

# Влияние химического состава и шероховатости поверхности никелида титана на пролиферативные свойства мезенхимальных стволовых клеток

А. И. Лотков, С. Г. Псахье, Л. Л. Мейснер, В. А. Матвеева,  
Л. В. Артемьева, С. Н. Мейснер, А. Л. Матвеев

---

Представлены результаты исследования влияния на пролиферацию культуры мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и оценки цитотоксичности поверхностей образцов никелида титана, подготовленных специальными механическими и электрохимическими методами и различающихся морфологией и шероховатостью. Показано, что образцы сплава на основе никелида титана не оказывают токсического действия на МСК крысы. При культивировании в присутствии тестируемых материалов или на их поверхности МСК сохраняли жизнеспособность, адгезивные, морфологические свойства и способность к пролиферации *in vitro*, что подтверждено методами: подсчета клеток в камере Горяева, МТТ, проточной цитометрии, световой и флуоресцентной микроскопии. Установлено, что на поверхности образцов ТН1(Б), шероховатость класса С10 – 11 у которых достигалась путем многоступенчатого механического шлифования “до зеркального блеска” и последующей электролитической полировки, процессы пролиферации МСК выражены слабо. Напротив, шероховатость класса С7 поверхности образцов ТН1(А), достигнутая путем химического травления и последующей электролитической полировки, более оптимальны для пролиферации МСК.

**Ключевые слова:** никелид титана, шероховатость, мезенхимальные стволовые клетки крысы, цитотоксичность, пролиферация, биосовместимость.

---

Investigation results of influence on proliferation of the rat mesenchymal stem cells and an estimation of cytotoxicity of surfaces of the titanium nickel samples, prepared by special mechanical and electrochemical methods and differing with morphology and the roughness are presented in the article. It is shown that the studied samples do not render toxic action on the rat mesenchymal stem cells. The rat mesenchymal stem cells kept viability, adhesive, morphological properties and ability to proliferation *in vitro* at their cultivation in the presence of the tested metal samples or on the samples surface. These results are confirmed by the following methods – cell counting in the Gorjaev chamber, by the MTT-method, flow cytometry, optical and fluorescent microscopy. It is established that the proliferation processes of the rat mesenchymal stem cells are expressed poorly when the morphology and a roughness correspond to the class C10-11 as it observed on the surface of samples TH1(B) prepared by multistage mechanical grinding “to mirror shine” and then electrolytically polished. On the contrary, the morphology and a roughness of the class C7 on the surface of samples TH1(A) reached by the chemical etching and the following electrolytical polishing are more optimum for the rat mesenchymal stem cells proliferation.

**Keywords:** titanium, nickel, roughness, the rat mesenchymal stem cells, cytotoxicity, proliferation, biocompatibility.

## Введение

Проблема лечения ишемической болезни сердца (ИБС) на сегодняшний день остается одной из наиболее актуальных и приоритетных задач мирового и отечественного здравоохранения. Одним из

современных методов коррекции ИБС является интракоронарное протезирование с использованием внутрисосудистых стентов [1, 2].

Использование при лечении сосудистой системы человека стентов — эндопротезов для увеличения просвета сосудов и поддержания их в раскрытом

состоянии требует применения материалов, обладающих высокими прочностными и упруго-пластическими характеристиками. Сплавы на основе никелида титана в полной мере удовлетворяют этому требованию, демонстрируя способность, известную как эффект памяти формы или сверхэластичность, накапливать значительные деформации (4 – 6 %) и обратимо их возвращать без разрушения [3 – 5].

Особое внимание следует уделять обработке поверхности эндопротезов. Такая поверхность должна обладать минимальными адгезивными свойствами, чтобы исключить риск обрастания просвета имплантата гладкомышечной тканью, и в то же время быть биологически совместимой, а также толерантной к лекарственным препаратам, с которыми поверхность имплантата будет контактировать.

Очевидно, что для повышения биосовместимости медицинских материалов достаточно сконцентрироваться на решении задачи создания или изменения свойств их поверхности или тонких поверхностных слоев. Одним из эффективных методов улучшения физико-химических и механических свойств поверхностей изделий для микрохирургических целей, а также повышения их биосовместимости, являются методы ионно- и электроннолучевой модификации, а также комбинация и объединение этих методов с методами нанесения тонких покрытий из биотолерантных химических элементов или композиций [6, 7]. Подготовка поверхности металлического материала, которая включает в себя несколько последовательных этапов — травление, механическую шлифовку, электролитическую полировку поверхности, часто является завершающей для имплантатов. Вместе с тем, такая подготовка поверхности предшествует нанесению покрытия или выбранной модификации поверхности и, в конечном итоге, определяет качество медицинского изделия [8 – 10]. Однако детальных исследований влияния перечисленных поверхностных обработок в отдельности или в их комбинациях на свойства биосовместимости никелида титана в литературе мало.

Надежным методом доклинической оценки биосовместимости являются исследования имплантационных материалов в опытах с использованием культур клеток. Применение тестов *in vitro* дает возможность изучения воздействия исследуемого материала на биологические свойства клеток млекопитающих. Для таких исследований используют долговременные клеточные линии CCL1, CCL 163, Vero и др., культуры фибробластов, лимфоцитов, макрофагов, эпителиальных клеток, а также зародышевые/диплоидные клетки человека и животных [11]. В настоящее время для исследований свойств имплан-

татов используют МСК [12], которым свойственна дифференциация в клетки костной, соединительной, мышечной ткани, а также другие клетки мезодермального происхождения [13]. Способность МСК к пролиферации *in vitro* [9] позволяет проводить исследования с их использованием для изучения цитотоксического действия химического состава, шероховатости поверхности предполагаемых имплантатов. Результаты таких исследований, в свою очередь, позволят определить условия, как необходимые для успешной пролиферации клеток, например, в случаях восстановления костных дефектов [9] или стенок сосудов [14], так и обеспечивающие максимально возможную резистентность поверхности биосовместимого материала для клеточной пролиферации.

Цель данной работы — исследовать влияние на пролиферацию культуры МСК и определить цитотоксичность поверхностей образцов никелида титана, подготовленных специальными механическими и электрохимическими методами и различающихся шероховатостью поверхности.

## Материалы, методы поверхностной обработки и исследований

### Приготовление образцов и поверхностные обработки

Для исследований были приготовлены 2 серии образцов по 80 штук в каждой серии из плоско-прокатанных листов сплава ТН1 на основе никелида титана промышленного изготовления (фирма МАТЭК). Образцы ТН1 для физико-механических (по 14 штук в каждой серии) и биологических (по 66 штук в каждой серии) испытаний были вырублены в виде плоских пластинок размерами  $1,6 \times 10 \times 15$  мм<sup>3</sup>. Для биологических испытаний были приготовлены образцы с двумя типами поверхностей, обозначенными ТН1(А) и ТН1(Б).

