

Оценка биосовместимости и биорезистентности заготовок имплантатов из никелида титана с модифицированными наноразмерными поверхностными слоями в опытах *in vivo*

С.В. Надеждин, М.Г. Ковалева, А.Я. Колпаков, Е.В. Зубарева,
Е.Н. Хорольская

ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород

Контактная информация: Зубарева Екатерина Владимировна, zubareva-e@yandex.ru

Исследована способность имплантатов, изготовленных из никелида титана с модифицированными титаном и углеродом наноразмерными поверхностными слоями, поддерживать регенераторный процесс и противостоять комплексу воздействий организма. Исследование биосовместимости и биорезистентности имплантатов из никелида титана было выполнено на 32-х беспородных белых мышах. Установлено, что все имплантаты являются биосовместимыми и по истечении 14-ти дней не оказывают отрицательного влияния на гистотипическую дифференцировку клеток в зоне дефекта. Выявленные следы никеля в плазме крови подопытных животных свидетельствуют о высокой биоактивности имплантатов из исходного *TiNi* с немодифицированной поверхностью. Нанесение на поверхность *TiNi*-имплантатов алмазоподобного углеродного покрытия позволяет снизить биоактивность материала и обеспечить полноценную репаративную регенерацию ткани.

Ключевые слова: имплантат, никелид титана, биосовместимость, биорезистентность.

Введение

На сегодняшний день в травматологии и ортопедии для устранения дефектов костных тканей используют имплантаты, изготовленные из различных металлов и их сплавов, среди которых выделяется сплав никелида титана (*TiNi*). Данный сплав обладает уникальными свойствами – сверхэластичностью и памятью формы [2, 3, 9], однако наличие высокотоксичного никеля (~50 ат.%) не позволяет широко применять данный материал в клинической медицине. Решением этой проблемы является создание защитного слоя – биосовместимого покрытия, которое ограничивало бы выход

никеля в окружающие имплантат ткани [13]. Среди существующих видов покрытий хорошо себя зарекомендовало алмазоподобное углеродное покрытие [12], которое позволяет эффективно решать несколько проблем: выхода ионов никеля из имплантатов [7] и повышения их износ- и коррозионной стойкости [10].

Цель работы – исследование способности имплантатов из никелида титана с модифицированными титаном и углеродом наноразмерными поверхностными слоями поддерживать регенераторный процесс и противостоять комплексу воздействий организма.

Материалы и методы

Имплантаты из никелида титана (*TiNi*-имплантаты) были изготовлены из сплава состава $Ti - 50,5 \text{ ат.\% } Ni$ и представляли собой круглые диски диаметром 5 мм. В работе были использованы четыре вида *TiNi*-имплантатов: 1 – исходный никелид титана – *TiNi*; 2 – никелид титана, модифицированный титаном – *TiNi-Ti*; 3 – никелид титана, модифицированный наноразмерными алмазоподобными углеродными покрытиями – *TiNi - DLC*; 4 – никелид титана, модифицированный наноразмерными алмазоподобными углеродными покрытиями, легированными азотом – *TiNi-DLC-N*. *TiNi*-имплантаты первого вида изготавливали электроэрозионной резкой с помощью проволоочно-вырезного станка AQ300L, все грани механически шлифовали до зеркального блеска с помощью комплекса оборудования для подготовки образцов Struers. На поверхность *TiNi*-имплантатов второго вида после шлифовки наносили слой биотолерантного титана вакуумно-дуговым методом на установке УВНИПА-1-001. Для образцов третьего вида формирование наноразмерных алмазоподобных углеродных покрытий проводили на установке УВНИПА-1-001 по способу, описанному в работе [6], который позволяет снизить величину возникающих в покрытии внутренних напряжений сжатия. Предварительно обработку поверхности *TiNi*-имплантатов проводили ионами азота и ионами титана [4]. Нанесение наноразмерного алмазоподобного углеродного покрытия проводили с использованием импульсного источника углеродной плазмы, подробно описанного в работе [5]. Толщина наноразмерного алмазоподобного углеродного

покрытия составила 180 нм. Наноразмерные алмазоподобные углеродные покрытия, легированные азотом, были получены путем напуска в вакуумную камеру установки УВНИПА-1-001 азота до давления 0,1 Па (*TiNi*-имплантаты 4-го вида) [6].

