

УДК 537.9.07:576.5:617.3:617-7

Влияние физических методов обработки поверхности титана на рост колоний клеток костной биологической ткани

Д. А. Димитрович, А. И. Бычков

Московский государственный медико-стоматологический университет, Москва, Россия

В. А. Иванов

ЗАО «Научно-технологический центр "ПЛАЗМАИОФАН"», Москва, Россия

Исследуется влияние различных методов физической обработки образцов из сплава титана ВТ-1-0, применяемого в медицинских целях, на рост биологических клеток костного мозга на их поверхности. Используются следующие методы обработки сплава: механический дробеструйный, ионно-плазменного травления и метод микроплазменных разрядов. Установлено, что все методы демонстрируют высокую скорость роста новых клеток и колоний клеток на их поверхности при одинаковых условиях среды выращивания. Полученные результаты могут быть использованы для усовершенствования технологии обработки медицинских сплавов и изделий из них для применения в хирургической медицине и ортопедической стоматологии.

PACS: 52.38.Ph; 87.85.jj; 87.18.Fx; 68.47.Pe

Введение

В течение второй половины XX века в мировой научной и практической медицине велся поиск биологически инертного материала для применения в протезировании костных тканей при хирургическом лечении травм и дефектов костей человека при ортопедическом лечении дефектов зубных рядов на хирургическом этапе имплантации [1—3]. В результате длительного научного поиска исследователи пришли к наиболее оптимальному металлическому сплаву на основе титана: титановый сплав ВТ-1-0, российский стандарт, аналог зарубежного стандарта "Grade-4".

Особенностью этого сплава для такого выбора является его свойство при контакте с воздушной средой покрываться тонкой (~10 нм) оксидной пленкой — рутилом (Ti_2O_4), который проявляет уникальную способность практически не вступать в химические реакции с биологическими средами [4—6]. В частности, это свойство биологической инертности оказалось очень важным для применения в стоматологии при изготовлении имплантов, используемых в качестве протезов корней зубов человека.

Кроме свойства биологической инертности важно, чтобы костная ткань эффективно фиксировала титановый имплант путем остеоинтеграции, т. е. формирования устойчивого биомеханического контакта между поверхностью титанового сплава и костной тканью. Качество такого контакта (прочность фиксации импланта костной тканью) зависит от свойств поверхности импланта. Для

модификации поверхности последнего в настоящее время применяются различные методы. Широко распространенным является метод дробеструйной обработки. Более дорогостоящими и, соответственно, менее распространенными являются метод нанесения гидроксипатитовых покрытий и метод модифицированного электретного покрытия. Все эти применяемые в производстве методы несущественно изменяют топологию поверхности импланта, в то время как микрорельеф его поверхности и площадь контакта с костной тканью определяют прочностные характеристики фиксации импланта в кости и срок службы протеза.

В настоящее время активно разрабатываются новые физические методы обработки поверхности: ионно-плазменный и микроплазменный. В частности, последние исследования в области использования более продвинутого микроплазменного метода обработки поверхности металлов и сплавов показали, что этот метод позволяет получать прочный микрорельеф с высотой выступов и горизонтальным масштабом рельефа от 1 до 10 мкм, соизмеримыми с характерными размерами клеток костной ткани. При этом эффективная площадь контакта модифицированной поверхности импланта и костной ткани может возрастать в несколько раз и таким образом существенно улучшать устойчивость импланта в костной ткани.

Цель данных исследований состояла в том, чтобы изучить влияние ионно-плазменного (ИП) и микроплазменного методов обработки поверхности титана на рост колоний клеток-предшественников костной ткани и оценить митотическую

активность клеток-предшественников костного мозга на поверхности образцов титана.

Условия экспериментов, диагностические методы и результаты исследований

Особое значение при конструировании дентальных имплантов придается их поверхности, которая во многом определяет не только прочностные свойства импланта, но и условия для адсорбции биологических молекул и адгезии клеток окружающих имплант тканей. Кроме того, форма и структура поверхности внутрикостной части импланта существенно влияют на способность к согласованному взаимодействию биомеханической системы: "ортопедическая конструкция—имплант—костная ткань". Поэтому основными задачами производства дентальных имплантатов являются:

увеличение индекса биофункциональности материала импланта;

создание микроструктуры поверхности импланта, адекватной типу окружающих биологических тканей;

создание макроконструкции импланта, имеющей достаточную площадь поверхности для адекватного биомеханического взаимодействия с костной тканью.

Методика нанесения дробеструйного покрытия на поверхность титановых образцов

Текстуру или определенную, имеющую регулярный рисунок, шероховатость на поверхности импланта можно создать с помощью так называемой рельефной формовки или методом наката. Микрорельеф поверхности импланта образуется за счет местных поверхностных деформаций материала. Получаемые таким образом незначительные углубления и выступы придают поверхности внутрикостной части импланта определенную регулярную шероховатость. Этот метод применяется довольно редко, так как импланты, как правило, имеют довольно сложную поверхность, и создание на их поверхности с помощью рельефной формовки равномерной и качественной текстуры весьма сложно и неэффективно.