**Поверхностная обработка типа А** включала в себя 2 шага:

**шаг 1** — травление в растворе (3 ч HNO<sub>3</sub> + 1 ч HF) с подогревом до  $T = 50^\circ\text{C}$ , 3 мин;

**шаг 2** — электролитическая полировка до получения металлического блеска в охлажденном до  $T = 273$  К (0 °С) растворе (3 ч CH<sub>3</sub>COOH + 1 ч HClO<sub>4</sub>) при напряжении  $U = 30$  В.

**Поверхностная обработка типа Б** включала в себя 3 шага:

**шаг 1** — травление в растворе (3 ч HNO<sub>3</sub> + 1 ч HF) с подогревом до  $T = 50^\circ\text{C}$ , 3 мин;

**шаг 2** — механическое шлифование до “зеркального блеска” на шлифовальном станке Saphir 550

(ATM GMBH, Germany). Образцы помещали в специально изготовленные металлические стаканы и заливали эпоксидной смолой, выдерживали 1 сутки при комнатной температуре ( $T_K$ ) до полного затвердевания смолы. Затем образцы шлифовали на станке на шлифовальной бумаге Silicone Carbide Grinding Foil (ATM GMBH, Germany), с постепенным уменьшением зернистости от 120 до 1200 и подачей воды с подогревом до  $T = 303$  К ( $30^\circ\text{C}$ ) на шлифовальную поверхность. Вода играла роль смазывающего материала и одновременно использовалась как нагреватель для предотвращения появления мартенситной фазы во время шлифовки. Скорость вращения шлифовального стола  $v = 150$  об./мин, время шлифовки на каждом классе зернистости  $\Delta t = 5 - 8$  мин (до выравнивания поверхности). На заключительном этапе образцы полировали на твердой перфорированной бумаге Polishing Cloth Alpha с использованием лубриканта Bio Diamant Cameo (LAM PLAN, Франция) с абразивностью 9 мкм. Скорость вращения шлифовального стола составляла  $v = 150$  об./мин, время шлифовки  $\Delta t = 2 - 5$  мин до получения зеркальной поверхности;

шаг 3 — электролитическая полировка до получения металлического блеска в охлажденном до  $T = 273$  К ( $0^\circ\text{C}$ ) растворе (3 ч  $\text{CH}_3\text{COOH} + 1$  ч  $\text{HClO}_4$ ) при напряжении  $U = 30$  В.

### Методы исследований

Фазовый анализ образцов ТН1(А) и ТН1(Б) проводили на рентгеновском дифрактометре ДРОН-7 (ЦКП “НАНОТЕХ” ИФПМ СО РАН).

Послойный элементный анализ образцов с модифицированными поверхностями проводили на Оже-спектрометре “Шхуна-2” (Россия). Диаметр зондирующего пучка электронов составлял  $\sim 1$  мкм с энергией электронов  $\sim 3$  кэВ. При регистрации Оже-спектров электронный пучок разворачивался в растр  $10 \times 10$  мкм<sup>2</sup>. Энергетическое разрешение анализатора составляло 0,7%. Для послойного распыления материала мишени использовали пучок ионов аргона с энергией ионов 3 кэВ, диаметром 1 мм. Скорость распыления материала мишени составляла 2 – 3 нм/мин.

Изучение шероховатости поверхности образцов, исследование качества обработки поверхности, визуализацию поверхностных дефектов и следов разрушения материала проводили на оборудовании ЦКП “НАНОТЕХ” ИФПМ СО РАН — трёхмерном оптическом интерферометре-профилометре New-View 5000 (Zygo, США) с точностью построения профиля поверхности  $\sim 1$  нм, растровом электронном

микроскопе LEO EVO 50 (Zeiss, Germany) и оптическом микроскопе Axiovert 200 MAT (Zeiss, Germany) с методиками светлого и темного полей и дифференциально-интерференционного контраста (ДИК), применяемого для визуализации объектов с минимальными различиями по высоте неровностей на поверхности.

Определение микротвердости в поверхностных слоях образцов проводили на микротвердомере DM8 (Affri, Италия, ЦКП “НАНОТЕХ” ИФПМ СО РАН).

### Исследования с использованием культуры клеток

*Культура клеток.* Для исследования образцов *in vitro* использовали МСК костного мозга крысы 2-го пассажа. Клетки культивировали в среде в среде Minimum Essential Medium Alpha Modification (6-MEM), содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку, 200 мМ L-глутамина и 100 мкг/мл гентамицина (фирма Biolog, Россия) в пластиковых 6-, 12-луночных планшетах (фирма Nunck, Дания) при  $37^\circ\text{C}$  в атмосфере с 5%  $\text{CO}_2$  в условиях насыщающей влажности. опыты проводили методом прямого контакта образцов с МСК, жизнеспособность которых определяли методом подсчета клеток в камере Горяева согласно [11], в метил-тиазол-тетразолия-бромиде (МТТ) тесте [15] в модификации, согласно [16].

### Определения токсических свойств

*Исследование влияния химического состава образцов ТН1(А) и ТН1(Б) на пролиферативную активность МСК.* Для определения токсических свойств материала образцов никелида титана проводили 2 варианта опытов.

Вариант I. Клетки высевали в 6-луночные планшеты в плотности  $50 \cdot 10^3$  клеток/см<sup>2</sup>, через 24 часа в лунки вносили образцы и продолжали культивирование. Через 72 часа жизнеспособность клеток исследовали методом подсчета клеток в камере Горяева и в МТТ-тесте. Для подсчета клеток в камере Горяева прикрепившиеся клетки снимали 0,25% раствором трипсина-ЭДТА (Biolog, Россия) в течение 2-5 минут. Клетки считали в 150 больших квадратах. Для МТТ-теста проводили измерение оптической плотности аликвот элюата в 4-х повторах на планшетном фотометре Appolo 8 LB 912 (Berthold Technologies, GmbH & Co, KG, Germany) при длинах волн 620 и 570 нм для исключения влияния клеточного дебриса. Жизнеспособность клеток оценивали в процентах. Контролем служили лунки с клетками без образцов.

**Вариант II.** Клетки высевали в 6-луночные планшеты в плотности  $5 \cdot 10^3$  клеток/см<sup>2</sup>. Через 24 часа в лунки вносили образцы и клетки продолжали культивировать. Через 7 и 14 суток жизнеспособность клеток определяли методом подсчета в камере Горяева и в тесте МТТ, как описано выше. Контролем служили лунки с клетками без образцов.

*Определение морфологии клеток, культивируемых в присутствии образцов никелида титана.* Морфологию клеток на поверхности лунок культивирования определяли методом оптической микроскопии, используя оптический микроскоп Axiovert 40C (Carl Zeiss, Germany).

*Исследование влияния свойств поверхности образцов ТН1(А) и ТН1(Б) на пролиферативную активность МСК.* Для определения эффективности пролиферации клеток на поверхности образцов исследуемые образцы помещали в 12-луночные планшеты, вносили суспензию клеток из расчета  $5 \cdot 10^3$  клеток/см<sup>2</sup>. Через 14, 18, 22 суток образцы переносили в новые планшеты, промывали, освобождая от неприкрепившихся клеток, количество клеток на образцах оценивали с помощью подсчета в камере Горяева после снятия клеток с образцов, как описано выше.