Исследование биосовместимости и биорезистентности имплантатов из никелида титана было выполнено на 32-х беспородных белых мышах-самцах (ICR) массой 20-25 г в возрасте 2-х мес. Животные получены из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Мышей содержали в соответствии с ГОСТ Р 53434-2009 от 02.12.2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)» и Приказом Минздравсоцразвития РФ №708н от 23 августа 2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Животные содержались в стационарных клетках, не более 10 особей в клетке, в контролируемых условиях окружающей среды (температура воздуха 21-25°C; освещение в помещениях – естественно-искусственное, 12-часовой световой цикл). В качестве подстилки использовали стерильные древесные опилки из хвойных пород деревьев. В качестве корма применялся полнорационный гранулированный комбикорм для лабораторных животных ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Водопроводная очищенная вода давалась в поилках *ad libitum* [8].

Животные случайным образом были поделены на 4 группы по 8 особей в каждой. Первой группе животных инокулировали под кожу *TiNi*-имплантаты первого вида, второй группе – имплантаты *TiNi-Ti*, третьей – имплантаты *TiNi-DLC*, четвертой группе – имплантаты *TiNi-DLC-N*. Экспериментальные исследо-

вания с использованием лабораторных животных проводили в соответствии с международными требованиями [11] и согласно ГОСТу Р ИСО 10993-6-2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными». Оценку биорезистентности и биосовместимости осуществляли по ГОСТу Р ИСО 10993-6-2009. *TiNi*-имплантаты вводили под кожу в соединительную ткань со стороны спины подопытного животного. Разрезали кожу и тупым рассечением делали один карман. Основание кармана располагали на расстоянии 10 мм от линии разреза. В карман помещали один *TiNi*-имплантат, затем накладывали швы для предотвращения движения и выпадения заготовки имплантата. Продолжительность эксперимента составила 14 суток. После истечения установленного срока эксперимента макро- и микроскопически оценивали местную реакцию соединительных тканей. Фотографирование зоны дефекта проводили при помощи стереоскопического микроскопа Leica EZ 4D. Извлеченные из-под кожи *TiNi*-имплантаты исследовали на сканирующем электронном микроскопе Quanta 200 3D в режиме низкого вакуума. Степень реакции на инокуляцию определяли измерением расстояния от поверхности соприкосновения *TiNi*-имплантата с тканью до участков, имеющих характеристики нормальной ткани с нормальным кровообращением. Гистологические препараты соединительных тканей зоны дефекта готовили общепринятыми методами. При исследовании местного действия после имплантации *TiNi*-имплантатов оценивали следующие параметры: степень фиброза и воспаления; дегенерацию окружающих

тканей; клеточный состав зоны дефекта; наличие некроза; степень интеграции материала имплантата с соединительной тканью инокуляционной зоны. Объем регенераторного процесса (в %) определяли при помощи сетки со 100 точками (81 квадрат = 100%), вставленной в окуляр стереомикроскопа Leica EZ4D [1]. Гистологические препараты изучали при помощи аппаратно-программного комплекса Видео-Тест-Размер (микроскоп Axioplan plus фирмы «Zeiss»).

Для оценки биорезистентности *TiNi*-имплантатов применяли рентгеноспектральный микроанализ и рентгеновский спектрохимический анализ. Пробоподготовку для рентгеноспектрального микроанализа осуществляли следующим образом: извлеченные из зоны дефекта участки соединительной ткани, контактировавшей с *TiNi*-имплантатами, фиксировали в 10% растворе формалина и подвергали обезвоживанию в спиртах. Затем образцы ткани исследовали на сканирующем электронном микроскопе Quanta 200 3D в режиме высокого вакуума с использованием приставки спектрального рентгеновского анализа EDAX Genesis.

