma$). Значимыми

считались отличия показателей в сравниваемых группах при $p \leq 0,05$ (95%). При обработке результатов применялась статистическая программа STATISTICA–9 (StatSoft, USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование морфофункциональных характеристик дермальных фибробластов, культивированных в присутствии образцов представленных материалов, показало, что на протяжении всего эксперимента грубых изменений ни в одной из серий не происходило, клетки сохраняли присущий фибробластам монослойный характер роста, преимущественно веретеновидную форму с 2–4 отростками. Ядра клеток овальные, четко отграниченные от мелкозернистой цитоплазмы ядерной оболочкой. Характерно, что все культуры дермальных фибробластов за время эксперимента проходили одинаковое количество удвоений (от 4,40 для Ti₃SiC₂ (оксидированный) до 4,58 для Ti₃SiC₂ (оксидированный в вакууме)) и достигали плотности насыщения через 7 суток после посева, что говорит о хорошей пролиферативной активности клеток в присутствии тестируемых материалов.

Вместе с тем темпы пролиферации клеток отличались в различных сериях. Контрольная культура дермальных фибробластов активно пролиферировала первые четыре суток после посева, затем темп этого процесса прогрессивно замедлялся, что демонстрировалось значительным снижением индекса пролиферации (IP) и увеличением времени удвоения культуры (TD), начиная с 5-х суток от посева культуры (4-х суток от начала эксперимента). Помещение на монослой образца Ti₃SiC₂ в течение первых двух суток приводило к достоверному замедлению пролиферативной активности, о чем свидетельствовало снижение по сравнению с контролем IP и увеличение TD, в результате плотность монослоя оказывалась значительно меньше, чем в контрольной культуре. Усиление пролиферации фибробластов в последующие сроки приводило к тому, что плотность монослоя сравнивалась с наблюдаемой в группе сравнения, где на монослой был помещен образец титана марки BT-00.

Характеристики пролиферативной активности культуры фибробластов в присутствии образцов TiSi практически не отличались от показателей как в контрольных культурах, так и в материале сравнения — титане BT-00. В то время как помещение Ti₃SiC₂ (оксидированный в вакууме) сразу же усиливало пролиферативную активность культуры дермальных фибробластов, что приводило к достоверному увеличению плотности монослоя уже к концу первых суток эксперимента. В дальнейшем интенсивность пролиферации снижалась до уровня контрольной культуры, но плотность монослоя превышала не только показатели в группе сравнения (титан марки BT-00), но и в контроле, и только к концу эксперимента становилась равной контролю.

Результаты РЭМ демонстрируют высокое сродство дермальных фибробластов человека как к силициду, так и к карбосилицидам титана. Клетки не только располагались в порах материалов, прикрепляясь к поверхности отростками, но и непосредственно распла-

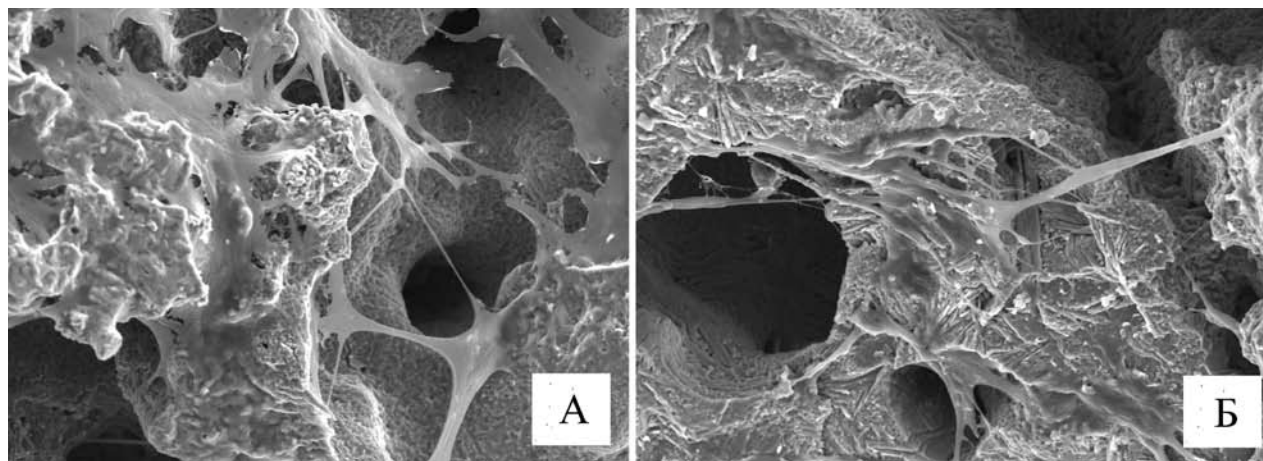


Рисунок 1. График рассеяния между канонической переменной X и разностью биологического и паспортного возраста.

сывались на поверхности материалов, образуя на ней более или менее плотный монослой (**рисунки 1А, 1Б**). Значительные белковые наслоения на поверхности материалов косвенно свидетельствовали о синтетической активности прикрепленных клеток. Наиболее демонстративно этот процесс представлен на образце Ti_3SiC_2 , оксидированном без вакуума (**рисунок 1Б**).