*Определение клеток на поверхности образцов никелида титана.* Для визуализации клеток, оценки их морфологии и плотности заселения образцов использовали МСК 2-го пассажа, трансфицированные плазмидной ДНК рEGFP-N1 (Clontech Laboratories, Inc., USA), содержащей ген зеленого флуоресцентного белка (GFP) с применением реагента для трансфекции TurboFect (Fermentas life sciences, Inc, Canada), согласно инструкции производителя. Перед просмотром на флуоресцентном микроскопе Axioimager M1 (Carl Zeiss, Germany) с использованием фильтров №9 и №49 в среду культивирования вносили краситель ядер клеток DAPI (1 мг/мл), инкубировали 10 мин, согласно инструкции производителя (Sigma, USA). Изображение документировали с помощью цветной CCD камеры Sanyo 6975.

Статистическую обработку результатов проводили согласно общепринятой методике [17]. Доверительные интервалы генеральной средней рассчитывали для  $n = 6$ .

## Результаты исследований и их обсуждение

### Исходное структурно-фазовое состояние образцов ТН1

Согласно данным рентгеноструктурного анализа, образцы ТН1 содержат 80 – 90 об.% фазы В2 с

упорядоченной объемно-центрированной кубической (ОЦК) структурой типа CsCl и менее 10 об.% вторых фаз ( $Ti_4Ni_2O_x$ ,  $Ni_4Ti_3$ , NiO,  $Ni_6TiO_8$ ), а также характеризуются наличием текстуры прокатки. Параметр решетки основной фазы В2 равен  $a_{B2} = 3,007 \pm 0,007 \text{ \AA}$ , что соответствует составу этой фазы —  $Ti_{49}Ni_{51}$ .

### Характеристика физико-химических свойств поверхности образцов ТН1

Для обеспечения одинакового химического состава приповерхностных слоев у образцов обеих серий — ТН1(А) и ТН1(Б) в качестве финишной обработки поверхности была использована электрохимическая обработка всех образцов в одном и том же электролите с одинаковыми режимами полировки. Рис. 1 иллюстрирует зависимости распределения концентрации компонентов сплава ТН1 по глубине от поверхности, характерные для обеих серий образцов. Как видно, химический состав приповерхностного слоя толщиной 10 – 15 нм содержит более 10 ат.% кислорода и углерода (каждого), концентрация которых снижается почти до нуля на глубине ~ 50 нм. Как известно [18], эти элементы участвуют в формировании биоинертной оксидно-карбидной пленки, которая обеднена никелем, по сравнению с его концентрацией в более глубоких слоях сплава ТН1 и, тем самым, может играть роль барьерного слоя на пути выхода ионов металлов в окружающую биосреду. Следует отметить, что в некоторых случаях, когда имплантат из такого сплава эксплуатируется без механического нагружения, для полной пассивации сплава на основе TiNi достаточно наличия на его

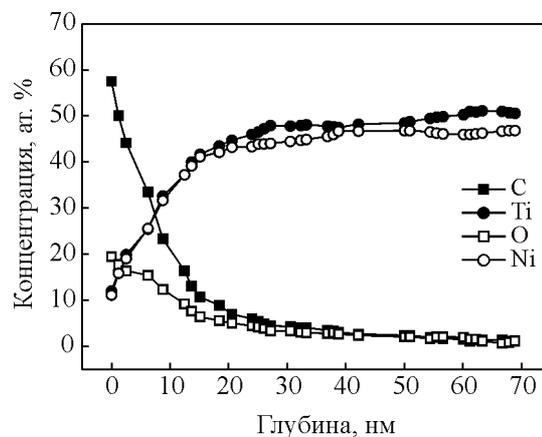


Рис. 1. Профили распределения концентрации компонентов сплава ТН1 по глубине, начиная от поверхности образца.

поверхности оксидно-карбидной пленки толщиной 10–30 нм [19, 20].

### Характеристика шероховатости поверхностей образцов ТН1(А) и ТН1(Б)

Оптический, электронно-микроскопический анализ и результаты профилометрии поверхностей образцов ТН1 после поверхностных обработок А и Б показал, что наибольшей шероховатостью характеризуются образцы ТН1(А) (рис. 2 а–в), по сравнению с образцами ТН1(Б) (рис. 2 з–е).

В то же время, данные микрорентгеноспектрального анализа (рис. 3, табл. 1) показали, что по-

верхностные слои у образцов ТН1(А) и ТН1(Б) не различаются (в пределах ошибки измерения) по химическому составу.

Прецизионные исследования шероховатости поверхностей образцов ТН1(А) и ТН1(Б) с определением основных параметров шероховатости (рис. 4, табл. 2) вдоль взаимно перпендикулярных направлений, выбранных случайным образом, показали значительные морфологические различия исследуемых поверхностей. Так, для образцов ТН1(А) характерна поверхность с развитым рельефом и значениями параметров средней шероховатости ( $R_a$ ) и наибольшей высоты профиля  $R_{max}$  (расстоянием между наибольшим выступом и наибольшей впа-