При помощи рентгеновского спектрохимического анализа определяли содержание никеля в плазме крови, которую получали из образцов крови, взятой от экспериментальных животных перед забором гистологического материала. Плазму переносили в кюветы, предназначенные для определения макро- и микроэлементов при помощи рентгенофлуоресцентного спектрометра ARL Optim X. Т.к. концентрация элемента слишком мала, для проведения анализа применяли специальные методики повышения концентрации до предела чувствительности спектрометра. Жидкую

плазму крови отстаивали (упаривали) в кюветах на пленке 3,6 мкм «Mylar», предварительно измерив объем и массу жидкой плазмы. В результате испарения на поверхности майларовой пленки образовывалась тонкая пленка исследуемого вещества. Измерения состава производили в атмосфере гелия, при рабочем напряжении 25-50 кВ, токе на трубке 1-1,36 мА. Были исследованы 4 группы образцов, разбитых на 5 подгрупп, количество определений в каждой подгруппе составило 3 пробы. В качестве контрольной пробы была использована плазма крови, полученная от животного без *TiNi*-имплантата. Достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

В ходе оценки биологической реакции организма на инокуляцию

TiNi-имплантатов во всех экспериментальных группах признаков местной воспалительной реакции в зоне дефекта обнаружено не было. Вокруг имплантатов сформировалась соединительнотканная прослойка, покрывающая экспериментальный образец со всех сторон. В зоне дефекта отсутствовали признаки некроза и нарушения васкуляризации окружающих тканей. Макро- и микроскопически поверхность *TiNi*-имплантатов была без видимых изменений.

Изучение электронограмм *TiNi*-имплантатов показало, что во всех экспериментальных группах соединительнотканные компоненты непосредственно контактируют с поверхностью образцов. Образцы покрыты фиброзной грубоволокнистой соединительной тканью, полностью покрывающей имплантат в виде капсулы (рис. 1).

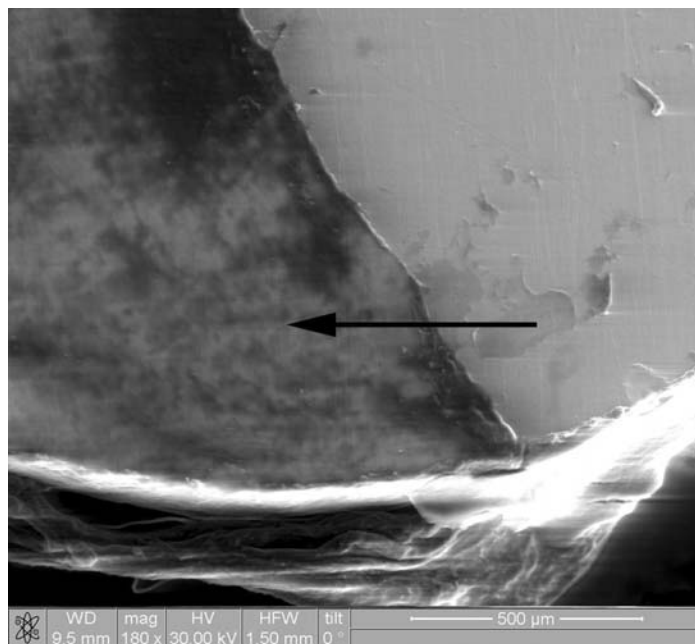


Рис. 1. Фиброзная соединительнотканная капсула вокруг *TiNi*-имплантата (обозначено стрелкой). Электронограмма.

На поверхности имплантатов выявляются отдельные коллагеновые волокна, которые, используя микрорельеф поверхности (царапины и каверны), интегрируются с ней. В ходе изучения области инокуляции *TiNi*-имплантатов во всех экспериментальных группах было установлено, что в месте соприкосновения соединительных тканей с *TiNi*-имплантатами отсутствуют признаки дегенерации и некроза тканей. При изучении гистологических препаратов патологических изменений в соединительнотканном компоненте регенерационной зоны не выявлено (рис. 2).

