

УДК 616-091.8

ОЦЕНКА ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ В ПРИСУТСТВИИ КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ СИЛИЦИДОВ ТИТАНА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

А.Н. Николаенко

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России

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

Цель работы. 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 методом прямого контакта *in vitro* использовались материалы: силицид титана, карбосилицид титана, оксидированный в вакууме и без вакуума, титан марки ВТ-00 (группа сравнения). Были рассчитаны индекс пролиферации, время удвоения и количество удвоений культуры за время культивирования.

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, что говорит о хорошей пролиферативной активности клеток в присутствии тестируемых материалов.

Заключение. Активная клеточная пролиферация свидетельствует о нетоксичности и биосовместимости исследуемых сплавов.

Введение

В настоящее время в реконструктивно-восстановительной хирургии костной ткани используют 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 ряд производителей дополнительно модифицируют поверхность оксидом

титана, гидроксиапатитом 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 особое внимание к изучению его сплавов и соединений [7]. В последнее время научный интерес сконцентрирован на пористых материалах на основе титана. Констатируется, что трехмерный дизайн пор способствует более успешному протеканию процессов остеоинтеграции. Отечественными исследователями был синтезирован материал из пористого титана в режиме горения с использованием моноборида титана (TiB) в качестве экзотермической добавки [8]. Новый материал показал высокую прочность и биосовместимость. Научный и практический интерес на сегодняшний день вызывает новый пористый материал — карбосилицид титана (Ti₃SiC₂). Карбосилицид титана синтезируется в режиме самораспространяющегося высокотемпературного синтеза (СВС) без при-

Адрес для корреспонденции

Николаенко А.Н.

E-mail: nikolaenko.83@inbox.ru

менения 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 он обладает целым рядом уникальных свойств: микропластичность, трещиностойкость, обрабатываемость резанием и др. Обрабатываемость резанием позволяет изготовить образцы любых геометрических форм и размеров. Данные свойства определяют широкую перспективу внедрения данного материала в медицинскую имплантологию.

Задачами данного исследования являются определение цитотоксичности и биосовместимости композиционных материалов на основе силицидов титана к дермальным фибробластам.

Цель исследования — оценка пролиферативной активности культуры дермальных фибробластов в присутствии композиционных материалов на основе силицидов титана в условиях *in vitro*.

Материалы и методы

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 ВТ-00 (группа сравнения). Материалы были получены на базе отраслевой научно-исследовательской лаборатории «Поволжский центр самораспространяющегося высокотемпературного синтеза» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Самарский государственный технический университет» (ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России). Пористые материалы были произведены методом СВС с использованием порошков 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 $3\text{Ti}+1,15\text{Si}+2\text{C}$ (в расчете на образование карбосилицида титана) и $\text{Ti}+2\text{Si}$ смешивались в шаровой мельнице 4 ч. 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 л 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. На рис. 1 показана макроструктура пористого карбосилицида титана, синтезированного на воздухе.

Микроструктура синтезированных материалов представляла собой пластины карбосилицида титана, окруженные кристаллами карбида титана (TiC). Из литературных источников известно, что такая микроструктура типична для материала на основе карбосилицида. На поверхности отчетливо визуализируется оксидная поверхностная пленка. Толщина оксидной пленки составляет 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 (рис. 2).

