

БИОСОВМЕСТИМОСТЬ ОБРАЗЦОВ ТИТАНА С АЛМАЗОПОДОБНЫМИ ПОКРЫТИЯМИ С КУЛЬТУРОЙ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ ЛЕЙКОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

¹Макарова Э.Б., ²Рубштейн А.П., ¹Трифопова Е.Б., ²Трахтенберг И.Ш., ¹Осипенко А.В., ²Плотников С.А., ³Хузага-лева Ю.Р., ¹Галкин П.В.

¹ФГУ «УНИИТО им. В.Д. Чаплина» Минздравсоцразвития России ²Институт физики металлов УрО РАН
³Уральский федеральный университет
Россия, г. Екатеринбург

Контактный e-mail: emilia1907@yandex.ru

В современной медицине широко применяют металлические импланты, поэтому изучение бионертности их материалов актуально. При использовании легированной стали в организме могут развиваться воспалительные или аллергические реакции [4]. Титан обладает большей инертностью, гипоаллергенностью, не токсичен. Для повышения бионертности титановых имплантов применяют модификацию его поверхности. Один из вариантов - использование алмазоподобных напылений. Использование на первом этапе тестирования новых материалов культур клеток позволяет *in vitro* оценивать влияние изучаемого материала на иммунокомпетентные клетки. Исходя из этого, *цель* данного исследования - изучение жизнеспособности, функциональной и метаболической активности лейкоцитов крови человека при культивировании их на образцах титана с углеродсодержащими (а-С:Н) напылениями.

Материалы и методы исследования

Исследование а-С:Н напылений, полученных деструкцией ацетилена в плазме импульсного несамостоятельного разряда с инжекцией электронов [7] выполнено в культуре клеток периферической крови человека. Пленки толщиной 150-200 нм осаждались на образцы (10x10x1 мм) титана марки ВТ1-0 (ГОСТ 19807-91). Шероховатость поверхности титановых образцов - $R_a = 1,8$ мкм. Для тестирования выбраны пленки а-С:Н₍₁₀₀₎ и а-С:Н₍₃₀₀₎, полученные при напряжении на катоде 100 В и 300 В соответственно. Контроль образцы титана без покрытия. Лейкоциты и эритроциты фракционировали методом седиментации. Доводили концентрацию клеток до 3×10^6 клеток/мл. В лунки планшетов помещали образцы титана, 250 мкл суспензии лейкоцитов в культуральной среде (среда 199, сыворотка крупного рогатого скота, L-глутамин 30 мг/100мл, гентамицин), инкубацию проводили 4 часа в CO₂-инкубаторе (при 37°C, абсолютной влажности). В супернатанте лейкоцитов изучали активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), НСТ-тест в модификации [3]. В лизате адгезировавших клеток унифицированными методами определяли активность ЛДГ и малатдегидрогеназы (МДГ), концентрацию лактата (МК), пирувата (ПВК), белка [5] на биохимическом анализаторе Sapphire-400 (Япония) с использованием тест-систем DiaSys. Концентрации ПВК [1] и белка (с пирогаллоловым красным) определяли на КФК-3. Количество прилипших клеток изучали методом растровой электронной микроскопии (QUANTA-200). Клетки фиксировали 5% глутаровым аль-

дегидом, а затем дегидратировали в спиртах. Суммарное количество адгезировавших клеток вычисляли по 50 снимкам каждого образца. Площадь одного снимка составила 0,34 мм². Статистическая обработка данных выполнена с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни [2].

Результаты и их обсуждение

Анализ полученных данных выявил значимый рост активности ЛДГ (до 134,8%) в супернатанте лейкоцитов, инкубированных на образцах с а-С:Н₍₁₀₀₎ покрытием, по сравнению с контрольными образцами и образцами титана с а-С:Н₍₁₀₀₎ покрытием, что указывало на рост количества погибших клеток. Считают, что ЛДГ - стабильный цитозольный фермент, его высвобождение во внеклеточное пространство в культуре происходит при повреждении клеточных мембран. Активность дегидрогеназ, по оценке в НСТ-тесте, который считают информативным показателем жизнеспособности и функции клеток [8], значимо выросла до 126,8% на а-С:Н₍₁₀₀₎ покрытии.

В лизате адгезировавших лейкоцитов активность МДГ значимо снижена до 48,7% на С:Н₍₁₀₀₎ пленке и до 71,7% на С:Н₍₃₀₀₎ пленке. При использовании напылений мы отметили снижение активности ферментов окислительного обмена и изменение его баланса в сторону аэробных реакций. Концентрация ПВК изменяется разнонаправлено в культурах, адгезировавших на разные пленки: на а-С:Н₍₁₀₀₎ снижена до 54%, а на а-С:Н₍₃₀₀₎ отмечена тенденция роста до 124%, что коррелировало с индексом ЛДГ/МДГ, активность которых снижена на алмазоподобных покрытиях до 46% ($p < 0,05$) и 71% соответственно. С:Н₍₁₀₀₎ пленки сначала активировали окислительные реакции на фоне роста числа адгезировавших клеток, однако после адгезии их активность снижена, вероятно, из-за более длительного контакта лейкоцитов и а-С:Н₍₁₀₀₎, а также разного состава клеток в реакциях. Активность ЛДГ и НСТ-тест исследовали в супернатанте лейкоцитов, а в лизате изучали реакцию адгезировавших на титан с алмазоподобным покрытием клеток.

Количество клеток, адгезировавших на а-С:Н₍₁₀₀₎, больше, на а-С:Н₍₃₀₀₎ снижено до 77 %, по сравнению с имплантатами без покрытий.

Полученные данные обусловлены физическими и химическими свойствами пленок, полученных по новой технологии: а-С:Н₍₁₀₀₎ и а-С:Н₍₃₀₀₎ имеют разную плотность, твердость, состав, шероховатость (таблица 1).