Более распространенный способ создания шероховатости — это обработка поверхности внутрикостной части имплантата абразивными материалами под давлением, так называемая дробеструйная (пескоструйная) обработка. В качестве абразивного материала обычно используют порошки алюмо- или титан-оксидной керамики, подаваемой в поток воздуха, в котором происходит ускорение

частиц порошка. Управляемый ручным инструментом такой ускоренный поток микрочастиц бомбардирует поверхность образцов и создает на их поверхности микрорельеф с характерными размерами микровыступов — 2—5 мкм. Для создания микрорельефа при дробеструйной обработке образцов имплантов, как правило, применяется порошок с характерными размерами микрочастиц керамики — несколько десятков микрометров. В наших экспериментах для получения шероховатой поверхности на титановых образцах применяли второй способ механической обработки образцов — абразивную дробеструйную обработку с использованием керамического порошка с характерным размером частиц 75 мкм. Данная обработка была проведена на предприятии ЗАО "Конмет", которое специализируется на производстве медицинских устройств, инструментов и готовых имплантов.

Методика ионно-плазменного травления титановых образцов

Обработку поверхности титановых образцов с использованием метода ионно-плазменного (ИП) травления [7] выполняли в Санкт-Петербургском государственном электротехническом университете ЛЭТИ, в котором был разработан метод создания микрорельефа на поверхности титановых образцов, основанный на технологии ИП-травления [8]. Метод был реализован на установке УВНИПА 1-002, в которой реализуется пучково-плазменный разряд в аргоне. Из плазмы разряда ионы аргона с энергией до 1 кэВ бомбардируют под разными углами поверхность образца и производят травление его поверхности, тем самым формируя микрорельеф. Средняя величина тока ионного пучка составляет ~ 1 А, энергия ионов пучка — ~ 1 кэВ, рабочее давление в камере — $4,5 \cdot 10^{-2}$ Па, время экспозиции — 120 мин.

Методика нанесения покрытия на поверхность титановых дисков с помощью микроплазменных разрядов

В Институте общей физики им. А. М. Прохорова РАН впервые были проведены экспериментальные и теоретические исследования процессов возбуждения и движения микроплазменных разрядов (МПР) по поверхности металлов и сплавов, облучаемых внешним потоком плазмы в вакууме. Было установлено, что возбуждение и движение МПР происходит в результате возникновения на границе плазма—металл сильного локального электрического поля, возбуждаемого внешним потоком

плазмы [9, 10]. В экспериментах для возбуждения МПР использовался поток плазмы, создаваемый импульсным электроразрядным источником. Плотность водородно-углеродной плазмы в области взаимодействия с металлическим титановым образцом превышала 10^{12} см^{-3} , электронная температура составляла величину около 10 эВ, длительность импульса первичного плазменного потока была ~25 мкс. При воздействии такой импульсной плазмы на металлический образец возникала сильная локализация плазменной энергии на его поверхности. Это проявлялось в том, что однородный импульсный поток плазмы с характерным масштабом неоднородности порядка 10 см, взаимодействуя в вакууме с металлом, возбуждал на его поверхности локализованные МПР. При этом пространственный масштаб локализации находился в интервале значений 10—100 мкм (рис. 1).



Рис. 1. Фотография МПР (в центре), возбуждаемых на поверхности образца диаметром 12 мм из титанового сплава VT-1-0 потоком плазмы из инжектора диаметром 2 см (справа)

В местах локализации микроплазменных разрядов происходило быстрое плавление металла. Характерное время существования локализованных расплавленных областей на поверхности металла составляло величины от нескольких наносекунд до нескольких микросекунд в зависимости от параметров плазмы и внешних условий. После возбуждения первичных МПР последующие микроплазменные разряды, возбуждаемые на поверхности образцов, производили локальные плавления и хаотично двигались по поверхности со скоростью около 100 м/с в течение последующих 10—20 мс, тем самым производилось автосканирование поверхности плазмой микроплазменных разрядов. По окончании действия импульсного МПР или при его смещении по поверхности происходило быстрое остывание расплавленной области металла за счет высокой теплопроводности и отвода тепла вглубь металла. Этим самым реализовывался процесс высокоско-

ростного охлаждения расплавленной локальной области на поверхности металла со скоростью более 1 млн град/с. Эти процессы приводили к формированию прочного микрорельефа на поверхности металлического образца с характерным размером выступов и горизонтальным масштабом около 10 мкм (рис. 2). Характерное время обработки титанового образца площадью ~2 см² составляло 10 с.