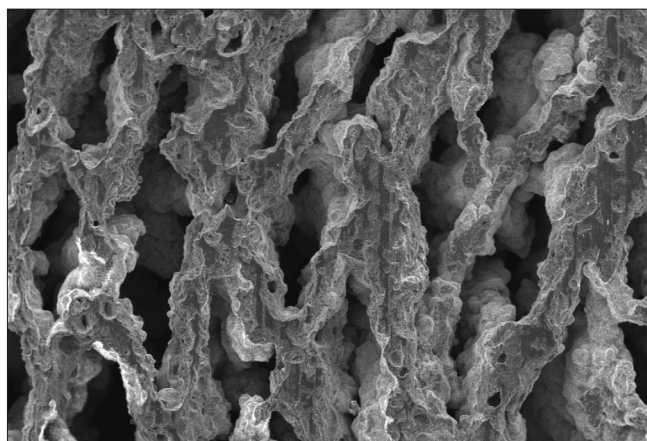


Рис. 1. Макроструктура карбосилицида титана (Ti_3SiC_2). Ув. $\times 30$

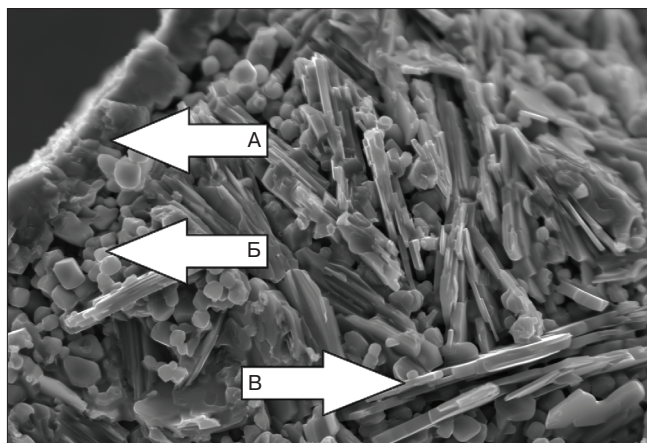


Рис. 2. Микроструктура карбосилицида титана (Ti_3SiC_2): А. оксидная поверхностная пленка; Б. кристаллы карбида титана (TiC); В. пластины карбосилицида титана (Ti_3SiC_2). Ув. $\times 1000$

Исследования были проведены в лаборатории культур клеток Института экспериментальной медицины и биотехнологий ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. 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-го 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 ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России.

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 °С 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 ч после посева, после чего продолжали культивирование в течение 7 сут. 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.

Индекс пролиферации определяли по формуле (1):

$$(1) IP = N_2/N_1, \text{ где}$$

N_1 — количество клеток монослоя, принятое за исходное;

N_2 — количество клеток монослоя через 24 ч культивирования.

Индекс пролиферации высчитывали каждые 24 ч культивирования. За первое значение N_1 принимали плотность монослоя через 24 ч после посадки клеток.

Время удвоения культуры рассчитывали по формуле (2):

$$(2) TD = t \times \lg 2 / \lg(N_t/N_0), \text{ где}$$

t — время роста культуры (часы);

N_0 — начальное количество клеток;

N_t — количество клеток через t часов.

Количество удвоений культуры вычисляли по формуле (3):

$$(3) K = (\lg N_t - \lg N_0) / \lg 2, \text{ где}$$

N_0 — количество клеток в монослой через 24 ч после посадки;

N_t — количество клеток в монослой по окончании эксперимента.

Прикрепление дермальных фибробластов к поверхности тестируемых материалов и наличие их на ней при длительном культивировании оценивали при помощи растровой электронной микроскопии (РЭМ). Образцы размером 3,5×3,5×2 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 мин и проводили по батареи спиртов возрастающей концентрации (60% — 80% — 96% — абсолютный спирт; 2 мин 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 (M) 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).

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 4,4 для Ti_3SiC_2 (оксидированный) до 4,58 для Ti_3SiC_2 (оксидированный в вакууме)) и достигали плотности насыщения через 7 сут после посева (табл. 1–3), 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 четверо суток после посева, затем

Таблица 1. Показатели пролиферативной активности культуры дермальных фибробластов в присутствии образца TiSi

Срок	Контрольная культура				Ti				TiSi			
	Кл./мм ²	IP	TD	Кол. удв.	Кл./мм ²	IP	TD	Кол. удв.	Кл./мм ²	IP	TD	Кол. удв.
Исх.	45,2±0,2	—	—	—	45,2±0,2	—	—	—	45,2±0,2	—	—	—
1 сут	90,3±0,8	2,00	24,11	—	88,3±0,5	1,96	24,84	—	89,5±0,6	1,97	24,94	—
2 сут	185,5±2,6	2,01	23,06	—	179,4±0,8	2,03	23,45	—	172,8±0,5*	1,93*	24,90*	—
3 сут	427,4±9,7	2,32	19,93	—	403,8±5,4	2,25	20,50	—	401,4±3,3	2,33	19,74	—
4 сут	640,9±15,1	1,50	40,00	—	602,4±8,7	1,49	41,50	—	598,3±9,7	1,49	42,52	—
5 сут	832,6±12,3	1,31	63,06	—	793,2±12,6	1,32	60,20	—	786,6±8,9	1,31	60,72	—
6 сут	997,8±14,2	1,19	90,25	—	907,3±14,3	1,14	120,40	—	898,2±10,8	1,14	120,40	—
7 сут	1058,0±19,7	—	—	4,47	954,6±15,7	1,05	—	4,41	957,0±9,4	1,04	—	4,41

