
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ ДЕТЕРМИНИРОВАННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ОБЛАСТИ КОНТАКТА ИМПЛАНТАТ — КОСТНАЯ ТКАНЬ

Д.В. Штанский

ФГОУ ВПО «Государственный технологический университет
„Московский государственный институт стали и сплавов“»
Ленинский просп., 4, Москва, Россия, 119049

И.И. Селезнева

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
ул. Институтская, 3, Пущино, Московская обл., Россия, 142290

И.И. Бабиченко

Кафедра патологической анатомии
ФГБОУВПО «Российский университет дружбы народов»
ул. Миклухо-Маклая, 6, Москва, Россия, 117198

А.В. Архипов

Отделение клинической и экспериментальной имплантологии
ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт
стоматологии и челюстно-лицевой хирургии»
ул. Тимура Фрунзе, 16, Москва, Россия, 119021

А.С. Григорьян

Лаборатория патологической анатомии
ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт
стоматологии и челюстно-лицевой хирургии»
ул. Тимура Фрунзе, 16, Москва, Россия, 119021

В задачи работы входило: а) разработка метода модификации поверхности политетрафторэтилена (ПТФЭ) путем нанесения наноструктурного металлического или керамического покрытия; б) исследование возможности использования полученной таким образом конструкции с различными по составу покрытиями в качестве экспериментальной модели для исследования тонких взаимодействий в области контакта имплантат — тканевые элементы периимплантационной зоны.

Исследование продемонстрировало, что модификация поверхности ПТФЭ путем магнетронного напыления нанопокровов Ti и $Ti-Ca-P-C-O-N$ приводит к повышению интеграционного потенциала материалов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что разработанные конструкции могут быть с успехом использованы в качестве экспериментальной модели для изучения взаимодействий в области интерфейса имплантат — тканевые элементы периимплантационной зоны.

Ключевые слова: экспериментальные модели, нанотехнологии, биоинженерные конструкции, клеточные технологии.

Развитие научных технологий, которые открывают перед стоматологией широкие перспективы совершенствования методов исследования и поиска новых средств и методов решения практических задач, актуализировало проблему раскрытия биологических основ взаимодействий, возникающих в области контакта имплантат — периимплантационные тканевые элементы. На наш взгляд, — это и научная проблема и не в меньшей степени вопрос методологии.

В свете сказанного мы поставили перед собой нижеследующие задачи:

а) расширить сферы применения модификации поверхности политетрафторэтилена (ПТФЭ), основанного на нанесении наноструктурного металлического или керамического покрытия на нерезорбируемую полимерную подложку;

б) исследовать возможности использования полученной таким образом конструкции в качестве экспериментальной модели для исследования тонких взаимодействий в области контакта имплантат — тканевые элементы периимплантационной зоны.

Эти задачи диктуются ситуацией, сложившейся в современных исследовательских технологиях. Основная часть работ по исследованию области контакта имплантат — костная ткань выполняется с помощью устройств типа Exact-system. Это пилящие высоко прецессионные устройства, позволяющие получать достаточно тонкие пластины из не декальцинированной кости и металлических объектов. Но эти устройства очень дороги и не лишены недостатков. В частности, при пилении происходит утрата больших количеств материала исследуемого объекта, возникают артефакты. К тому же не декальцинированная ткань не восприимчива к специфическим красителям, в том числе к ИГХ маркерам.

В нашем исследовании для апробации предлагаемой экспериментальной модели использована конструкция, основанная на применении пористой ПТФЭ подложки с нанесенным на нее многофункциональным биоактивным наноструктурным покрытием, разработанным в МИСиС [10, 14].

Методика исследования. Для изготовления гибридных конструкций в качестве подложек с многофункциональным биоактивным наноструктурным покрытием (НБНП) использовали образцы из ПТФЭ пористостью 36% (производство ЗАО «НПК «Экофлон»). Для осаждения НБНП применяли композиционную мишень $Ti_{0,5}+Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, синтезированную по технологии силового СВС-компактирования на базе опытно-промышленного участка самораспространяющегося высокотемпературного синтеза (СВС) Научно-учебного центра СВС МИСиС-ИСМАН [10]. Для нанесения металлического покрытия использовалась мишень из чистого титана (Ti). Осаждение покрытий Ti–Ca–P–C–O–N (мишень $Ti_{0,5}+Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) и Ti на подложку из ПТФЭ осуществляли в течение 60 минут путем магнетронного распыления композиционных мишеней в газовой смеси аргона с азотом, при парциальном давлении азота 14%. В процессе напыления давление в вакуумной камере и температура подложки составляли соответственно 0,2 Па и 120—150 °С. Толщина покрытия составляла 500 нм.