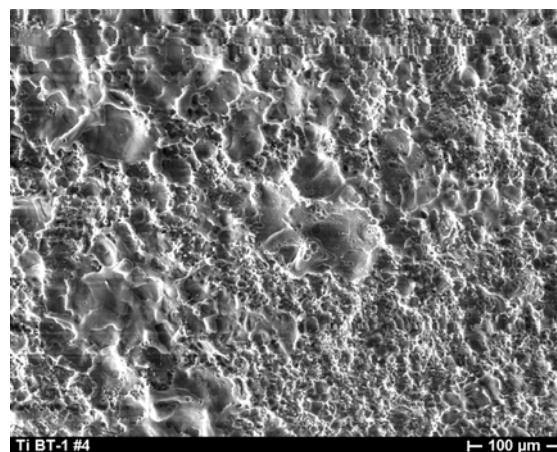


Рис. 2. Микрофотография микрорельефа, сформированного на поверхности образца из титанового сплава VT-1-0 с помощью МПР с размером по горизонтали 700 мкм

Выделение и размножение остеогенных стромальных клеток–предшественников костного мозга в монослойных культурах

Создаваемые с помощью ИП-травления и МПР новые виды микрорельефа на титановых образцах (имитаторах внутрикостной части импланта) требовали изучения степени колониеобразования и пролиферативной активности на этих поверхностях остеогенных клеток-предшественников. Изучение влияния создаваемого микрорельефа на остеогенные клетки-предшественники, участвующие в процессе остеоинтеграции (остеорепарации) в области установленных имплантов, было проведено на модели избирательного клонирования остеогенных стромальных клеток-предшественников в лаборатории стромальной регуляции иммунитета ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи РАМН [11]. В этой лаборатории была разработана экспериментальная модель биологической ткани путем выделения из кроветворных органов млекопитающих категории клеток, а именно, клеток-предшественников костной ткани [12, 13]. При эксплантации в пластиковые формы взвеси клеток костного мозга органов в монослойные культуры на 10-й день в них вырастают видимые невооруженным глазом дискретные колонии фибробластов. После обработки трипсином они легко снимаются с пластика и поддаются многократному пассированию, образуя диплоидные штаммы стромальных клеток-предшественников.

Реакцию остеогенных клеток-предшественников на сформированный микрорельеф на поверхности металлического сплава титана ВТ-1-0 изучали как на первичных культурах, определяя эффективность колониеобразования (т. е. отношение числа вырастающих колоний к стандартному числу эксплантированных клеток), так и на диплоидных штаммах этих клеток, исследуя влияние созданного микрорельефа на поверхности сплава на пролиферативную активность остеогенных клеток-предшественников в культурах [14].

Эксперименты проведены на 30 крысах-самцах "Wistar" массой 80—100 г, полученных из питомника экспериментальных животных РАМН "Крюково". Крыс усыпляли эфиром. С соблюдением правил асептики через разрез на задней части бедра выделяли бедренные и большеберцовые кости. Эпифизы костей обрезали и шприцом выдували костный мозг во флакон с питательной средой. Фрагменты костного мозга пропускали через шприц с последовательно уменьшающимся диаметром игл при минимальном давлении в нем до получения гомогенной взвеси клеток. Взвесь дважды отмывали центрифугированием при 4 °С (400 g), осадок ресуспендировали в свежей питательной среде, фильтровали через четырехслойный капроновый фильтр и подсчитывали число клеток в камере Горяева. Жизнеспособность клеток в суспензиях определяли по окраске 0,1%-ным раствором трипанового синего. Каплю красителя добавляли к капле суспензии, тщательно перемешивали, заполняли камеру Горяева, и через 1—2 мин проводили подсчет живых и мертвых клеток. Для определения эффективности колониеобразования стромальных клеток-предшественников одинаковое количество костно-мозговых клеток исследуемой суспензии помещали в культуральные 6-луночные планшеты с площадью 9,6 см² каждый, с 4 мл питательной среды. Плотность эксплантации составляла 3,6·10⁴ клеток/см², т. е. в каждую лунку засеивали по 3,5·10⁵ клеток костного мозга крыс. Для получения штаммов стромальных клеток-предшественников 3·10⁶ клеток костного мозга эксплантировали во флаконы площадью дна 75 см². На 10-й день культивирования, когда колонии стромальных фибробластов были полностью сформированы, проводили 1-й пассаж (выделение из культуры клеток костного мозга линии остеогенных клеток-предшественников). Культивирование клеток производили в питательной среде в атмосфере углекислого газа в инкубаторе при температуре 37 °С.

Пассирование клеток проводили следующим образом. Первичные культуры, выращенные во флаконах, дважды отмывали от сыворотки физиологическим раствором. Затем в планшеты добав-

ляли 2—3 мл 0,25%-ного раствора трипсина, которым обрабатывали культуры в течение 3—5 мин, затем флаконы переворачивали и в таком виде помещали в термостат при температуре 37 °С. Через 15—20 мин трипсин сливали, в культуральные флаконы добавляли свежую питательную среду и несколько раз встряхивали их. Неоткрепившиеся клетки снимали пипетированием. Подсчет числа снятых клеток проводили в камере Горяева. Необходимое число клеток переносили во флаконы с большей площадью дна. Повторные пассажи проводили по этой же методике по достижении полного монослоя клеток в культурах. Питательная среда в пассируемых культурах состояла из 30 % кондиционированной среды из-под культур и 70 % свежей полной питательной среды.