Примечание: * отличия от контрольной группы значимы при $p \leq 0,05$ (95%).

Таблица 2. Показатели пролиферативной активности культуры дермальных фибробластов в присутствии образца Ti_3SiC_2 (оксидированного без вакуума)

Срок	Контрольная культура				Ti				Ti_3SiC_2 (оксидированный без вакуума)			
	Кл./мм ²	IP	TD	Кол. удв.	Кл./мм ²	IP	TD	Кол. удв.	Кл./мм ²	IP	TD	Кол. удв.
Исх.	45,2±0,2	—	—	—	45,2±0,2	—	—	—	45,2±0,2	—	—	—
1 сут	90,3±0,8	2,00	24,11	—	88,3±0,5	1,96	24,84	—	63,0±1,1*	1,40*	49,44*	—
2 сут	185,5±2,6	2,01	23,06	—	179,4±0,8	2,03	23,45	—	119,5±3,5*	1,89*	26,13*	—
3 сут	427,4±9,7	2,32	19,93	—	403,8±5,4	2,25	20,50*	—	237,4±4,6*	1,99*	24,13*	—
4 сут	640,9±15,1	1,50	40,00	—	602,4±8,7	1,49	41,50	—	494,2±6,7*	2,08*	22,71*	—
5 сут	832,6±12,3	1,31	63,06	—	793,2±12,6	1,32	60,20	—	701,9±14,3*	1,42	47,44*	—
6 сут	997,8±14,2	1,19	90,25	—	907,3±14,3	1,14	120,40	—	897,0±12,6*	1,28*	67,39*	—
7 сут	1058,0±19,7	—	—	4,47	954,6±15,7	1,05	—	4,41	952,3±8,4*	1,06	—	4,40

Примечание: * отличия от контрольной группы значимы при $p \leq 0,05$ (95%).

Таблица 3. Показатели пролиферативной активности культуры дермальных фибробластов в присутствии образца Ti_3SiC_2 (оксидированного в вакууме)

Срок	Контрольная культура				Ti				Ti_3SiC_2 (оксидированный в вакууме)			
	Кл./мм ²	IP	TD	Кол. удв.	Кл./мм ²	IP	TD	Кол. удв.	Кл./мм ²	IP	TD	Кол. удв.
Исх.	45,2±0,2	—	—	—	45,2±0,2	—	—	—	45,2±0,2	—	—	—
1 сут	90,3±0,8	2,00	24,11	—	88,3±0,5	1,96	24,84	—	99,7±1,5*	2,20*	21,25*	—
2 сут	185,5±2,6	2,01	23,06	—	179,4±0,8	2,03	23,45	—	203,3±3,1*	2,04	23,16	—
3 сут	427,4±9,7	2,30	19,93	—	403,8±5,4	2,25	20,50	—	471,7±6,3*	2,32	19,76	—
4 сут	640,9±15,1	1,50	40,00	—	602,4±8,7	1,49	41,50	—	681,5±8,7*	1,45	45,16*	—
5 сут	832,6±12,3	1,31	63,06	—	793,2±12,6	1,32	60,20	—	872,5±9,7*	1,28	67,25	—
6 сут	997,8±14,2	1,19	90,25	—	907,3±14,3	1,14	120,40	—	1062,3±10,3	1,22	84,10	—
7 сут	1058,0±19,7	—	—	4,47	954,6±15,7	1,05	—	4,41	1080,2±7,8	—	—	4,58

Примечание: * отличия от контрольной группы значимы при $p \leq 0,05$ (95%).