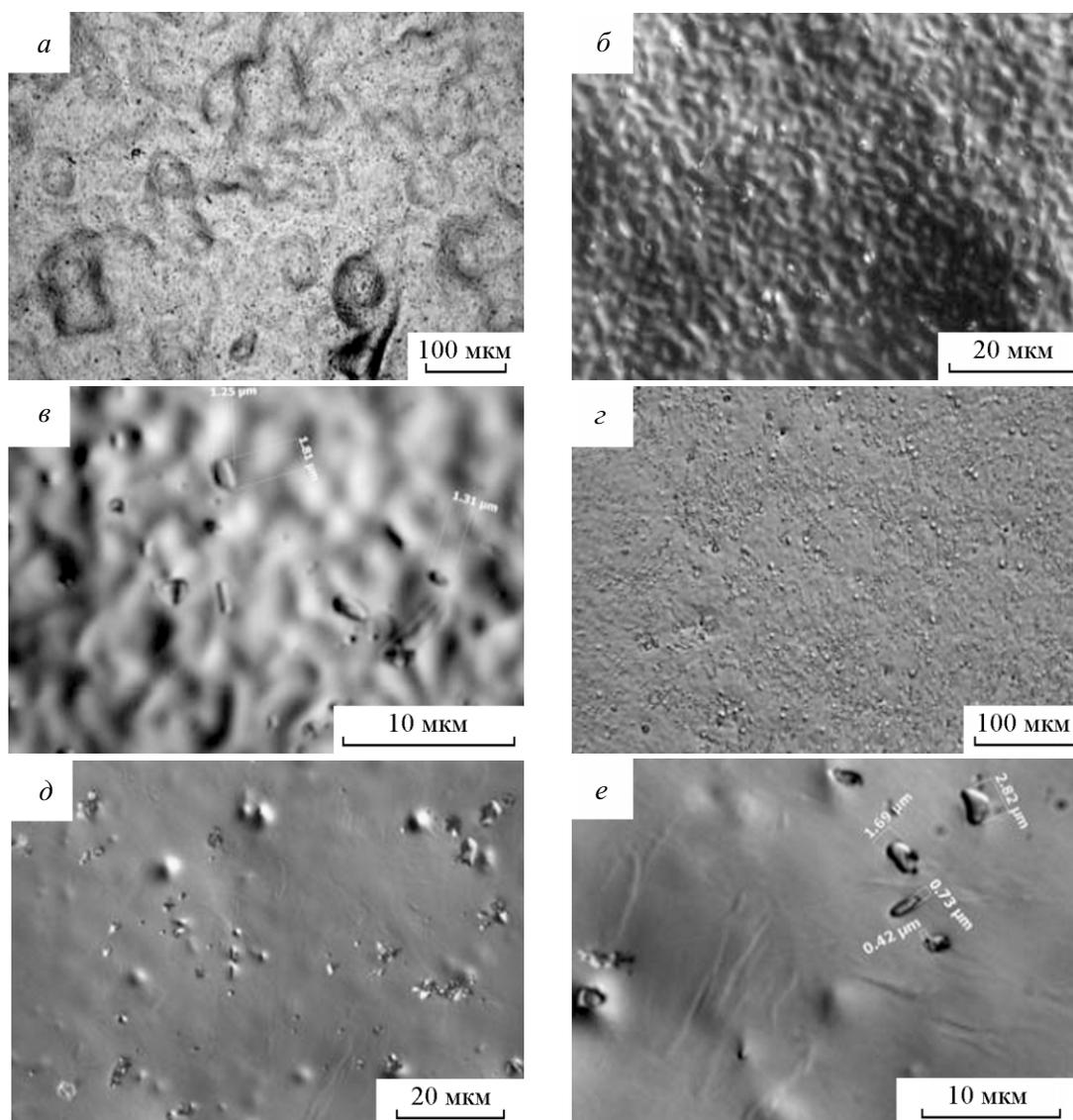


Рис. 2. Оптические ДИК-изображения (ДИК – дифференциально-интерференционный контраст) поверхностей образцов ТН1(А) – а – в, и ТН1(Б) – з – е.

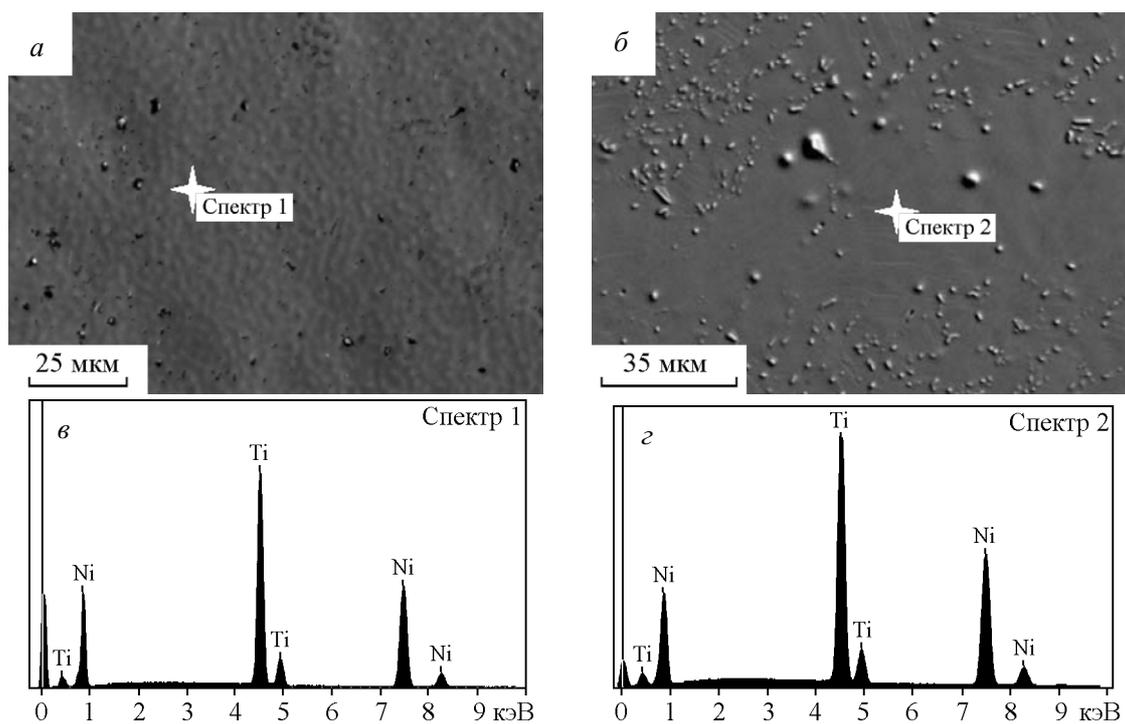


Рис. 3. РЭМ-изображения поверхностей образцов ТН1(А) (а) и ТН1(Б) (б) и рентгеновские спектры (в, г) в областях, отмеченных (+), соответствующие данным табл. 1.