Для изучения действия модифицированной поверхности на пролиферативную активность штаммов остеогенных клеток-предшественников в 6-луночные планшеты помещали титановые диски, с разной поверхностной обработкой, и засеивали одинаковое число пассированных клеток. Культивирование проводили в течение 5—7 дней до формирования плотного монослоя клеток. По описанной выше методике клетки снимали с пластика и проводили подсчет в камере Горяева. Фиксацию, окраску и подсчет колоний проводили следующим образом. Перед фиксацией культуральную среду из планшетов сливали, планшеты несколько раз промывали физиологическим раствором и на 30 мин заливали 80%-ным этанолом. Фиксированные культуры окрашивали по методу Гимза. Число выросших колоний подсчитывали под бинокулярной лупой, учитывая при этом все колонии, состоящие из 50 и более остеогенных фибробластов.

Влияние титановых дисков с различной обработкой поверхности на стромальные клетки-предшественники костного мозга в культуре тканей *in vitro*

Влияние модифицированной поверхности образцов титана на остеогенные клетки, участвующие в процессе остеоинтеграции, проходящие в костной ткани при имплантации, изучали на модели избирательного клонирования остеогенных стромальных клеток-предшественников в первичных монослойных культурах костного мозга и штаммах остеогенных стромальных клеток.

Для сравнения обработки поверхности был выбран титан марки ВТ-1-0. Образцы представляли собой титановые диски Ø 12,0 мм, толщиной 2 мм, в центре которых имелось технологическое отверстие Ø 2,5 мм. Первую группу дисков обрабатывали дробеструйным способом, вторую группу —

ионно-плазменным, а третью — с помощью МПР. После необходимой подготовки все диски были подвергнуты стерилизации.

В 6-луночные планшеты помещали титановые диски, обработанные различными способами. В каждую лунку с 4 мл полной культуральной среды засеивали $3 \cdot 10^5$ костно-мозговых клеток. По числу выросших колоний при равном числе клеток, эксплантированных в лунку, определяли влияние помещенных в культуру дисков на эффективность колониеобразования. Влияние титановых дисков с разной поверхностной обработкой на пролиферативную активность остеогенных клеток-предшественников изучали, засеивая лунки с помещенными в них дисками, одинаковым числом остеогенных стромальных клеток-предшественников после проведения, соответственно, II и III пассажей. В каждую лунку с 4 мл культуральной среды засеивали по $3 \cdot 10^4$ клеток. На четвертый день культивирования, когда в лунках формировался плотный монослой клеток, культивирование прекращали. Культуры промывали, и после обработки 0,25%-ным раствором трипсина снимали с пластика. В камере Горяева подсчитывали общее число клеток, выращенных в каждой лунке. В каждой серии опытов на каждый вид испытуемых дисков засеивали по три 6-луночных планшета.

I — группа планшетов с дробеструйно-обработанными титановыми дисками.

II — группа планшетов с титановыми дисками, обработанными ИП-способом.

III — группа планшетов с титановыми дисками, обработанными с помощью МПР.

IV — контрольная группа без титановых дисков, которую составляли планшеты с тем же числом эксплантированных клеток.

Полученный цифровой материал обрабатывали методом вариационной статистики с вычислением средних арифметических величин (M), среднеквадратичного отклонения σ и среднеквадратичной (стандартной) ошибки m [5]. Критерий достоверности оценивали по таблице Стьюдента, при этом статистически достоверными считали величины, соответствующие значениям $p < 0,05$, $p < 0,01$, а значимыми — вероятности, большие 95 и 99 %.

Проведение сканирующей электронной микроскопии образцов титана

Проведение сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) позволило определить рельеф поверхности и исследовать культуры тканей остеогенных стромальных клеток-предшественников, образовавших прочные связи с поверхностью титановых образцов. Данное исследование проводи-

ли в лаборатории электронной микроскопии МГУ им. М. В. Ломоносова. Для определения степени и площади адгезии культуры тканей остеогенных стромальных клеток-предшественников костного мозга на поверхности исследуемых титановых образцов с различной поверхностной обработкой было проведено электронное сканирование исследуемых поверхностей. Электронная микроскопия позволила изучить форму, определить их число и оценить степень прикрепления клеток к поверхности обработанных титановых дисков.

При использовании традиционных сканирующих электронных микроскопов влажный биологический объект должен быть фиксирован, обезвожен и высушен с помощью методов, щадящих его поверхность, так как он подвергается воздействию глубокого вакуума (10^{-5} мм рт. ст.) и интенсивной бомбардировке ускоренными электронами с энергией 15 кэВ.

