



УДК 621.793.00; 576.08

ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ЗАГОТОВОК ДЛЯ ИМПЛАНТАТОВ ИЗ НИКЕЛИДА ТИТАНА В ОПЫТАХ *IN VITRO*

С.В. Надеждин
М.Г. Ковалева
А.Я. Колпаков
А.И. Поплавский
М.И. Москаленко
И.О. Яржомбек

Белгородский
государственный
университет

Россия, 308015, г. Белгород,
ул. Победы, 85

E-mail: Kovaleva@bsu.edu.ru

Представлены результаты исследований токсичности в опытах *in vitro* заготовок для имплантатов, выполненных из никелида титана с различными вариантами модифицирования поверхности: бомбардировкой ионами титана, наноразмерным алмазоподобным углеродным покрытием, наноразмерным алмазоподобным углеродным покрытием, легированным азотом. Нанесение углеродного покрытия проводили импульсным вакуумно-дуговым методом. Для оценки токсичности заготовок, выполненных из никелида титана, применяли флуоресцентный метод с оценкой жизнеспособности клеток. Регистрацию флуоресценции флуорохромов и последующий анализ результатов проводили на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Nikon DIGITAL ECLIPSE C1 plus. Показано, что наличие тонких безникелевых барьерных слоев, сформированных на поверхности никелида титана с использованием ионно-плазменных технологий, приводит к повышению его коррозионной стойкости и затрудняет выход ионов никеля в биологическую среду. Установлено, что заготовки из никелида титана, модифицированные наноразмерным алмазоподобным углеродным покрытием, легированным азотом, являются биорезистентными и не оказывают цитотоксического эффекта на жизнеспособность белых клеток крови.

Ключевые слова: имплантат, биосовместимость, биорезистентность, никелид титана, лейкоциты, жизнеспособность клеток, модифицирование поверхности, наноразмерные алмазоподобные углеродные покрытия.

В настоящее время в травматологии и ортопедии накоплен большой опыт по применению имплантатов изготовленных из металлов и сплавов для устранения различных дефектов костной ткани. Одним из перспективных материалов для изготовления имплантатов является никелид титана, который обладает высокими функциональными и биомеханическими свойствами. Однако наличие в сплаве никеля, сдерживает широкое использование сплавов на основе никелида титана для изготовления имплантатов, из-за его токсического воздействия на организм [1, 2, 3]. Одним из способов улучшения физико-химических свойств металлического имплантата из никелида титана является нанесение на его поверхность многофункционального покрытия [4]. Среди методов обработки поверхности наиболее эффективным является нанесение алмазоподобного углеродного покрытия [5], что позволяет решить как проблему выхода токсичных ионов металлов в биологическую среду, так и проблему повышения коррозионной стойкости и износостойкости [6] металла. Металлические имплантаты с алмазоподобным покрытием демонстрируют высокую биосовместимость. Они в отличие от других покрытий не вызывают коагуляцию крови, служат эффективным барьером, предотвращающим диффузию ионов металлов, и могут эффективно использоваться для покрытий имплантатов, контактирующих с костными и мягкими тканями организма [5, 7, 8].

Целью данной работы явилась оценка токсичности заготовок для имплантатов в опытах *in vitro*, выполненных из никелида титана с модифицированной ионно-плазменными технологиями поверхностью.

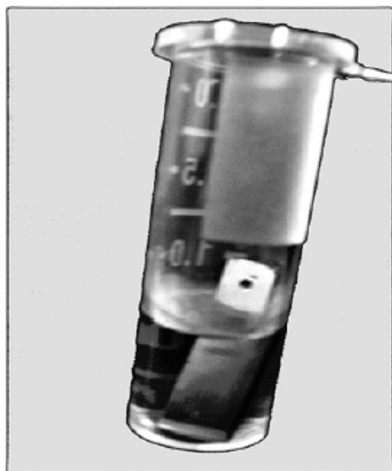
Материалы и методика эксперимента

В работе были использованы заготовки для имплантатов в виде пластин размером $20 \times 4 \times 1$ мм, выполненных из никелида титана: исходного – $TiNi$ (1 группа), мо-