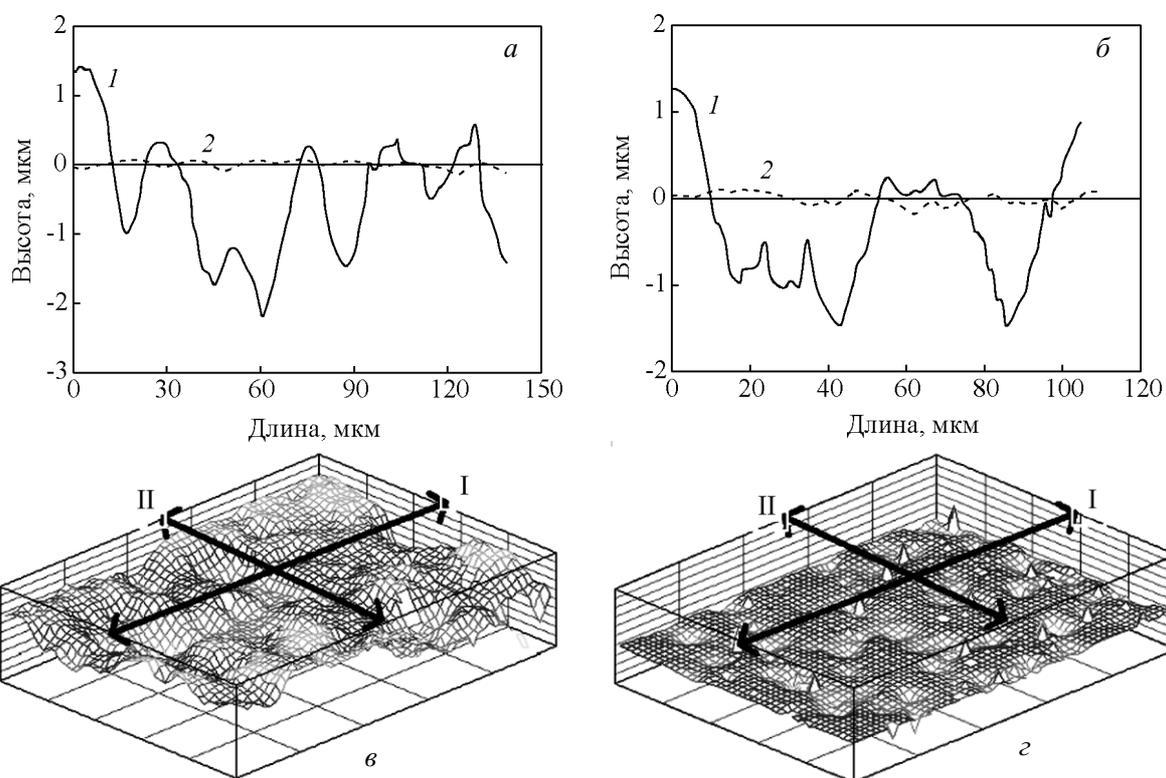


Рис. 4. Оптические профилограммы (а, б) вдоль сечений I и II, показанных на 3D-изображениях (в, г) поверхностей образцов ТН1(А) (а, в) и ТН1(Б) (б, г). Кривые 1 (а, б) – ТН1(А), кривые 2 (а, б) – ТН1(Б). Направления I, II, соответствующие профилограммам а, б, показаны двойными стрелками на в, г).

Таблица 1

Химический (элементный) состав поверхностных слоев в образцах ТН1(А) и ТН1(Б), полученный методом микрорентгеноспектрального анализа на РЭМ LEO EVO 50

Элемент	Химический (элементный) состав образцов, вес. %	
	ТН1(А)	ТН1(Б)
углерод	1,51	1,27
титан	42,04	41,57
никель	56,45	57,15

Таблица 2

Параметры шероховатости поверхностей образцов ТН1 после финишных обработок А и Б (п. Материалы, методы поверхностной обработки и исследований), рассчитанные по случайной выборке из 2 пар взаимно перпендикулярных направлений (сечений)

Параметры шероховатости	Образец	
	ТН1(А)	ТН1(Б)
Средняя шероховатость $R_a$ , мкм	0,690	0,093
	0,972	0,047
	1,344	0,065
	0,915	0,061
Высота профиля $R_{max}$ , мкм	3,636	0,352
	2,780	0,305
	5,419	0,270
	4,000	0,287
Класс шероховатости	∇ 7	∇ 10–11

Ошибка  $\pm 0,005$ .

диной), соответствующими шероховатости класса С7. Напротив, для образцов ТН1(Б) характерна поверхность с почти гладким рельефом (рис. 4) и значениями параметров  $R_a$  и  $R_{max}$ , соответствующими шероховатости класса С10–11 (ГОСТ 2.309-69) (табл. 2). В то же время, общим для обоих типов образцов является квазипериодический характер распределения выпуклостей и вогнутостей на их поверхностях со средними значениями периодов, то есть расстояний между соседними гребнями (выпуклостями или вогнутостями), изменяющимися в диапазонах значений 30 – 100 и 5 – 10 мкм, соответственно. Эти параметры, в свою очередь, определяют характерный размер структурного элемента, описывающего морфологию изучаемой поверхности, и имеют особое значение при сопоставлении с размерами клеток, которые культивируются на данных поверхностях. Отметим, что использованное в данной работе оборудование по обработке поверхности образцов позволяет осуществлять контроль и управлять параметрами шероховатости поверхности в диапазоне классов шероховатости от С5 до С12.

Таким образом, из сравнения химических и физических параметров поверхностей образцов ТН1(А) и ТН1(Б) следует, что две сравниваемые

группы образцов имеют на поверхности одинаковые химический и фазовый составы и отличаются между собой уровнем ее шероховатости. При этом, размер структурного элемента на поверхностях, который определяется расстоянием между соседними гребнями на профилях рельефов, изменяется в диапазонах значений 30 – 100 и 5 – 10 мкм, соответственно для образцов ТН1(А) и ТН1(Б).

### Исследование влияния химического состава образцов ТН1(А) и ТН1(Б) на пролиферативные свойства МСК

Влияние химического состава и свойств поверхности никелида титана на пролиферативные свойства МСК при культивировании клеток *in vitro* в присутствии образцов ТН1(А) и ТН1(Б) определяли по пролиферации и морфологии клеток [13].

Цитотоксическое действие образцов на МСК костного мозга крыс оценивали по жизнеспособности клеток, культивируемых в присутствии образцов ТН1(А) и ТН1(Б) в течение 72 часов, 7 и 14 суток. При культивировании клеток в присутствии образцов в течение 72 часов, согласно результатам подсчета количества клеток в камере Горяева и в МТТ-тесте, не обнаружено токсического действия химического состава образцов на пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток. Об этом свидетельствует отсутствие достоверных отличий между количеством живых клеток, культивируемых в присутствии образцов ТН1(А), ТН1(Б) и контролем (рис. 5а, б). Данные по оценке количества жизнеспособных клеток в тесте МТТ (рис. 5а) и результаты стандартного подсчета количества клеток в камере Горяева, снятых с лунки культивирования (рис. 5б), дали близкие результаты.

При культивировании клеток в присутствии образцов в течение 7 и 14 суток, согласно результатам подсчета количества клеток в камере Горяева и МТТ-теста, не обнаружено токсического влияния материала образцов никелида титана на пролиферацию МСК. Об этом свидетельствует отсутствие достоверных отличий между количеством живых клеток, культивируемых в присутствии образцов ТН1(А), ТН1(Б) и контролем (рис. 5в, г).

Данные по оценке количества клеток, культивируемых в присутствии образцов ТН1(А) и ТН1(Б), полученные методом подсчета клеток в камере Горяева и МТТ-тесте, были сопоставимы с количеством клеток в контроле при определении эффективности пролиферации МСК на 7-е и 14-е сутки. При сравнении данных по оценке количества клеток в тесте МТТ (рис. 5а, в) и результатов стандартного подсчета количества клеток в камере Горяева (рис. 5б, г),