ВЫВОДЫ

Таким образом, данные материалы не являются цитотоксичными, о чем свидетельствуют отсутствие

морфофункциональных изменений дермальных фибробластов и активная пролиферация при культивировании в их присутствии. Отличия в темпах пролиферации данных клеток в присутствии различных материалов обусловлены, скорее всего, особенностями оксидирования поверхности. Обнаруженная способность клеток адгезироваться к поверхности материалов, расплываться на ней и образовывать монослой позволяет предположить хорошую биосовместимость композиционных материалов на основе силицидов титана. ■

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Andani M, Shayesteh Moghaddam N, Haberland C, Dean D, Miller M and Elahinia M. Metals for bone implants. Part 1. Powder metallurgy and implant rendering. *Acta Biomaterialia*. 2014;10(10):4058–4070. doi.org/10.1016/j.actbio.2014.06.025
2. Elahinia M, Hashemi M, Tabesh M, Bhaduri S. Manufacturing and processing of NiTi implants: A review. *Progress in Materials Science*. 2012;57(5):911–946. doi.org/10.1016/j.pmatsci.2011.11.001
3. Mohseni E, Zalnezhad E, Bushroa A. Comparative investigation on the adhesion of hydroxyapatite coating on Ti–6Al–4V implant: A review paper. *International Journal of Adhesion and Adhesives*. 2014;(48):238–257. doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2013.09.030
4. Wang J, Chao Y, Wan Q, Zhu Z, Yu H. Fluoridated hydroxyapatite coatings on titanium obtained by electrochemical deposition. *Acta Biomaterialia*. 2009;5(5):1798–1807. doi.org/10.1016/j.actbio.2009.01.005
5. Drnovšek N, Rade K, Milačič R, Štrancar J, Novak S. The properties of bioactive TiO_2 coatings on Ti-based implants. *Surface and Coatings Technology*. 2012;(209):177–183. doi.org/10.1016/j.surfcoat.2012.08.037
6. Wu Y, Wang A, Zhang Z, Zheng R, Xia H, Wang Y. Laser alloying of Ti–Si compound coating on Ti–6Al–4V alloy for the improvement of bioactivity. *Applied Surface Science*. 2014;(305):16–23. doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.02.140
7. Mishnaevsky L, Levashov E, Valiev R, Segurado J, Sabirov I, Enikeev N, Prokoshkin S, Solov'yov A, Korotitskiy A, Gutmanas E, Gotman I, Rabkin E, Psakh'e, S, Dluhoš L, Seefeldt M, Smolin A. Nanostructured titanium-based materials for medical implants: Modeling and development. *Materials Science and Engineering: R: Reports*. 2014;(81):1–19. doi.org/10.1016/j.mser.2014.04.002
8. Andriyanov D, Amosov A, Samboruk A, Davydov D, Ishchenko V. Development of porous composite self-propagating high-temperature ceramics of the Ti–B–C system. *Russian Journal of Non-Ferrous Metals*. 2014;55(5):485–488. doi.org/10.3103/s1067821214050034
9. Hu C, Zhang H, Li F, Huang Q, Bao Y. New phases' discovery in MAX family. *International Journal of Refractory Metals and Hard Materials*. 2013;(36):300–312. doi.org/10.1016/j.ijrmhm.2012.10.011

Участие авторов

Концепция и дизайн исследования: Колсанов А.В.

Сбор и статистическая обработка материала: Николаенко А.Н., Иванов В.В.

Написание текста и его редактирование: Приходько С.А., Платонов П.В.

Конфликт интересов отсутствует.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Колсанов А.В. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой оперативной хирургии, клинической анатомии с курсом инновационных технологий СамГМУ.
E-mail: info@samsmu.ru

Николаенко А.Н. — к.м.н., ассистент кафедры травматологии, ортопедии и экстремальной хирургии имени академика РАН А.Ф. Краснова СамГМУ.
E-mail: nikolaenko.83@inbox.ru

Иванов В.В. — к.м.н., ассистент кафедры травматологии, ортопедии и экстремальной хирургии имени академика РАН А.Ф. Краснова СамГМУ.
E-mail: info@samsmu.ru

Приходько С.А. — аспирант кафедры травматологии, ортопедии и экстремальной хирургии имени академика РАН А.Ф. Краснова СамГМУ.
E-mail: info@samsmu.ru

Платонов П.В. — аспирант кафедры травматологии, ортопедии и экстремальной хирургии имени академика РАН А.Ф. Краснова СамГМУ.
E-mail: info@samsmu.ru

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Kolsanov AV — PhD, professor, head of the Department of operative surgery and clinical anatomy with the course of innovative technologies, Samara State Medical University.
E-mail: info@samsmu.ru

Nikolaenko AN — PhD, assistant of the Department of traumatology, orthopaedics and extreme surgery n.a. academician Krasnov AF, Samara State Medical University.
E-mail: nikolaenko.83@inbox.ru

Ivanov VV — PhD, assistant of the Department of traumatology, orthopaedics and extreme surgery n.a. academician Krasnov AF, Samara State Medical University.
E-mail: info@samsmu.ru

Prikhodko SA — postgraduate student of the Department of traumatology, orthopaedics and extreme surgery n.a. academician Krasnov AF, Samara State Medical University.
E-mail: info@samsmu.ru

Platonov PV — postgraduate student of the Department of traumatology, orthopaedics and extreme surgery n.a. academician Krasnov AF, Samara State Medical University.
E-mail: info@samsmu.ru

■ Контактная информация

Николаенко Андрей Николаевич

Адрес: Самарский государственный медицинский университет,
ул. Чапаевская, 89, г. Самара, Россия, 443099.
E-mail: nikolaenko.83@inbox.ru
Тел.: + 7 (904) 747 97 77.

■ Contact information

Nikolaenko Andrei Nikolaevich

Address: Samara State Medical University,
89 Chapaevskaya st.,
Samara, Russia, 443099.
E-mail: nikolaenko.83@inbox.ru
Phone: + 7 (904) 747 97 77.