дифицированного титаном – $TiNi-Ti$ (2 группа), наноразмерным алмазоподобным углеродным покрытием – $TiNi-DLC$ (3 группа), наноразмерным алмазоподобным углеродным покрытием легированным азотом – $TiNi-DLC-N$ (4 группа). Образцы первой группы изготавливали электроэрозионной резкой с помощью проволочно-вырезного станка AQ300L, все грани механически шлифовали до зеркального блеска с помощью комплекса оборудования для подготовки образцов Struers. Заготовки второй группы помещали в камеру установки УВНИПА-1-001 на устройство для вращения. В камере создавали вакуум не выше $1 \cdot 10^{-3}$ Па. Образцы подвергали бомбардировке ионами титана, извлекаемыми из плазмы, генерируемой вакуумно-дуговым источником с магнитной системой очистки плазмы от макрочастиц и капель. Для очистки поверхности и внедрения ионов титана к образцу в течение 300 с прикладывали отрицательный ускоряющий потенциал 1000 В, плотность ионного тока составила 5.0 mA/cm^2 . Далее для нанесения слоя титана к образцу в течение 180 с прикладывали отрицательный ускоряющий потенциал 500 В. Для образцов третьей группы формирование покрытий производили по способу, описанному в работе [9], который позволяет снизить величину возникающих внутренних напряжений сжатия. Вначале обработка образцов происходила по схеме, представленной для второй группы. Плотность ионного тока составляла $5.0-7.0 \text{ mA/cm}^2$. Нанесение наноразмерного алмазоподобного углеродного покрытия проводили с использованием импульсного источника углеродной плазмы, подробно описанного в работе [10]. В качестве материала катода использовали особо чистый графит марки МПГ-6. Вакуумную камеру откачивали до давления не выше $2 \cdot 10^{-3}$ Па. Толщина наноразмерного алмазоподобного углеродного покрытия составила 180 нм. Микротвердость системы «подложка-покрытие» $\sim 4 \text{ ГПа}$. Структура полученного покрытия углерода представляет собой мелкодисперсную (аморфную) основу различного фазового состава с включением кристаллов всевозможных модификаций углерода. В четвертой группе заготовки обрабатывали согласно схеме подготовки образцов для третьей группы. Наноразмерные алмазоподобные углеродные покрытия, легированные азотом, были получены путем напуска в камеру азота до давления 0.1 Па . Производительность процесса осаждения наноразмерного алмазоподобного углеродного покрытия, легированного азотом ($C:N$) составила 0.06 нм/импульс соответственно. Частота следования импульсов – 2.5 Гц . Температура подложки при этом не превышала 100°C . Толщина наноразмерного алмазоподобного углеродного покрытия легированного азотом – составила 180 нм. Микротвердость системы «подложка-покрытие» $\sim 4 \text{ ГПа}$. Структура полученного покрытия углерода представляет собой неупорядоченную (аморфную) основу различного фазового состава.

Оценку токсичности образцов проводили согласно методическим рекомендациям [11] в нашей модификации на 30 беспородных белых мышах массой 20-25 грамм, которые случайным образом были поделены на 4 группы по 6 особей в каждой.



Кровь для исследований брали путем декапитации после дачи легкого эфирного наркоза. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (10 ед./мл). Лейкоциты из периферической крови получали общепринятым способом. Суспензию лейкоцитов делили на две части (пробы) и вносили в пробирки для микропроб содержащей среду RPMI, одну пробу использовали в качестве контроля, другая являлась опытной. Суспензии белых клеток опытной и контрольной проб для всех групп инкубировали в термостате при $+37^\circ\text{C}$ в течение 30 мин (рис. 1).

Рис. 1. Пластика заготовки для имплантатов, выполненная из чистого никелида титана в пробирке, содержащей суспензию лейкоцитов в среде RPMI



Для оценки токсичности серии заготовок из никелида титана применяли флуоресцентный метод для оценки жизнеспособности клеток двойным окрашиванием - этидиум бромидом (Helicon) и ацетооксиметиловым эфиром кальцеина (Fluka) [12]. Стоковые растворы красителей готовили согласно инструкции производителя. Из стоковых растворов получали рабочий раствор: 4 μM этидиум бромид и 2 μM ацетооксиметилового эфира кальцеина растворяли в 1.5 мл раствора Дульбекко. К 100 мкл суспензии клеток контрольной и опытной групп находящихся в среде RPMI добавляли 10 мкл двухкомпонентного флуоресцентного раствора красителей и инкубировали при +37°C в течение 30 мин. После истечения времени инкубации 100 мкл клеточной суспензии наносили на покровные стекла и дважды отмывали от красителя и компонентов среды. Сканирование образцов и последующий анализ проводили на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Nikon DIGITAL ECLIPSE C1 plus с использованием лазера 488 нм. Оценку жизнеспособности клеток проводили в среде программы «EZ-C1» (версия 3.8). По результатам флуоресцентной/конфокальной лазерной сканирующей микроскопии определяли жизнеспособность клеток. На каждые 100 клеток подсчитывали количество живых (зеленая флуоресценция в цитоплазме) и мертвых клеток (красная флуоресценция в ядре). Жизнеспособность клеток (%) рассчитывали согласно методике, приведенной в работе А.И. Маслова с соавт. [13]:

$$R = \frac{N_n}{N_n + N_d} * 100\% \quad (1)$$

где R – жизнеспособность клеток, %; N_n – количество живых клеток; N_d – количество мертвых клеток.

Результаты и их обсуждение

В ходе эксперимента по оценки токсичности заготовок, выполненных из никелида титана с различными вариантами модифицирования поверхности, было установлено, что количество живых и мертвых лейкоцитов в опытных пробах достоверно отличается от контрольных проб в первой, третьей (при $p < 0.01$) и второй группах (при $p < 0.05$). Так количество живых клеток в первой группе было меньше на 22%, во второй группе на 9%, в третьей группе на 5% и в четвертой группе на 3% по сравнению с контрольными пробами для этих групп (см. табл.).

Таблица

Количество живых и мертвых белых клеток в крови в опытных и контрольных пробах

Проба	Состояние клеток	Группа			
		1 TiNi	2 TiNi-Ti	3 TiNi-DLC	4 TiNi-DLC-N
Контроль	живые клетки, шт.	78.00±2.89	77.83±2.48	82.33±2.73	81.00±3.35
	мертвые клетки, шт.	22.00±1.41	22.17±2.48	17.67±2.73	19.00±3.35
Опыт	живые клетки, шт.	63.50±2.74*	71.33±3.50*	78.17±3.43**	78.67±2.16
	мертвые клетки, шт.	36.50±2.74	28.67±3.50	21.83±3.43	21.33±2.07

Примечание: достоверность различий по сравнению с контролем по критерию Стьюдента * $p < 0.01$; ** $p < 0.05$.

Наибольшее снижение жизнеспособности лейкоцитов по сравнению с контрольными пробами было выявлено в первой группе на 14.5% (пластинка из чистого никелида титана) и во второй группе (поверхность заготовки из никелида титана модифицированная титаном) на 6.5%.

При инкубации белых клеток с заготовками из никелида титана третьей (поверхность заготовки покрыта наноразмерным алмазоподобным углеродным покрытием) и четвертой (поверхность заготовки покрыта наноразмерным алмазоподобным углеродным покрытием легированным азотом) групп снижение жизнеспособности клеток по сравнению с контрольными пробами было не значительное и составило 4.16% и 2.33% соответственно.



В результате исследований установлено, что наиболее токсичными образцами являются заготовки из никелида титана первой группы (исходный, без модифицирования поверхности), это связано с токсическим воздействием ионов никеля вышедших в среду RPMI, в которой инкубировались белые клетки. Менее выраженный токсический эффект установлен во второй и третьей группах, в четвертой группе, где поверхность заготовки из никелида титана была модифицирована наноразмерным алмазоподобным углеродным покрытием легированным азотом отсутствуют достоверные различия по количеству живых и мертвых клеток по сравнению с контрольными пробами.

Заключение

Наличие тонких безникелевых барьерных слоев, сформированных на поверхности никелида титана с использованием ионно-плазменных технологий, приводит к повышению его коррозионной стойкости и биорезистентных свойств заготовок для имплантатов, изготовленных из никелида титана. Установлено, что заготовки из никелида титана, модифицированные наноразмерным алмазоподобным углеродным покрытием, легированным азотом являются биорезистентными и не оказывают цитотоксического эффекта на жизнеспособность белых клеток крови.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования научным оборудованием БелГУ «Диагностика структуры и свойств наноматериалов» в рамках госконтракта ФЦП №П748 «Разработка технологии получения комбинированного наноструктурного биопокртия на модифицированной поверхности никелида титана».