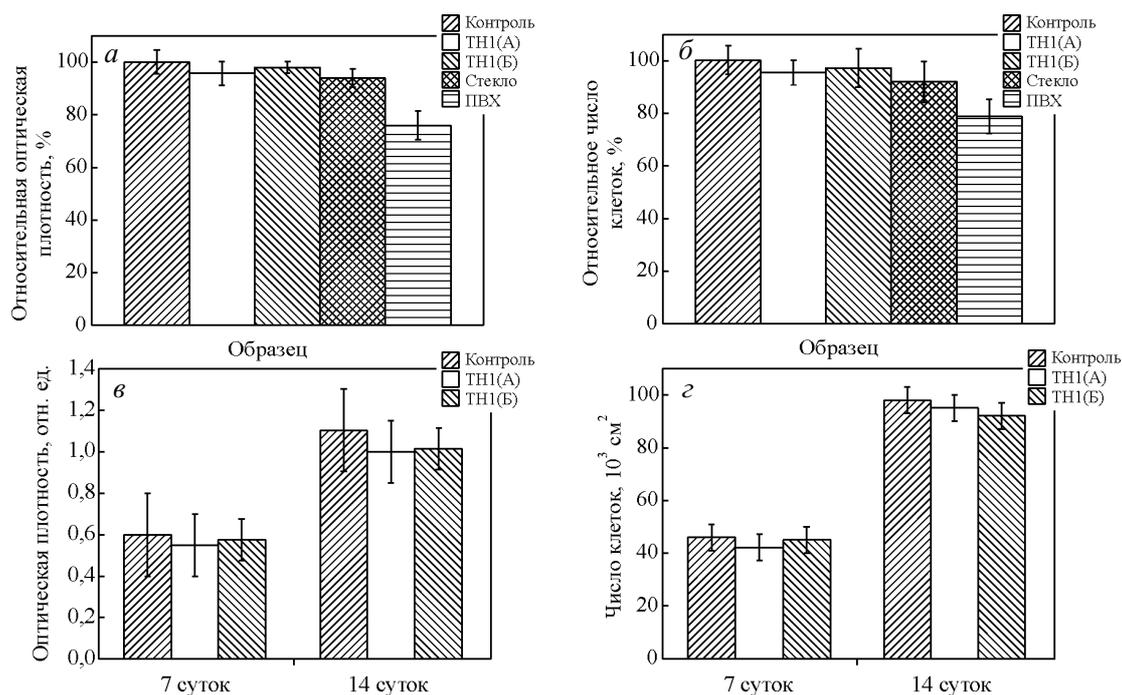


Рис. 5. Оценка цитотоксичности образцов ТН1(А) и ТН1(Б): а – МТТ-тест; б – счет в камере Горяева. Эффективность пролиферации мезенхимальных стволовых клеток в присутствии образцов ТН1(А) и ТН1(Б); в – МТТ-тест; з – счет в камере Горяева.

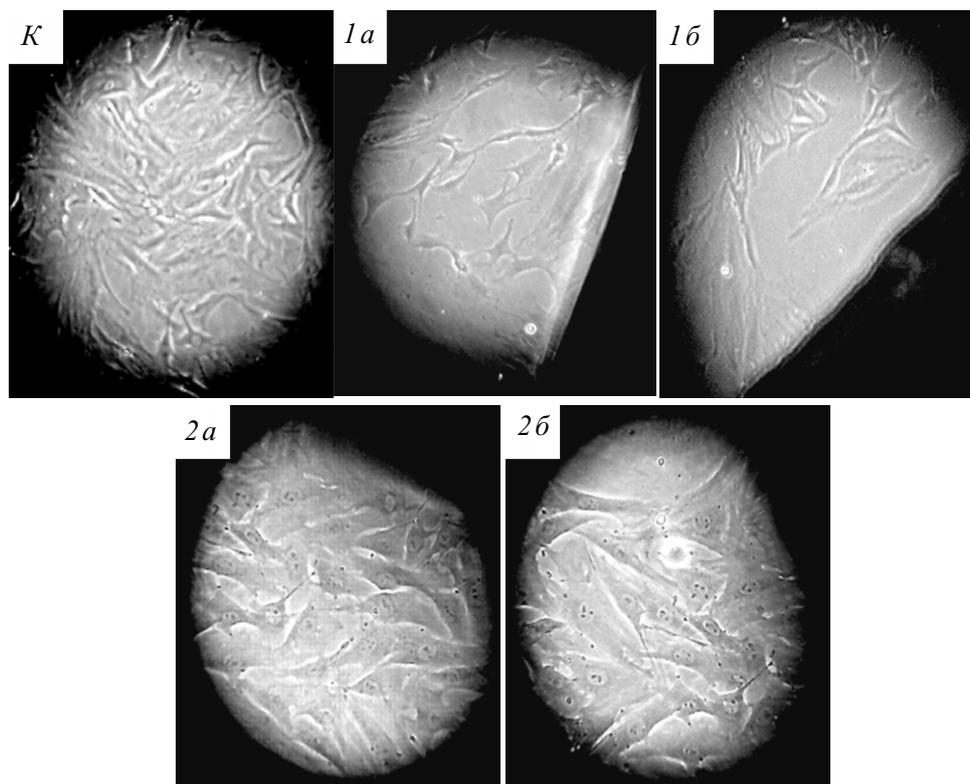


Рис. 6. Морфология мезенхимальных стволовых клеток при их культивировании в присутствии образцов ТН1(А) и ТН1(Б). К – клетки культивируемые без образцов; клетки, культивируемые 3-ое суток в присутствии образцов: ТН1(А) – 1а, ТН1(Б) – 1б; клетки, культивируемые 14 суток в присутствии образцов: ТН1(А) – 2а, ТН1(Б) – 2б. Оптический микроскоп, К, 1а, 1б – увеличение  $\times 50$ ; 2а, 2б – увеличение  $\times 100$ .

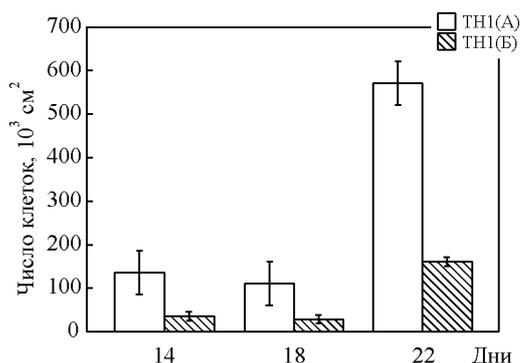


Рис. 7. Эффективность пролиферации мезенхимальных стволовых клеток на образцах TH1(A) и TH1(B). Подсчет числа клеток в камере Горяева.

полученных при оценке жизнеспособности клеток через 72 часа, 7 и 14 суток культивирования МСК в присутствии образцов TH1(A) и TH1(B), не выявлено временной зависимости количества клеток, контактирующих с поверхностями этих образцов, что свидетельствует о нетоксичности материала образцов для МСК.

Согласно данным оптической микроскопии, независимо от длительности времени культивирования в присутствии образцов TH1(A) и TH1(B), МСК, прикрепляясь к поверхности пластика лунки культивирования, сохраняли свойственную им фибробластоподобную морфологию (рис. 6).

При исследовании культуры МСК с помощью предложенных методов не обнаружено цитотоксических свойств образцов TH1(A) и TH1(B). Как показало экспериментальное исследование, не обнаружено повреждающего действия химического состава образцов никелида титана на МСК или действия, стимулирующего пролиферацию МСК, что позволяет предполагать биоинертность поверхностных слоев исследуемого материала.

При исследовании эффективности пролиферации МСК на поверхности образцов TH1(A) и TH1(B), согласно результатам подсчета количества клеток в камере Горяева, выявлено, что количество прикрепившихся клеток зависело от длительности времени культивирования (рис. 7).