На 14-е сутки после оперативного вмешательства выявлялись зрелые коллагеновые волокна и плотные слои фибробластов, составляющие соединительнотканый каркас капсул. Степень реакции ткани на инокуляцию образцов имплантатов исходного *TiNi* и *TiNi-Ti*

была умеренной, площадь зоны регенерации составила 8 мм². Слабая реакция тканей на инокуляцию отмечалась при внедрении имплантатов *TiNi-DLC* и *TiNi-DLC-N*, площадь зоны регенерации составила около 6 мм².

Таким образом, все *TiNi*-имплантаты являлись биосовместимыми и по истечении 14-ти дней не оказывали отрицательного влияния на гистотипическую дифференцировку клеток в зоне инокуляции. Высокую биологическую активность показали имплантаты – исходный *TiNi* и *TiNi-Ti*, объем регенераторного процесса составил 70% площади области дефекта. Имплантаты *TiNi-DLC* и *TiNi-DLC-N* продемонстрировали биоинертность, объем регенераторного процесса был равен 40% площади области дефекта.

Рентгеноспектральный микроанализ соединительной ткани, непосредствен-

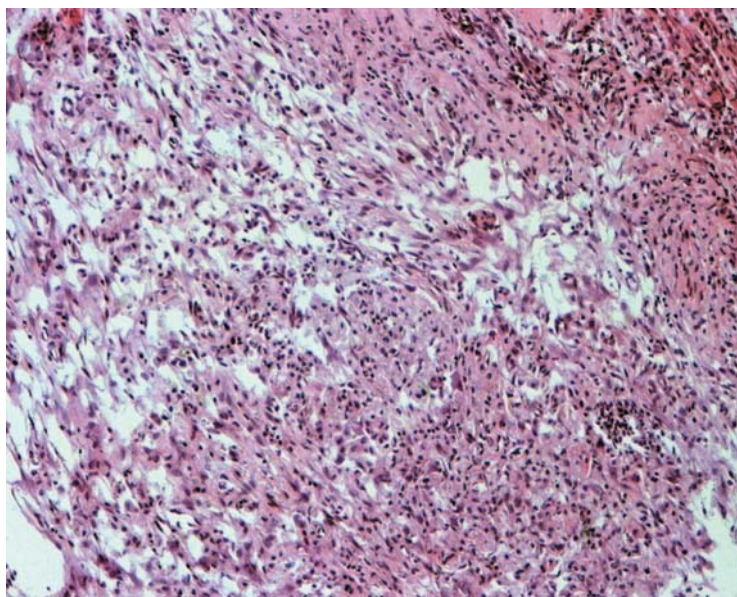


Рис. 2. Микрофотограмма соединительной ткани, непосредственно контактирующей с поверхностью *TiNi*-имплантата. Рыхлая (слева) и плотная (справа в верхнем углу) волокнистая соединительная ткань без признаков некроза и дегенерации. Окраска гематоксилин-эозином, ув. x200.

но прилегающей к *TiNi*-имплантатам, показал, что в спектре характеристического рентгеновского излучения отсутствуют пики, соответствующие никелю, во всех экспериментальных группах. В ходе рентгеновского спектроскопического анализа плазмы крови в опытных группах были выявлены крайне низкие концентрации никеля, которые находились на нижней границе чувствительности метода, а в контрольной пробе значения были равны нулю. Так, в 1-й и 2-й группах среднее значение концентрации никеля составило по 0,01 мг/мл, в 3-й группе – 0,008 мг/мл, в 4-й группе – 0,007 мг/мл. Полученные значения концентрации никеля, выявленные в плазме крови животных опытных групп, не обладают токсическим эффектом [14], однако могут влиять на характер регенераторного процесса.

