

УДК: 576.5 – 57.085.23

© Малишкіна С.В., Дедух Н.В., Білоус В.А., Попова Н.Г., 2010

БАКТЕРИЦИДНІ ЯКОСТІ ПОКРИТТІВ НА ОСНОВІ ДІОКСИДУ ТИТАНУ ТА ЇХ БІОСУМІСНІСТЬ (дослідження *in vitro*)

Малишкіна С.В., Дедух Н.В., Білоус В.А.*, Попова Н.Г.

ДУ "Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка АМНУ"; *Харківський фізико-технічний інститут НАН України

Малишкіна С.В., Дедух Н.В., Білоус В.А., Попова Н.Г. Бактерицидні якості покриттів на основі діоксиду титану та їх біосумісність (дослідження *in vitro*) // Український морфологічний альманах. – 2011. – Т. 9, № 1. – С. 78-81.

В роботі представлені результати досліджень *in vitro* титанових зразків із покриттям. Встановлено, що покриття із діоксиду титану виявляють бактерицидні властивості. Високі показники проліферативної активності фібробластів, культивованих в присутності зразків, та незначна кількість деструктивних клітин характеризують покриття як біосумісні та не токсичні.

Ключові слова: покриття, титан, бактерицидність, біосумісність.

Малишкіна С.В., Дедух Н.В., Білоус В.А., Попова Н.Г. Бактерицидные качества покрытий на основе диоксида титана и их биосовместимость (исследование *in vitro*) // Український морфологічний альманах. – 2011. – Т. 9, № 1. – С. 78-81.

В работе представлены результаты исследований *in vitro* титановых образцов с покрытием. Установлено, что покрытия из диоксида титана выявляют бактерицидные свойства. Высокая пролиферативная активность фибробластов, культивированных в присутствии образцов, и незначительное количество деструктивных клеток характеризуют покрытия как биосовместимые и не токсичные.

Ключевые слова: покрытия, титан, бактерицидность, биосовместимость.

Malyshkina S.V., Deduch N.V., Belous V.A., Popova N.G. Bactericidal property of covering on base dioxide titan and its biocompatibility (investigation *in vitro*) // Український морфологічний альманах. – 2011. – Т. 9, № 1. – С. 78-81.

Results of investigation *in vitro* of the titan implants are described. It is determined, that coating with dioxide titan has got bactericidal property. The coating on titan implants are biocompatibility and no toxically, as showed on base investigation of fibroblasts proliferation activity and calculation destructive cells.

Key words: titan, coating, bactericidal, biocompatibility.

Вступ. Проблема попередження та боротьби з інфекційними ускладненнями після проведення реконструктивно-відновних операцій на кістяку з використанням металевих фіксуючих засобів залишається і до теперішнього часу для ортопедії і травматології актуальною і значущою [3, 7, 10]. Створення антибактеріальних покриттів, які б не тільки пригнічували запальну реакцію чи інфекцію у зоні імплантації, але й оптимізували остеорепаративний процес – є одним із важливих завдань фахівців-матеріалознавців та ортопедів-травматологів. Спеціалістами Харківського фізико-технічного інституту НАНУ було розроблено покриття на титанові поверхні із діоксиду титану, яке виявляє бактерицидну дію після опромінення зразків із покриттям рентгенівськими променями [1,4].

Мета роботи – дослідити бактерицидні властивості та біосумісність створеного нового покриття на титанові імплантати.

Матеріал та методи. Матеріалом служили зразки титану покриті оксидною плівкою (TiO_2) із введенням у покриття іонів Cr^{+} , Mo^{+} ; чисте покриття із TiO_2 ; та титан без покриття у вигляді стержнів (довжина 50 мм, діаметр основи – 3 мм) та дисків – діаметром основи 10 мм і висотою – 2 мм.

Виконані бактеріологічні дослідження в культурі зі штамом *St. aureus* (штам №209) та цитологічні - у культурі фібробластів шурів.

Культури мікроорганізмів *St. aureus* засівали у чашки Петрі у кількості 1×10^9 мікроорганізмів на чашку на мясопептонний агар. Досліджувані зразки після рентгенівського опромінення (режим рентгенологічного обстеження) розміщували у чашки Петрі з засіяною культурою *St. Aureus*. Культивування виконували у термостаті при температурі 37°C впродовж 5 діб. Використане рентгенівське опромінення є джерелом додаткової енергії, котра використовується для підсилення виходу вільних електронів із кристалічної решітки діоксиду титана. Вільні електрони та їх вакансії реагують із молекулами кисню та води і

утворюють радикали кисню та гідроксильної групи, які є сильними окислювачами, здатними окислювати майже всі органічні речовини, в тому числі віруси та бактерії [1].