#### **Исследование влияния шероховатости поверхности образцов TH1(A) и TH1(B) на пролиферативные свойства МСК**

Более высокие показатели количества клеток наблюдали на образцах TH1(A), тогда как на образцах TH1(B) их значения были ниже, что, вероятно, определяется уровнем шероховатости поверхности

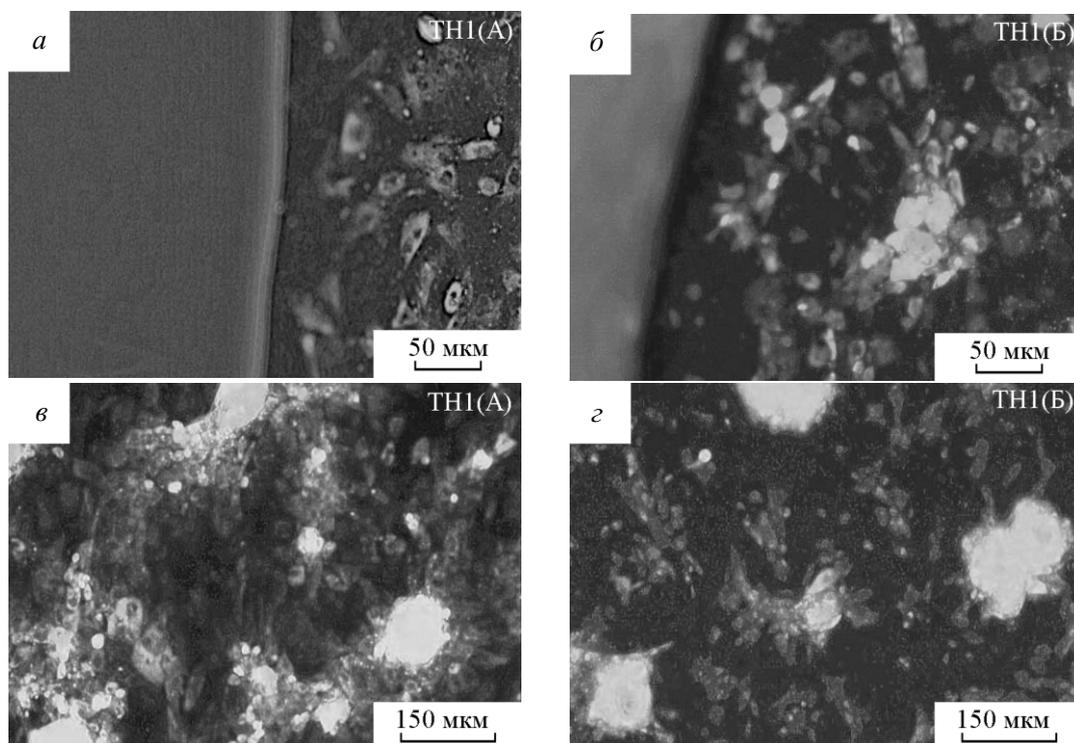


Рис. 8. Флуоресцентный анализ мезенхимальных стволовых клеток, трансфицированных плазмидной ДНК eGFP-N1, на поверхности образцов TH1(A), TH1(B). Ядра окрашены DAPI; 77-е сутки культивирования.

исследуемых образцов. Для образцов ТН1(А) характерна шероховатость класса С7, для образцов ТН1(Б) — шероховатость класса С10–11. Полученные данные согласуются с результатами [19, 21], где показано, что к шероховатой поверхности биоматериалов клетки присоединяются в большем количестве, что ускоряет пролиферацию клеток.

Исследование методом флуоресцентной микроскопии показало, что МСК на поверхности образцов ТН1(А) и ТН1(Б) сохраняли фибробластоподобную морфологию (рис. 8а, б), однако распределение клеток по поверхности образцов было различным (рис. 8в, г). По поверхности образцов ТН1(А) клетки располагались равномерно, образуя почти непрерывный слой (рис. 8в). На поверхности образцов ТН1(Б) плотность заселения МСК была меньше, клетки располагались, формируя разрозненные колонии (рис. 8г).

Исследование клеточного слоя на поверхности образцов никелида титана показало, что поверхность образцов имеет свойства, обеспечивающие приращение и пролиферацию МСК.

Распределение клеток, наблюдаемое на поверхности образцов в виде формирования сомкнутого и не сомкнутого слоя клеток, по-видимому, зависит от морфологии и шероховатости поверхности исследуемых образцов, поскольку, как показано выше, химический состав их одинаков и не оказывает токсического действия на МСК. Известно [23], что развитая шероховатость поверхности образца увеличивает адгезию клеток на его поверхности, поскольку белков адгезии внеклеточного матрикса значительно больше на шероховатой поверхности, чем на гладкой [24]. По-видимому, при культивировании в одинаковых условиях на шероховатую поверхность образцов ТН1(А) из среды культивирования клеток адсорбируется большее количество белковых молекул, участвующих в адгезии клеток, по сравнению с гладкой поверхностью образцов ТН1(Б). В то же время, для шероховатых поверхностей имеет место существенно более высокая степень адсорбции белков адгезии из культуральной среды, содержащей сыворотку, чем для более гладких поверхностей [25]. Возможно, уровень шероховатости поверхности образцов ТН1(А) позволяет формировать внеклеточный матрикс, необходимый для адгезии клеток, в пространственно более правильной организации по сравнению с внеклеточным матриксом, сформированным на поверхности образцов ТН1(Б). Как показано в [25], наилучшую адгезию и пролиферацию клеток обеспечивали молекулы фибронектина, пространственную взаимосвязь которых определяла степень шероховатости, сформированная частицами

размером ~200 нм, в отличие от молекул фибронектина, дискретно адсорбированных на гладкой поверхности или поверхностях с шероховатостями, сформированными частицами другого размера.

## Выводы

1. Из сравнения химических и топографических параметров двух типов поверхностей — (А) и (Б) — на образцах сплава ТН1 следует, что они имеют одинаковый химический состав и отличаются между собой только уровнем шероховатости. Размер структурного элемента, характеризующего морфологию поверхностей образцов ТН1(А) и ТН1(Б), который определяется расстоянием между соседними гребнями на профилях рельефов, изменяется в диапазонах значений 30 – 100 и 5 – 10 мкм, соответственно. Средняя шероховатость поверхностей образцов ТН1(А) и ТН1(Б)  $R_a$  колеблется в диапазонах значений 0,700 – 1,350 и 0,047 – 0,093 мкм, что соответствует классам шероховатости С7 и С10–11.

2. Показано, что исследованные образцы сплава ТН1 на основе никелида титана не токсичны по отношению к МСК крысы. При культивировании МСК в присутствии или на поверхности образцов эти клетки сохраняют жизнеспособность, адгезивные, морфологические свойства и способность к пролиферации *in vitro*.

3. Установлено, что на поверхности образцов ТН1(Б), морфология и шероховатость класса С10–11 у которых достигалась путем многоступенчатого механического шлифования “до зеркального блеска” и последующей электролитической полировки, процессы пролиферации МСК выражены слабо. Напротив, морфология и шероховатость класса С7 поверхности образцов ТН1(А), достигнутая путем химического травления и последующей электролитической полировки, более оптимальны для пролиферации МСК.

*Работа выполнена по проектам СО РАН (проект № III.20.3.1, проект № 57).*

## Литература

1. Абугов С.А., Пурецкий М.В., Руденко П.А. и др. Результаты эндоваскулярного стентирования бифуркационных стенозов у больных ишемической болезнью сердца. Кардиология, 1998, № 8, с. 7 – 11.
2. Араблинский А.В., Роган С.В., Сидельников А.В. Стентирование коронарных артерий в клинической практике. Кардиология, 2000, №9, с.100 – 105.
3. Корнилов И.И., Белоусов О.К., Качур Е.В. Никелид титана и другие сплавы с эффектом памяти. М.: Наука, 1977, 180 с.