Для прививки на поверхности имплантатов биологического материала использовали клетки, выделенные из кожно-мышечной ткани зародышей человека на сроке 6—8 недель. Клетки культивировали в среде ДМЕМ/199 (1 : 1) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone) и 100 Ед/мл пенициллин/стрептомицина в атмосфере 5% CO_2 . Для проведения исследований была использована культура клеток на 11 пассаже ($CD133^-$, $Cd117^-$, $CD45^-$, $CD90^+$, $CD54^-$, $CD62L^-$, $CD62P^-$, $CD9^+$, $CD34^-$, $CD31^-$, $CD71^-$, $CD20^-$, $CD157^-$, $CD106^+$, $CD62E^+$).

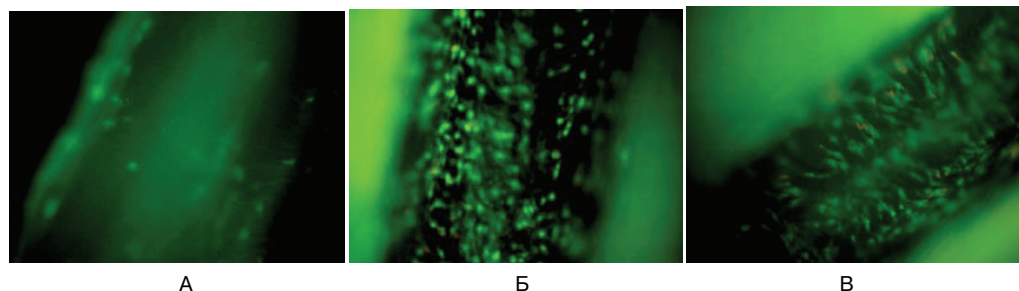
Клетки высевали на поверхность исследуемых образцов с плотностью 35 тыс./см² и культивировали в течение 72 часов. Оценку морфологии и жизнеспособности клеток проводили на микроскопе Axiovert 200 (Карл Цейс, Германия) с использованием метода окрашивания 0,0002% раствором акридинового оранжевого в фосфатном буфере.

Для исследования методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) была проведена процедура фиксации клеток на поверхности материалов. По истечении 72 часов с момента посева клеток образцы промывали 0,1 М фосфатно-солевым буфером (ФСБ), pH 7,4, после чего фиксировали в течение 2 часов 2,5% раствором глутарового альдегида в ФСБ. После удаления фиксирующего раствора образцы промывали ФСБ и проводили дегидратацию материала, после удаления этанола образцы помещали на 30 минут в гексаметилдисилазан (HMDS), после чего высушивали на воздухе. Окончательное высушивание образцов осуществляли методом перехода через критическую точку на аппарате Hitachi CPD-1 (Critical Point Dryer). После чего их фиксировали на предметные столики и напыляли смесью золото-палладий, используя установку Eiko-IB3 (Ion coater) при следующем режиме: ионный ток — 6 мА, межэлектродное напряжение — 1,5 кВ, что позволяло получать толщину слоя напыления около 25 нм. Изучение объектов проводили на аппарате CamScan S-2 (Cambridge Scanning) в режиме регистрации вторичных электронов при ускоряющем напряжении 20 кВ. Захват и обработку видеоизображения на персональном компьютере реализовывали с использованием программно-аппаратного комплекса Microcapture 2.2 (системы для микроскопии и анализа).

Результаты исследования. При культивировании клеток в присутствии всех исследуемых материалов не наблюдалось угнетения клеточной активности и гибели клеток, что показывает отсутствие водорастворимых фракций, оказывающих токсическое воздействие на клетки. Для визуализации клеток на поверхности исследуемых материалов был использован метод окрашивания акридиновым оранжевым. Данный краситель селективно взаимодействует с ДНК и РНК, при этом интеркалированная красителем двухцепочечная ДНК флуоресцирует в зеленом свете (525 нм), а электростатически связанный с РНК и одноцепочечной ДНК акридиновый оранжевый флуоресцирует в красной области (> 630 нм), что делает возможным проведение общей оценки состояния клеток [13]. Исследование показало, что нанесение нанопокровов Ti и Ti-Sa-P-C-O-N приводит к повышению адгезионных характеристик материала по сравнению с ПТФЭ без покрытия.