Подготовку материалов к электронному сканирующему микрокопированию проводили следующим образом. Культуру выращенной биологической ткани на титановых дисках перед фиксацией трижды отмывали раствором Хэнкса при температуре 37 °С. После этого готовили специальный раствор (1,6 мл 25%-ного глютаральдегида, 15 мл какодилата Na (0,2 моль), 3,4 мл H₂O), в котором не менее 1 ч находились титановые диски в условиях термостата при температуре 37 °С. Далее осуществлялась поэтапная процедура обезвоживания их чистым ацетоном с увеличивающейся концентрацией. Подготовленные препараты подвергали изучению в сканирующем электронном микроскопе в течение 1 ч.

В эксперименте на культуре ткани стромальных клеток-предшественников костного мозга удалось проследить влияние новых видов поверхностной обработки (ИП-травлением и обработка с помощью МПР) на остеогенные стромальные клетки-предшественники по сравнению с традиционной дробеструйной обработкой.

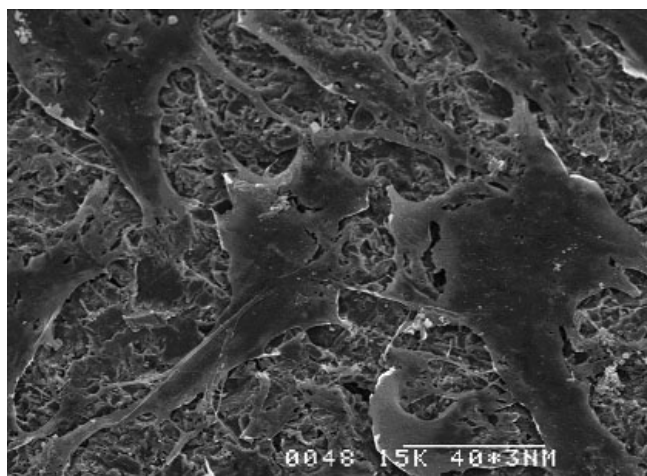
При исследовании объектов в СЭМ в качестве регистрируемого вторичного излучения выбирали вторичные электроны, которые легко фокусируются и могут покинуть изучаемый объект только из тонкого (~10 нм) поверхностного слоя вблизи места бомбардировки, что и обеспечивает высокую разрешающую способность СЭМ. Предельное разрешение в СЭМ обычно достигает порядка 10 нм при использовании вольфрамового термокатода (что соответствует увеличению в $5 \cdot 10^4$ раз) и порядка 5 нм — термокатода со специальными электронными пушками повышенной яркости. В большинстве случаев для изучения морфологии биологических объектов достаточно увеличений в $(0,5—2) \cdot 10^4$ раз.

На рис. 3 приведена фотографии титанового образца (поверхность которого обработана микроплазменными разрядами) перед процедурой выращивания культуры клеток-предшественников костного мозга.

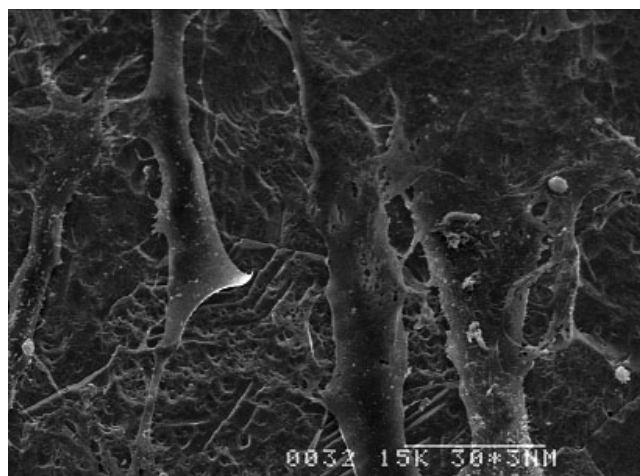


Рис. 3. Фотография образца из титанового сплава ВТ-1-0 (с увеличением 7) после формирования микро рельефа с помощью МПР

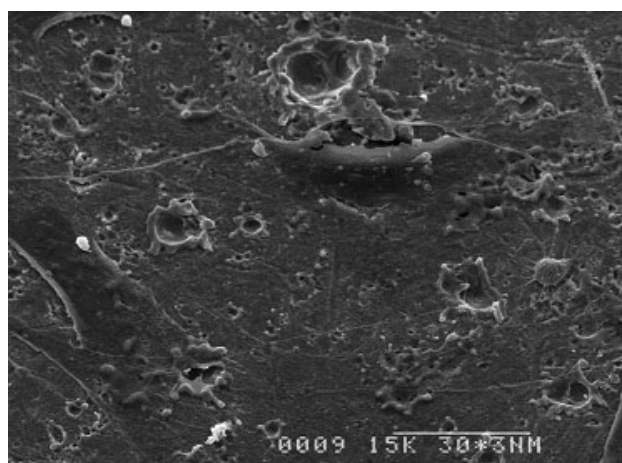
На рис. 4, *а—в* представлены микрофотографии поверхности образцов титанового сплава ВТ-1-0, обработанного методами дробеструйным, ИП-травлением и МПР, соответственно, после процедуры выращивания остеогенных стромальных клеток-предшественников костного мозга на их поверхности.