Таблица 1

Физические характеристики алмазоподобных покрытий

Тип пленки	Плотность ρ , г/см ³	Твердость Н _v , ГПа	Шероховатость R_a , нм	Содержание водорода, ат.%
а-С:Н ₍₁₀₀₎	2,0 - 2,2	22	38	> 5
а-С:Н ₍₃₀₀₎	2,4 - 2,5	45	18	< 1

Одна из причин увеличения числа адгезировавших клеток на а-C:H₍₁₀₀₎ – большая шероховатость, которая увеличивает краевой угол смачивания и снижает поверхностную энергию, т.е. а-C:H₍₁₀₀₎ менее гидрофильна, чем а-C:H₍₃₀₀₎, что увеличивает адгезию белков, а следовательно и клеток. Также эта пленка содержит большее количество водорода.

Микрошероховатость пленки и макрошероховатость титана влияют на адгезию клеток [10], а химический состав, гидрофильность и поверхностная энергия – на их жизнеспособность [9]. Известно, что повышение содержания водорода в алмазоподобных пленках увеличивает их полярную компоненту, что снижает интенсивность пролиферации тестируемой культуры остеобластов [6].

Кроме того, в пленках выявлен аргон (менее 1 ат.% в а-C:H₍₁₀₀₎ и несколько ат.% в а-C:H₍₃₀₀₎). Считают вероятным существование соединений со связями –Ar-CCH, также известны клатраты – его включения в полости молекулярных кристаллических решеток, например с фенолом (Ar3C₆H₅OH). В каком виде присутствует аргон в полученных алмазоподобных пленках – неизвестно.

И, наконец, учитывая полученную плотность образованных пленок, гораздо меньшую, чем твердость алмазоподобных пленок та-C (ρ–3,2-3,3 г/см³), полагаем, что при разложении ацетилена и внедрении водорода в углеродное покрытие произошла полимеризация ацетилена с образованием органических соединений, присутствующих в пленке. Вероятность такой реакции существует, так как при полимеризации ацетилена в бензол необходим графит как катализатор и высокая температура. Присутствие бензола объяснило бы токсический эффект, выявленный у тестируемых покрытий.

Выводы

Изученные in vitro в культуре лейкоцитов периферической крови человека алмазоподобные покрытия титана а-C:H₍₁₀₀₎ и а-C:H₍₃₀₀₎ не проявили бионертности, так как снижали жизнеспособность клеток, активность ферментов окислительного обмена и изменяли его баланса в сторону аэробных реакций, а так же ингибировали функцию лейкоцитов. Проведенное исследование показало, что технология создания имплантов с а-C:H₍₁₀₀₎ и а-C:H₍₃₀₀₎ требует дальнейшего исследования их физических свойств и химического состава.

Литература

1. Бабаскин П.М. Метод определения пировиноградной кислоты в крови // Лабораторное дело. – 1973. - № 8. – С.41-44.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц // Практика. – М., 1999. – 459 с.
3. Киселева Е.П., Полевщиков А.В. Метод автоматизированного учета НСТ-теста // Клиническая лабораторная диагностика. – 1994. - № 4. – С.27-29.

4. Логинов А.Г. Состояние энергетического метаболизма лимфоцитов регионарного лимфатического узла при имплантации никелида титана // Бюлл. СО РАМН. – 2005. – №2 (116). – С.139-142.

5. Тш Н.У. Энциклопедия клинических лабораторных тестов.- М.: Лабинформ, 1997.- 942 с.

6. Chai F., Mathis N., Blanchemain N. [et al.] Osteoblast interaction with DLC-coated Si substrates // Acta Biomaterialia. – 2008. - №4.-P.1369-1381.

7. Gavrilo N.V., Mamaev A.S., S.A. Plotnikov S.A. [et al.] Comparison testing of diamond-like a-C:H coatings prepared in plasma cathode-based gas discharge and ta-C coatings deposited by vacuum arc // Surface and Coatings Technology. – 2010. - Vol.204, № 24. – P.4018-4024.

8. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // J.Immunol. Methods. – 1983. – Dec. – Vol.16, № 65(1-2). – P.55-63.

9. Ponsonnet L., Reybier K., Jaffrezic N. [et al.] Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behavior // Materials Science and Engineering. – 2003.- C 23. – P.551–560.

10. Zhao G., Raines A.L., Wieland M. [et al.] Requirement for both micron- and submicron scale structure for synergistic responses of osteoblasts to substrate surface energy and topography // Biomaterials. – 2007. - № 28. – P.2821-2829.

BIOCOMPATIBILITY OF TITANIUM SAMPLES WITH A DIAMOND-LIKE COATINGS (a-C: H) WITH A CULTURE OF PERIPHERAL HUMAN LEUKOCYTES

¹Makarova E.B., ²Rubshtein A.P., ¹Trifonova E.B.,
²Trahtenberg I.Sh., ¹Osipenko A.B., ²Plotnikov S.A.,
³Huzalgaleeva Yu.R., ¹Galkin P.B.

¹Ural V.V.Chaklin Research Institute for Traumatology and Orthopaedics.

¹Institute of Metal Physics (Ural Branch of RAS)
Ural Federal State University,³
Russia, Ekaterinburg

Aim: to examine the viability, functional and metabolic activity of leukocytes in human peripheral blood by culturing them on titanium samples of with carbon-nanocoating a-C:H₍₁₀₀₎ and a-C:H₍₃₀₀₎ obtained by decomposition of acetylene in nonself-sustained plasma discharge. The tested coatings influenced leukocytes reducing viability and their function, activity of energy metabolism markers. The covering influenced leukocytes reducing their viability and function, activity of energy metabolism markers.