В обоих образцах материалов с модифицированной магнетронным напылением поверхностью наблюдалась высокая жизнеспособность клеток, о чем свидетельствовало зеленое свечение ядер, как это бывает при целостности ДНК. Отсутствие окрашенных красным цветом ядер свидетельствует об отсутствии погибших клеток (рис. 1а, 1б, 1в).

Для более детального исследования поведения клеток на поверхности исследуемых материалов был использован метод сканирующей электронной микроскопии.



А

Б

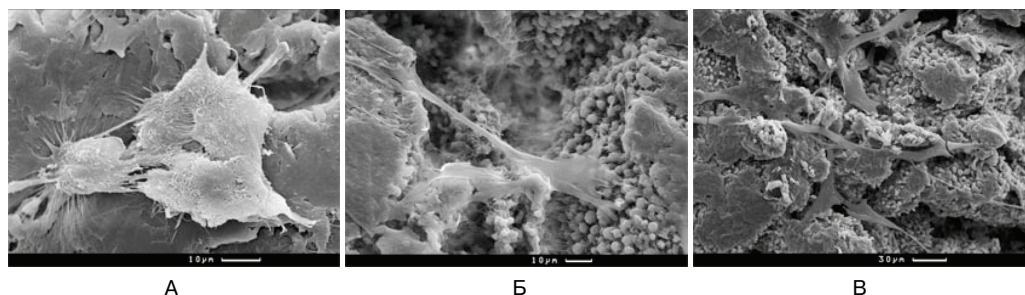
В

Рис. 1. Люминесцентная микроскопия:

А — клетки на поверхности ПТФЭ без покрытия. Б — клетки на поверхности ПТФЭ с покрытием Ti. В — клетки на поверхности ПТФЭ с покрытием Ti–Ca–P–C–O–N, окраска акридиновым оранжевым, $\times 100$

На электронограммах образцов ПТФЭ без покрытия преобладают относительно гладкие участки материала, слабое распластывание клеток и тенденция к формированию небольших клеточных кластеров, что говорит о низкой адгезивности ПТФЭ (рис. 2а).

На образцах материалов с нанопокрытиями Ti и Ti–Ca–P–C–O–N видна хорошо развитая поверхность материала и «заглубления» с отчетливой гранулярной структурой (рис. 2б, 2в). На поверхности данных образцов наблюдается активное прикрепление и распластывание клеток, многие из клеток проявляют тенденцию к локомоциям. Отростки большинства клеток протягиваются на значительные расстояния и достигают отростков других клеток, соединялись с ними, в результате чего на поверхности образца формируется клеточный синцитий, или «био пленка» (определение наше). Особенно интенсивно этот процесс был выражен на поверхности образцов ПТФЭ с покрытием Ti–Ca–P–C–O–N.



А

Б

В

Рис. 2. Сканирующая электронная микроскопия:

А — группа клеток на поверхности ПТФЭ без покрытия $\times 1240$.
Б — клетки на поверхности ПТФЭ с нанопокрытием Ti $\times 920$. В — клетки на поверхности ПТФЭ с нанопокрытием Ti–Ca–P–C–O–N $\times 390$

Учитывая то, что мы использовали покрытия различного состава, можно считать, что на данной экспериментальной модели можно будет исследовать конструкции с различного типа покрытиями, в чем и заключается идея предлагаемой экспериментальной модели.

Таким образом, модификация поверхности ПТФЭ путем магнетронного напыления наноструктурных покрытий Ti и Ti–Ca–P–C–O–N приводит к формиро-