а



б



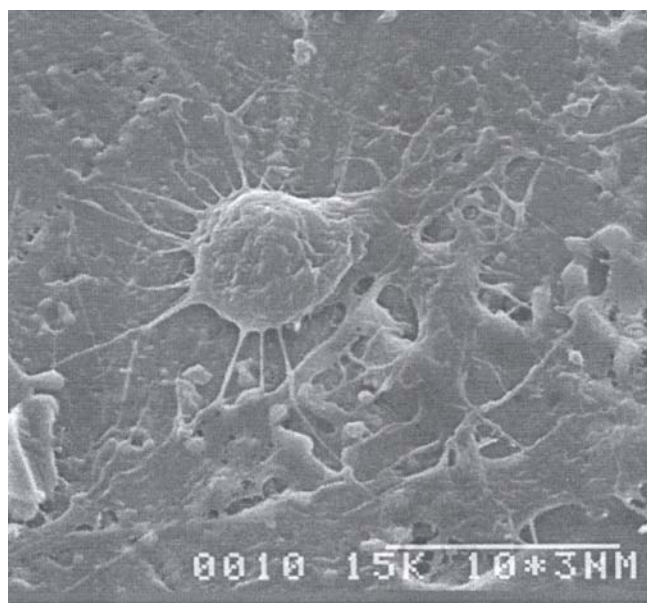
в

Рис. 4. Микрофотографии поверхности образца титанового сплава ВТ-1-0, обработанного:

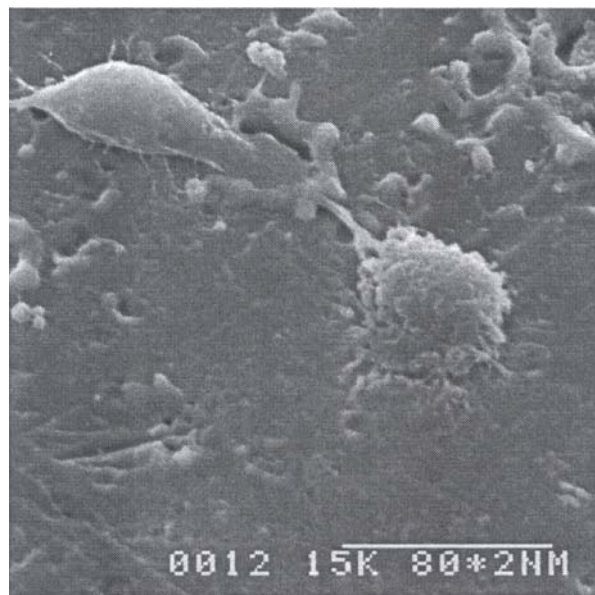
а — дробеструйным методом, с выращенными отростками остеогенных стромальных клеток-предшественников костного мозга (горизонтальная белая черта внизу справа соответствует размеру 120 нм); *б* — ИП-травлением, с выращенными отростками остеогенных стромальных клеток-предшественников костного мозга (горизонтальная белая черта внизу справа соответствует размеру 90 нм); *в* — МПР с выращенными отростками остеогенных стромальных клеток-предшественников костного мозга (горизонтальная белая черта внизу справа соответствует размеру 90 нм)

На фотографиях видно, что на всех обработанных различными методами образцах возникают отростки клеток, фиксирующихся на выступах поверхности и обходящих углубления поверхности.

Важно отметить, что существует режим обработки (микроплазменный), при котором на поверхности образцов из сплава ВТ-1-0 на "определенном" этапе возникают устойчивые условия адгезии не только отростков клеток, но и жизнеспособных живых клеток остеогенных клеток-предшественников (рис. 5, а, б).



а



б

Рис. 5. Микрофотография поверхности образца титанового сплава ВТ-1-0, обработанного методом микроплазменных разрядов:

а — с выращенной живой клеткой костного мозга на его поверхности (горизонтальная белая черта внизу справа соответствует размеру 30 нм); б — с выращенными двумя живыми клетками костного мозга, соединенными отростком цитоплазматической мембраны (горизонтальная белая черта внизу справа соответствует размеру 160 нм)

В табл. 1 представлены статистические данные роста колоний клеток красного костного мозга, а в табл. 2 — статистические данные роста остеогенных клеток на поверхности образцов титанового сплава, обработанных различными методами.