4. Лотков А.И., Хачин В.Н., Гришков В.Н., Мейснер Л.Л., Сивоха В.П. Сплавы с памятью формы. В кн.: Физическая мезомеханика и компьютерное конструирование материалов. Новосибирск: Наука, 1995, т. 2, с. 202 – 213.
5. Журавлев В.Н., Пушин В.Г. Сплавы с термомеханической памятью и их применение в медицине. Екатеринбург, УрО РАН, 2000, 151с.
6. Мейснер Л.Л. Механические и физико-химические свойства сплавов на основе никелида титана с тонкими поверхностными слоями, модифицированными потоками заряженных частиц. Физическая мезомеханика, 2004, т. 7, спец.вып., ч. 2, с. 169 – 172.
7. Лотков А.И., Мейснер Л.Л., Гришков В.Н. Сплавы на основе никелида титана: ионно-лучевая, плазменная и химическая модификации поверхности. ФММ, 2005, т. 99, № 2, с. 1 – 13.
8. Williams D. Biocompatibility of Clinical Implant Materials. CRC Press, Boca Raton, Fl. 1981, p. 9 – 44.
9. Shabalovskaya S.A., Anderegg J., Laab F., Thiel P.A., Rondelli G. Surface Conditions of Nitinol Wires, Tubing, and As-Cast Alloys. The Effect of Chemical Etching, Aging in Boiling Water, and Heat Treatment. J. Biomed. Mater. Res. 2003, v. B65, p.193 – 203.
10. Биосовместимость. Под ред. Севастьянова В.И. М.: ИЦ ВНИИ геосистем, 1999, 368 с.
11. Шахов В.П., Хлусов И.А., Дамбаев Г.С., Зайцев К.В., Егорова А.Б., Загребин С.С., Волгушев С.А. Методы изучения клеточных культур, искусственных органов и биоматериалов. В кн.: Введение в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей. Томск: STT. 2004, с. 340 – 349.
12. Корж Н.А., Кладченко Л.А., Малышкина С.В. Имплантационные материалы и остеогенез. Роль оптимизации и стимуляции в реконструкции кости. Ортопедия, травматология и протезирование, 2008, № 4, с. 5 – 14.
13. Владимирская. Е.В., Майорова О.А., Румянцев С.А., Румянцев А.Г. Стволовые клетки и межклеточные взаимодействия. В кн.: Биологические основы и перспективы терапии стволовыми клетками. М.: Медпрактика-М, 2005, с. 74 – 102.
14. Miller D.C., Haberstroh K.M., Webster T.J.. PLGA nanometer surface features manipulate fibronectin interection for improved vascular cell adhesion. J. Biomed. Mater. Res. A. 2006, v. 81A, p. 678 – 684.
15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Meth., 1983, v. 65, p. 55 – 63.
16. Татаренко-Козьмина Т.Ю., Порадовская Т.П., Кудинова В.Ф., Павлова Т.Е. Исследование жизнеспособности мезенхимальных стромальных клеток костного мозга – предшественников остеобластов на биостабильных композитах. Сборник научных работ Сибирского государственного медицинского университета “Естествознание и гуманизм”. Томск, 2005, т. 2, № 2, с. 19.
17. Плохинский Н.А. Биометрия. М.: Изд-во МГУ, 1970, 367 с.
18. Акимов А.Г. О закономерностях образования защитных оксидных слоев в системах метал (сплав)–среда. Защита металлов. 1986, т. XXII, № 6, с. 879 – 886.
19. Мейснер Л.Л., Сивоха В.П., Лотков А.И., Бармина Е.Г. Коррозионные свойства сплавов квазибинарного разреза TiNi-TiAu в биохимических растворах. ФХОМ, 2006, № 1, с. 78 – 84.
20. Shabalovskaya S.A., He Tian, Andregg J.W., Schryvers D.U., Carroll W.U., Humbeeck J.V. The influence of surface oxides on the distribution and release of nickel from Nitinol wires. Biomater. 2009, v. 30, no. 4, p. 468 – 477.
21. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. Biomater. 2000, № 21, p. 667 – 681.
22. Eisenbarth E., Linez P., Biehl V. et al. Cell orientation and cytoskeleton organization on ground titanium surfaces. Biomolecular Eng. 2002, no. 19, p. 233 – 237.
23. Pareta R. A., Reising A.B., Miller T., Storey D., Webster Th.J. An understanding of enhanced osteoblast adhesion on various nanostructured polymeric and metallic materials prepared by ionic plasma deposition. J. Biomed. Mater. Res. A, 2010, v. 92, no. 3, p. 1190 – 1201.
24. Marleta J., Uptonac J., Langerbo R., Vacantica J.P. Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. Advan. Drug Delivery Rev., 1998, no. 3, p. 165 – 182.
25. Miller D.C., Haberstroh R.M. Webster T.J. Mechanism(s) of increased vascular cell adhesion on nanostructured poly(lactic-co-glycolic acid) films. J. Biomed. Mater. Res. A, 2005, v. 73, p. 476 – 484.

*Лотков Александр Иванович — Институт физики прочности и материаловедения СО РАН (г. Томск), доктор физико-математических наук, заместитель директора по научной работе. Специалист в области физики фазовых превращений, металловедения сплавов с эффектом памяти формы, наноструктурного материаловедения, физики поверхности и тонких пленок. E-mail: lotkov@ispms.tsc.ru.*

*Псахье Сергей Григорьевич — Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, доктор физико-математических наук, профессор, директор. Специалист в области компьютерного конструирования материалов. E-mail: sp@ms.tsc.ru.*

**Мейснер Людмила Леонидовна** — Институт физики прочности и материаловедения СО РАН (г. Томск), доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник. Специалист в области материаловедения сплавов с памятью формы, модификации поверхности. E-mail: l1m@ispms.tsc.ru.

**Матвеева Вера Александровна** — Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН (г. Новосибирск), кандидат биологических наук, научный сотрудник. Специалист в области биохимии, молекулярной биологии, клеточной инженерии. E-mail: vat@niboch.nsc.ru.

**Артемьева Людмила Владимировна** — Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН (г. Новосибирск), ведущий инженер. Специалист в области биохимии, молекулярной биологии, клеточной инженерии. E-mail: vat@niboch.nsc.ru.

**Мейснер Станислав Николаевич** — Институт физики прочности и материаловедения СО РАН (г. Томск), аспирант. Специалист в области материаловедения сплавов с памятью формы, растровой электронной микроскопии и оптической микроскопии. E-mail: msn@ispms.tsc.ru.

**Матвеев Андрей Леонидович** — Новосибирский национальный научно-исследовательский университет (г. Новосибирск), аспирант. Специалист в области молекулярной биологии, генной инженерии. E-mail: vat@niboch.nsc.ru.