темп этого процесса прогрессивно замедлялся, что демонстрировалось значительным снижением индекса пролиферации (IP) и увеличением времени удвоения культуры (TD) (см. табл. 1), начиная с 5-х суток от посева культуры (4-х суток от начала эксперимента). Помещение на монослой образца Ti_3SiC_2 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 ВТ-00 (см. табл. 2).

Характеристики пролиферативной активности культуры фибробластов в присутствии образцов TiSi практически не отличались от показателей как в контрольных культурах, так и в материале сравнения — титане ВТ-00, в то время как помещение Ti_3SiC_2 (оксидированный в вакууме) сразу же усиливало пролиферативную активность культуры дермальных фибробластов, что приводило к достоверному увеличению плотности монослоя уже к концу первых суток эксперимента (см. табл. 3). В дальнейшем интенсивность пролиферации снижалась до уровня контрольной культуры, но плотность монослоя превышала не только показатели в группе сравнения (титан марки ВТ-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 распластывались на поверхности материалов, образуя на ней более или менее плотный монослой (рис. 3–5). Значительные белковые

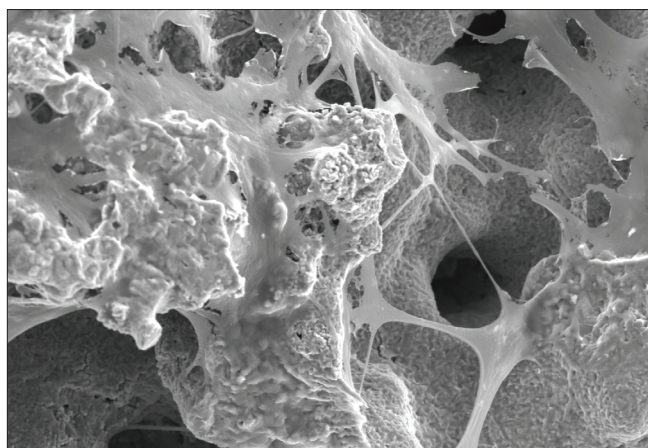


Рис. 3. РЭМ. Культура дермальных фибробластов на образце силицида титана (TiSi). Ув. $\times 500$

наслоения на поверхности материалов косвенно свидетельствовали о синтетической активности прикрепленных клеток. Наиболее демонстративно этот процесс представлен на образце Ti_3SiC_2 , оксидированном без вакуума (рис. 4).

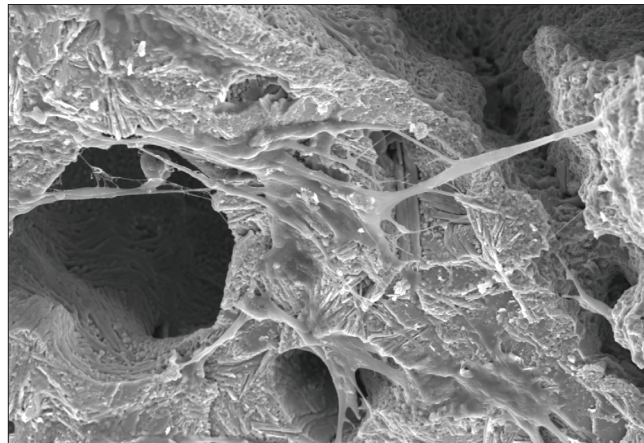


Рис. 4. РЭМ. Культура дермальных фибробластов на образце карбосилицида титана, оксидированного без вакуума (Ti_3SiC_2). Ув. $\times 500$

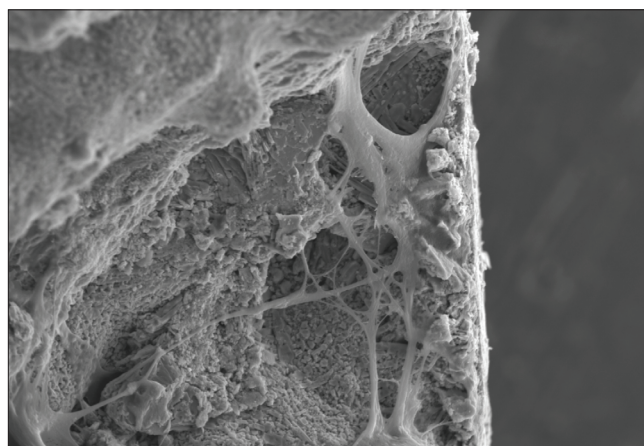


Рис. 5. РЭМ. Культура дермальных фибробластов на образце карбосилицида титана, оксидированного в вакууме (Ti_3SiC_2). Ув. $\times 500$

Выводы

1. 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.