Выводы

Исследование показало, что все имплантаты являются биосовместимыми и по истечении 14-ти дней не оказывают отрицательного влияния на гистотипическую дифференцировку клеток в зоне дефекта. Рентгеноспектральный микроанализ не выявил наличия никеля в окружающих имплантат тканях, что свидетельствует о биорезистентности инокулированных материалов. Обнаруженные следы никеля в плазме крови подопытных животных свидетельствуют о высокой биоактивности имплантатов из исходного *TiNi* с немодифицированной поверхностью. Нанесение на поверхность *TiNi*-имплантатов алмазоподобного углеродного покрытия позволяет снизить биоактивность материала и обеспечить полноценную репаративную регенерацию ткани.

Список литературы

1. Автандилов Г.Г., Яблучанский Н.И., Губенко В.Г. Системная стереометрия в изучении патологического процесса. – М.: Медицина. 1981. 192 с.
2. Гюнтер В.Э., Итин В.И., Манасевич Л.А. и др. Физико-механические критерии разработки материалов с памятью формы для медицины // Известия вузов. Физика. 1989. № 3. С. 97-100.
3. Гюнтер В.Э., Ходоренко В.Н., Котенко В.В. и др. О коррозионной стойкости и биологической совместимости металлических материалов // Имплантаты с памятью формы. 1993. № 1. С. 1-5.
4. Камышанченко Н.В., Ковалева М.Г., Колпаков А.Я., Маслов А.И., Поплавский А.И. Влияние дозы облучения ионами титана на износостойкость углеродного покрытия // Упрочняющие технологии и покрытия. – М.: Машиностроение. 2006. № 3. С. 29-30.
5. 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.
6. Москвитин А.А., Маслов А.И., Колпаков А.Я., Поплавский А.И. Способ формирования сверхтвердого аморфного углеродного покрытия в вакууме: Пат. РФ 2430986.
7. Надеждин С.В., Ковалева М.Г., Колпаков А.Я., Поплавский А.И., Москаленко М.И., Яржомбек И.О. Оценка токсичности заготовок для имплантатов из никелида титана в опытах *in vitro* // Научные ведомости БелГУ. Естественные науки. 2011. Вып. 14. № 3 (98). С. 163-166.
8. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. – М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
9. Эффекты памяти формы и их применение в медицине // Под ред. А.А. Манасевича. – Новосибирск: Наука. 1993. 744 с.
10. 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.

11. Guide for the care and use of laboratory animals: Eighth edition. URL: http://www.aaalac.org/resources/Guide_2010.pdf. – 2011.
12. **Hauert R.** A review of modified DLC coatings for biological applications // Diamond and related materials. 2003. Vol. 12. P. 583-589.
13. **Lightfoot A., Martin J., Amendola A.** Fluorescent viability stains overestimate chondrocyte viability in osteoarticular allografts // Am. J. of Sports medicine. 2007. Vol. 35. No. 11. P. 1817-1823.
14. Toxicological profile for nickel / U.S. Department of health and human services public health service. Agency for toxic substances and disease registry. 2005. P. 377.

Evaluation of biocompatibility and bioresistance of the workpieces of the nickel-titanium implants with modified nanosized surface layers in the *in vivo* experiments

**S.V. Nadezhdin, M.G. Kovaleva, A.Ya. Kolpakov, E.V. Zubareva,
E.N. Khorolskaya**

The ability of nickel-titanium implants with nanosized surface layers modified by titanium and carbon to support the regenerative process and to resist to the complex organism influences. Investigation of the biocompatibility and bioresistance of the *TiNi* implants was carried out on 32 outbred white mice. It was found that all implants were biocompatible and did not make a negative impact on histotypic cellular differentiation in the area of the defect at the end of 14 days. The identified traces of nickel in the blood plasma of experimental animals showed high bioactivity of the initial *TiNi* implants with unmodified surfaces. Application of *TiNi*-diamond-like carbon coatings on the surfaces of the implants reduced the bioactivity of the material and provided valuable reparative tissue regeneration.

Key words: implant, titanium nickelide, biocompatibility, bioresistance.