Таблица 1

Но- мер опыта	Число лунок, засеянных $3,5 \cdot 10^5$ клеток красного костного мозга	Среднее число выросших колоний в лунках			Контрольная группа из трех лунок без дисков
		Метод обработки титановых дисков			
		дробеструйный	ИП-травления	микроплазменный	
1	4	19	20	17	21
	4	22	21	18	16
	4	20	22	18	21
2	4	20	19	18	18
	4	19	21	19	16
	4	21	21	17	19
3	4	18	21	18	20
	4	21	22	20	17
	4	22	23	17	21
Σ		$\Sigma_1 = 182$	$\Sigma_2 = 190$	$\Sigma_3 = 162$	$\Sigma_4 = 169$
$M \pm m$		$20,22 \pm 0,50$	$21,11 \pm 0,36$	$18,0 \pm 0,29$	$18,77 \pm 0,79$

Таблица 2

Но- мер опыта	Число лунок, засеянных $3,5 \cdot 10^5$ остеогенных клеток	Среднее число выросших клеток ($\cdot 10^5$) в лунках			Контрольная группа из трех лунок без дисков
		Метод обработки титановых дисков			
		дробеструйный	ИП-травления	микроплазменный	
1	4	1,92	2,11	1,37	1,23
	4	1,81	1,98	1,27	1,34
	4	1,89	2,04	1,48	1,27

Окончание табл. 2

Но- мер опыта	Число лунок, засеянных $3,5 \cdot 10^5$ остеогенных клеток	Среднее число выросших клеток ($\cdot 10^5$) в лунках			
		Метод обработки титановых дисков			Контрольная группа из трех лунок без дисков
		дробеструйный	ИП-травления	микроплазменный	
2	4	1,80	2,12	2,12	1,51
	4	2,10	1,96	2,61	1,74
	4	1,93	2,03	2,73	1,65
3	4	1,74	1,88	1,18	1,15
	4	1,87	1,96	1,39	1,19
	4	1,91	2,08	1,23	1,22
$\Sigma(\cdot 10^5)$		$\Sigma_1 = 16,97$	$\Sigma_2 = 18,16$	$\Sigma_3 = 15,38$	$\Sigma_4 = 12,30$
$M \pm m$		$1,88 \pm 0,03$	$2,01 \pm 0,02$	$1,7 \pm 0,22$	$1,36 \pm 0,07$

Пр и м е ч а н и е. M — среднеарифметическое количество колоний, m — среднеквадратичная ошибка, Σ — суммарное количество колоний клеток во всех опытах.

Из данных табл. 1 и 2 видно, что в лунках в присутствии обработанных различными методами 27 титановых образцов культуры живых клеток костного мозга развиваются также хорошо, как и в отсутствие металлических образцов. Это указывает на то, что все примененные виды обработок титана не приводят к подавлению митотической активности клеток, т. е. они развиваются на поверхности металлических сплавов титана без признаков токсической супрессии. Все виды обработки поверхности металлических сплавов титана в пределах статистического разброса дают приблизительно одинаковую скорость роста новых клеток и колоний клеток на их поверхности при одинаковых условиях среды выращивания.

Заключение

Экспериментально установлено, что на обработанных дробеструйным, ионно-плазменным, микроплазменным методами образцах титанового сплава возникают отростки клеток, фиксирующиеся на выступах поверхности и обходящие углубления поверхности.

Показано, что существует режим микроплазменной обработки, при котором на поверхности образцов из сплава ВТ-1-0 возникают устойчивые условия адгезии жизнеспособных живых остеогенных клеток-предшественников.

Установлено, что вблизи и на поверхности обработанных различными методами 27 образцов титанового сплава культуры клеток костного мозга развиваются так же хорошо, как и в отсутствие металлических образцов. Это указывает на то, что различные методы обработки титанового сплава не приводят к подавлению митотической активности клеток, т. е. клетки развиваются на поверхности металлического сплава титана без признаков токсической супрессии.

Обнаружено, что клетки, помещенные на поверхность образцов сплава титана ВТ-1-0, обрабо-

танных рассмотренными методами, демонстрируют высокую скорость роста новых клеток и их колоний на поверхности и вблизи титановых образцов при одинаковых условиях среды выращивания.

- Метод традиционной дробеструйной обработки является хорошо отработанным и относительно недорогим, так как существует несколько видов стандартного и доступного для покупки оборудования, не требует высокой квалификации персонала, однако он основан на применении ручного труда без технического контроля качества обработки.

- Метод ионно-плазменного травления существенно превышает по стоимости два других метода и требует длительной многочасовой обработки образцов, поэтому для последующего практического его применения необходима существенная физико-техническая доработка в целях снижения энергетических и временных затрат и уменьшения стоимости оборудования.

- Метод микроплазменной обработки допускает разработку универсального технологического оборудования для обработки различных медицинских изделий. Его энергетические и стоимостные технологические затраты низкие (менее 0,01 кВт·ч сетевой электроэнергии на 1 см^2 при характерном времени обработки около 10 с) [15—18]. При массовом производстве такое оборудование может по стоимости сравниться со стоимостью оборудования для дробеструйной обработки или даже стоять ниже. Данный метод предполагает также полное компьютерное управление качеством обработки поверхности и тонкую настройку режимов обработки для изделий из различных сплавов. Кроме того, он оказался единственным, в результате применения которого на поверхности титанового сплава наблюдался рост не только отростков, но и живых клеток костного мозга.