2. Обнаруженная способность клеток адгезироваться к поверхности материалов, распластываться на ней и образовывать монослой позволяет предположить хорошую биосовместимость композиционных материалов на основе силицидов титана.

ЛИТЕРАТУРА

1. Andani M.T., Shayesteh Moghaddam N., Haberland C. et al. Metals for bone implants. Part 1. Powder metallurgy and implant rendering. *Acta Biomaterialia*. 2014, v. 10 (10), p. 4058-4070.
2. Elahinia M.H., Hashemi M., Tabesh M. et al. Manufacturing and processing of NiTi implants: A review. *Progress in Materials Science*. 2012, v. 57 (5), p. 911-946.
3. Mohseni E., Zalnezhad E., Bushroa A.R. Comparative investigation on the adhesion of hydroxyapatite coating on Ti-6Al-4V implant: A review paper. *International Journal of Adhesion and Adhesives*. 2014, v. 48, p. 238-257.
4. Wang J., Chao Y., Wan Q. et al. Fluoridated hydroxyapatite coatings on titanium obtained by electrochemical deposition. *Acta Biomaterialia*. 2009, v. 5 (5), p. 1798-1807.
5. Drnovšek N., Rade K., Milačič R. et al. The properties of bioactive TiO₂ coatings on Ti-based implants. *Surface and Coatings Technology*. 2012, v. 209, p. 177-183.
6. Wu Y., Wang A., Zhang Z. et al. Laser alloying of Ti-Si compound coating on Ti-6Al-4V alloy for the improvement of bioactivity. *Applied Surface Science*. 2014, v. 305, p. 16-23.
7. Mishnaevsky L., Levashov E., Valiev R. et al. Nanostructured titanium-based materials for medical implants: Modeling and development. *Materials Science and Engineering: R: Reports*. 2014, v. 81, p. 1-19.
8. Andriyanov D.I., Amosov A.P., Samboruk A.R. et al. Development of porous composite self-propagating high-temperature ceramics of the Ti-B-C system. *Russian Journal of Non-Ferrous Metals*. 2014, v. 55 (5), p. 485-488.
9. Hu C., Zhang H., Li F. New phases' discovery in MAX family. *International Journal of Refractory Metals and Hard Materials*. 2013, v. 36, p. 300-312.

Статья поступила 25.09.2017 г., принята к печати 02.10.2017 г.
Рекомендована к публикации Е.А. Сушенцовым

EVALUATION OF THE PROLIFERATIVE ACTIVITY OF DERMAL FIBROBLASTS IN THE PRESENCE OF COMPOSITE MATERIALS BASED ON TITANIUM SILICIDES *IN VITRO*

Nikolaenko A.N.

Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «Samara State Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara

Key words: medical implants, biocomposite materials, titanium silicides, dermal fibroblasts

Objective. To evaluate the proliferative activity of dermal fibroblast cultures in the presence of composite materials based on titanium silicides in *in vitro* conditions.

Materials and methods. To assess the proliferative activity of dermal fibroblasts by *in vitro* direct contact test, with the use of titanium silicide, titanium carbosilicide oxidized in vacuum and without vacuum, titanium VT00 (comparison group). The proliferation index, the doubling time and the number of culture doubling during the cultivation time were calculated.

Results. To assess the proliferative activity of dermal fibroblasts by *in vitro* direct contact test, with the use of titanium silicide, titanium carbosilicide oxidized in vacuum and without vacuum, titanium VT00 (comparison group). The proliferation index, the doubling time and the number of culture doubling during the cultivation time were calculated.

Conclusion. Active cell proliferation testifies to the non-toxicity and biocompatibility of the investigated alloys.