Список литературы

1. Shtansky D.V., Levashov E.A., Glushankova N.A., D'yakonova N.B., Kulinich S.A., Petrzhhik M.L., Kiryukhantsev-Korneev F.V., Rossi F. Structure and properties of CaO- and ZrO₂-doped TiC_xN_y coatings for biomedical applications // Surface and Coatings technology. – 2004. – Vol.182. – P.101-111.
2. Hauert R. A review of modified DLC coatings for biological applications // Diamond and related materials. – 2003. – V.12. – P.583-589.
3. Mark g. Alderson, Teresa W. Tough, Terri Davis-Smith, Steve Braddy, Ben Falk, Kenneth A. Schooley, Raymond G. Goodwin, Craig A. Smith, Fred Ramsdell, and David H. Lynch. Fas Ligand Mediates Activation-induced Cell Death in Human T Lymphocytes // J. Exp. Med. – 1995. – Vol.181. – P.71-77.
4. Lightfoot A., Martin J. and Amendola A. Fluorescent viability stains overestimate chondrocyte viability in osteoarticular allografts // The American Journal of Sports Medicine. – 2007. – Vol.35, No.11. – P.1817 – 1823.
5. Li D.J., Niu L.F. Influence of N atomic percentages on cell attachment for CN_x coatings // Bull. Mater. Sci. – 2003. – Vol.26, №4. – P.371-375.
6. Cui F.Z., Li D.J. A review of investigations on biocompatibility of diamond-like carbon and carbon nitride films // Surface and Coatings Technology. – 2000. – Vol.131. – P.481-487.
7. Grill A. Diamond-like carbon coatings as biocompatible materials – an overview // Diamond and Related Materials. – 2003. – Vol.12. – P.166-170.
8. Колпаков А.Я., Инкин В.Н., Уханов С.И. // Способ формирования сверхтвердого аморфного углеродного покрытия в вакууме: Пат. РФ № 2240376.
9. Эффекты памяти формы и их применение в медицине // Под ред. А.А. Монасевича. – Новосибирск: Наука, 1993 – 744 с.
10. Chemical and electrochemical aspects of biocompatibility of titanium and its alloys. P. Kovacs, G.A. Davidson: Medical appl. of titanium and its alloys: the material and biological issues. ASTM STP 1272, S.A. Braun and J.E. Lemons Eds., American Society for Testing and Materials, 1996 – P.167-178.
11. Oonishi H. Proc. Sec. World Congress on Biomaterials, Washington, 1984 – p. 183.
12. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений: Методические рекомендации: – М., 2006. – 27 с.
13. Маслов А.И., Дмитриев Г.К., Чистяков Ю.Д. // Импульсный источник углеродной плазмы для технологических целей // Приборы и техника эксперимента. – 1985. – №3. – С.146-149.



TOXICITY ESTIMATION OF OBJECTS FOR THE TITANIUM NICKELIDE IMPLANTS IN THE *IN VITRO* EXPERIMENTS

S.V. Nadezhdin
M.G. Kovaleva
A.Ya. Kolpackov
A.I. Poplavskij
M.I. Moscalenko
I.O. Yarzhombek

Belgorod State University

*Pobedy St., 85, Belgorod,
308015, Russia*

E-mail: Kovaleva@bsu.edu.ru

The paper deals with the results concerning the toxicity of the implant blank received by means of in vitro tests. These blanks are made of titanium nickelide with various types of surface modification. Different types of modification includes: titanium ions bombardment, nanodimensional diamond-like carbonic coating, nanodimensional diamond-like carbon coating, doped with nitrogen. Carbonic overcoating is held with the help of the pulsed vacuum-arc technique. The fluorescent method with the subsequent cell viability was applied for estimation of the object toxicity prepared from the titanium nickelide. The fluorescence registration of the fluorochroms and following result analysis are held on the confocal laser scanning microscope Nikon DIGITAL ECLIPSE C1 plus. It is shown that the presence of thin nickel-free barrier layers, formed on the surface of the titanium nickelide with the use of ionic-plasmous technologies, results the increase of its corrosion resistance and complicates nickel ionic coming out in the biological environment. It is determined that the blanks from titanium nickelide modified with nanodimensional diamond-like carbonic coating and alloyed nitrogen can be considered as bioresistant without any cytotoxic effect on white blood cells' viability.

Key words: implant, biocompatibility, bioresistance, titanium nickelide, leukocytes, cell viability, modified surfaces, nanodimensional diamond-like carbonic coatings.