ванию развитой поверхности с оптимизированными физико-химическими свойствами, обуславливающими повышение адгезионного потенциала материала. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что разработанная нами экспериментальная модель открывает новые перспективы изучения тонких механизмов взаимодействия в области интерфейса имплантат — перимплантационные тканевые элементы.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Григорьян А.С., Филонов М.Р., Штанский Д.В. и др. Новый тип имплантационного материала на основе политетрафторэтилена с металлическими и керамическими покрытиями // *Стоматология*. — 2007. — Спецвыпуск. — С. 20—26.
- [2] Григорьян А.С., Филонов М.Р., Кулаков А.А. и др. Способ получения имплантационного материала на основе пористого политетрафторэтилена и материал, полученный этим способом // Заявка на патент РФ № 2007105829/15(006334) от 16.02.2007, положительное решение от 26.11.2007.
- [3] Григорьян А.С., Грудянов А.И., Ерохин А.И. Эффективность культуры фибробластов человека М-22, как фактора тканевой инженерии при пластике костных дефектов нижней челюсти // *Стоматология*. — 2002. — № 5. — С. 19—26.
- [4] Деев Р.В., Цупкина Н.В., Николаенко Н.С. и др. Использование стромальных клеток костного мозга, мобилизованных на гранулах биоситалла, для пластики костей мозгового черепа // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. — 2007. — Т. 2. — № 2. — С. 62—67.
- [5] Дулаев А.К., Гололобов В.Г., Деев Р.В. и др. Остеогенные клетки и их использование в травматологии // *Медицинский академический журнал*. — 2003. — № 3. — С. 59—66.
- [6] Зорин В.Л., Крашенинников М.Е., Фролов В.И. и др. Использование иммобилизованных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга для регенерации трубчатых костей при обширных резекциях // *Вестн. транспл. и искусст. органов*. — 2004. — № 1. — С. 25—32.
- [7] Иванов С.Ю., Кузнецов Р.К., Чайлахян Р.К. и др. Перспективы применения в стоматологии материалов «Биоматрикс» и «Алломатрикс-имплант» в сочетании с остеогенными клетками предшественниками костного мозга // *Клин. имплантол. и стоматол.* — 2000. — № 3/4. — С. 37—40.
- [8] Итин В.И., Прибытков Г.А., Хлусов И.А. и др. Имплантат — носитель клеточного материала из пористого проницаемого титана // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. — 2006. — № 3. — С. 59—63.
- [9] Кулаков А.А., Григорьян А.С., Филонов М.Р. и др. Влияние различных по химическому составу покрытий интраоссальных титановых имплантатов на их интеграцию в кость // *Росс. вестн. дент. имплантол.* — 2007. — № 3/4. — С. 10—15.
- [10] Левашов Е.А., Штанский Д.В. Биосовместимые наноструктурные покрытия для медицины // *Информация и инновации*. — 2007. — № 1. — С. 63—64.
- [11] Чобану П.И., Лаврищева Г.И. и Козлюк А.С. Стимуляция остеогенеза костномозговыми клетками при осложненных переломах. — Кишинев: Штиинца, 1989. — 180 с.
- [12] Щепкина Е.А., Кругляков П.В., Соломин Л.Н. и др. Трансплантация аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на деминерализованном костном матриксе при лечении ложных суставов длинных трубчатых костей // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. — 2007. — Т. 2. — № 3. — С. 67—74.
- [13] Darzynkiewicz Z., Bruno S., Del Bino G. et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry // *Cytometry*. — 1992. — V. 13. — № 8. — P. 795—808.
- [14] Shtansky D.V., Grigoryan A.S., Levashov E.A. et al. Multifunctional Bio-compatible Nanostructured Coatings for Load-Bearing Implants // *Surface and Coatings Technology*. — 2006. — V. 201. — P. 4111—4118.

EXPERIMENTAL MODEL FOR INVESTIGATION OF BIOLOGICALLY DETERMINED INTERACTIONS IN THE IMPLANT — BONE CONTACT

D.V. Shtansky

National University of Science and Technology «MISIS»
Leninskiy ave., 4, Moscow, Russia, 119049

I.I. Selezneva

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics
Institutskaya str., 3, Pushchino, Moscow Region, Russia, 142290

I.I. Babichenko

Department of Pathological Anatomy
Peoples' Friendship University of Russia
Miklukho-Maklaya str., 6, Moscow, Russia, 117198

A.V. Arkhipov

Department of clinical and experimental implantology
Central Research Institute for Stomatology
Timur Frunze str., 16, Moscow, Russia, 119021

A.S. Grigor'yan

Laboratory of Pathologic Anatomy
Central Research Institute for Stomatology
Timur Frunze str., 16, Moscow, Russia, 119021

Aim: a) to develop the method for surface modification of polytetrafluoroethylene (PTFE) by applying a nanostructured metallic or ceramic coating, b) to study the possibility of using this obtained structures with different coatings as an experimental model for analysis of the fine interactions in the contact implant-tissue zone.

The study demonstrates that the surface modification of PTFE by magnetron sputtering of nano-Ti and Ti-Ca-P-C-O-N leads to increased integration potential of materials. Data obtained indicate that the designed constructions can be successfully used as an experimental model for studying the interactions of implant — tissue interface elements of periimplant area.

Key words: experimental model, nanotechnology, bioengineering design, cellular technology.