Полученные результаты могут быть использованы при усовершенствовании технологии и разработке нового оборудования, предназначенного для обработки медицинских сплавов и изделий из

них для интеграции в костную ткань при ортопедическом лечении дефектов зубных рядов на хирургическом этапе имплантации.

Авторы благодарят М. Е. Кобыжееву за предоставление фотографий образца из титана и полезные обсуждения.

Работа выполнена в рамках программы Российского фонда фундаментальных исследований (проект РФФИ № 09-08-00753-а), а также в рамках программы Президента России "Государственная поддержка ведущих научных школ" (проект № 452.2008.2).

Л и т е р а т у р а

1. Сидельников А. И. Преимущества титана "Grade-4" перед другими материалами для изготовления дентальных имплантатов // Пробл. стоматологии и нейростоматологии. 1999. № 2. С. 47—49.
2. Робустова Т. Г. Имплантация зубов. — М.: Медицина, 2003. — 560 с.
3. Параскевич В. Л. Дентальная имплантология: Основы теории и практики. — Мн.: ООО "Юнипресс", 2002. — 368 с.
4. Кулаков А. А. Хирургические методы дентальной имплантации. — М., 2006. — 246 с.
5. Кулаков А. А., Лосев Ф. Ф., Гветадзе Р. Ш. Зубная имплантация: основные принципы, современные достижения. — М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2006. — 152 с.
6. Иванов С. Ю., Бизяев А. Ф., Ломакин М. В. и др. Стоматологическая имплантология: Учеб. пособие. — М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2000. — 96 с.
7. http://www.oxfordplasma.de/techno_r/tie.htm
8. Быстров Ю. А., Мироненко И. Г. Электронные цепи и устройства: Учеб. пособие. — М.: Высш. шк., 1989. — 286 с.
9. Иванов В. А., Кобыжеев М. Е., Сахаров А. С. Возбуждение микроплазменных разрядов на металлах с диэлектрической пленкой // Прикладная физика, 2006. № 6. С. 114—121.
10. Иванов В. А., Сахаров А. С., Кобыжеев М. Е. Иницирование микроплазменных разрядов на краю диэлектрической пленки, нанесенной на поверхность металла // Физика плазмы. 2008. Т. 34. № 2. С. 171—184.
11. Осепян И. А., Чайлахян Р. К., Гарибян Э. С., Айвазян В. П. Аутоаутоиммунная костно-мозговых фибробластов в травматологии и ортопедии // Вестник хирургии. 1988. № 5. С. 56, 57.
12. Фриденштейн А. Я., Куралесова А. И. Остеогенные клетки-предшественники костного мозга радиохимер. Анализ методом гетеротропной трансмиссии // Онтогенез. — М., 1971. Т. 2. № 5. С. 455—465.
13. Фриденштейн А. Я., Лалыкина К. С. Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники // Медицина. — М., 1973. — 223 с.
14. Воложин Г. А. Оценка биосовместимости остеопластических материалов с использованием длительных культур костного мозга // Рос. стоматологич. журн. 2005. № 3. С. 17—19.
15. Иванов В. А., Кобыжеев М. Е., Спиринов А. М. Формирование микрорельефа на поверхности Ni—Cr-сплава в микроплазменных разрядах: Тез. докл. XXX Звенигород. конф. по физике плазмы и УТС. — М., 2003. С. 204.
16. Иванов В. А., Кобыжеев М. Е., Спиринов А. М. Формирование микрорельефа на поверхности Co—Cr-сплава при воздействии микроплазменных разрядов: Там же. — М., 2004. С. 230.
17. Иванов В. А., Кобыжеев М. Е., Спиринов А. М. и др. Формирование прочного микрорельефа на поверхности Ni—Cr-сплава при воздействии с микроплазменными разрядами // Прикладная физика. 2006. № 6. С. 97—107.
18. Иванов В. А., Кобыжеев М. Е., Спиринов А. М. и др. Формирование прочного микрорельефа на поверхности Co—Cr-сплава при взаимодействии с микроплазменными разрядами // Там же. 2007. № 6. С. 60—70.

Статья поступила в редакцию 11 декабря 2008 г.

Influence of physical methods of processing of a surface of the titan on growth of colonies of cells of a bone biological tissue

D. A. Dimitrovich, A. I. Bychkov

Moscow State Medical and Stomatological University, Moscow, Russia

V. A. Ivanov

PLASMAIOFAN Co. Ltd. Science & Technology Center, Moscow, Russia

Influence of various methods of physical processing of samples from an alloy of titan BT-1-0 applied in the medical purposes, on growth of biological cells of a bone biological tissue on their surface is investigated. Following methods of processing of an alloy are used: mechanical method, a method of ionic-plasma etching and a method of microplasma discharges. It is established, that all the methods of processing of a surface of samples of the titan alloy applied in work show high growth rate of new biological cells and colonies of cells on their surface under identical conditions of the environment of cultivation. The received results can be used for improvement of technology of processing of medical alloys and products from them for use in surgical medicine and orthopedic stomatology.