Біосумісність нових покриттів досліджували за реакцією культивованих (разом із зразками) фібробластів. Використана первинна культура фібробластів, одержаних із підшкіряно-жирової клітковини лабораторних щурів. Культивували фібробласти за методом моношарової культури у живильному середовищі (20 мл середовища DMEM (Sigma), 2 мл 10% ембріональної телячої сироватки (Sigma), 80 U/мол пеніциліну, 100мг/мол стрептоміцину) в умовах 95 % вологості в атмосфері 5 % CO_2 впродовж 1, 3 та 5 діб при 37°C . Зразки досліджуваних біоматеріалів після стерилізації розміщували на покривних скельцях (25x25 мм) у чашках Петрі (діаметром 35 мм) із живильним середовищем, куди висівали клітини.

Вивчали проліферативну активність культивованих клітин, враховуючи загальну кількість клітин на зразках, відсоток деструктивних та мертвих клітин; адгезію культивованих клітин до поверхні зразків за кількістю прикріплених клітин у різні терміни культивування; цитологію (структурну організацію) клітин, наявність мітозів та патологічні мітози, збереження клітинами фенотипу.

Для дослідження проліферативної активності культивовані клітини (висівна концентрація $10000/\text{cm}^2$) знімали із поверхні досліджуваних зразків 0,25% розчином трипсин/версен (у відношенні 1:2) через 1, 3 та 5 діб. Суспензію клітин промивали фосфатним буфером і доводили об'єм суспензії до 1 мл. В одержаній суспензії, використовуючи камеру Горяєва, визначали загальну кількість клітин та число деструктивних - при фарбуванні трипановим синім (розчин із об'ємною часткою 0,1 %). Враховували специфічну особливість барвника проникати через ушкоджену клітинну мембрану і накопичуватися у цитоплазмі загинувших клітин, які при цьому стають темними [5]. Визначали також мітотичну активність за кількістю

мітозів на 1000 клітин (%о - проміл) на скельці та наявність патологічних мітозів [6].

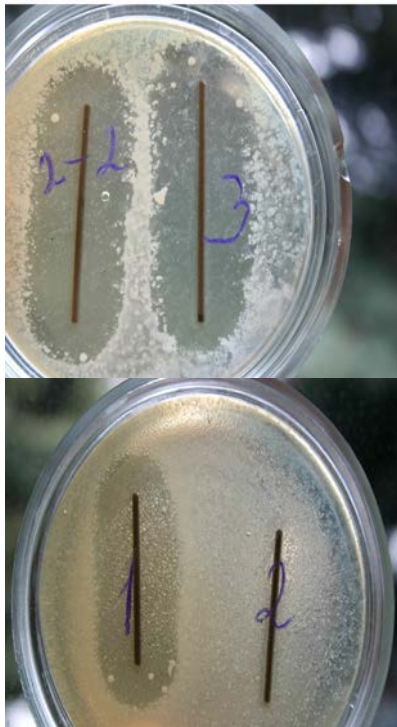


Рис. 1. - Чашки Петрі із засіяною культурою *St. Aureus*. Ділянки просвітління (зони затримки росту мікроорганізмів) навколо зразків із покриттями - TiO_2+Cr+ ; $TiO_2 + Mo$ та TiO_2 . Відсутність зони просвітління навколо титанового зразка. Перша доба культивування.

Для оцінки адгезії клітини у кількості 60000/см² висівали на поверхню металевих зразків. Клітини на зразках витримували у живильному середовищі впродовж – 15, 25 та 35 хв. Як відомо, при культивуванні клітин у нормальних умовах, переважна більшість клітин впродовж вказаного терміну прикріпляється до поверхні, на якій вони культивуються. За термінами дослідження клітини знімали зі зразків 0,25 % розчином трипсин/версен та визначали кількість клітин у камері Горяєва, використовуючи барвник кристалвіолет [5].

Таблиця 1. Діаметри (М + m) затримки росту *St. aureus* навколо зразків титану із різними покриттями (мм)

Досліджувані зразки титану із різними покриттями	1 доба	3 доба	5 доба
Титан без покриття (№1)	0	0	0
Покриття із TiO_2 (№2)	6,2 ± 0,38	9,1 ± 0,76 p < 0,01	8,6 ± 0,65 p < 0,05
Покриття із $TiO_2 + Cr$ (№3)	8,7 ± 0,46 P ¹ < 0,05	13,4 ± 1,14 p < 0,001; P ¹ < 0,01	12,9 ± 1,23 p < 0,001; P ¹ < 0,01
Покриття із $TiO_2 + Mo$ (№4)	9,3 ± 0,81 P ¹ < 0,05	14,6 ± 1,09 p < 0,001; P ¹ < 0,001	14,1 ± 1,19 p < 0,001; P ¹ < 0,001

P – вірогідні відмінності від показників першої доби культивування; P¹ – вірогідні відмінності від показників зразків із покриттям TiO_2 у даний термін дослідження.

Результати досліджень культури фібробластів. Цитологічні дослідження клітин у культурах зі зразками (5 доба).

При порівняльному цитологічному дослідженні стану культивованих клітин у культурах із металевими зразками та різними покриттями, а також у контрольній культурі (без покриття) відмінностей у топографії розташування клітин на скельцях, фенотипі клітин та структурній організації не було виявлено. Клітини фібробластичного диферону на скельцях навколо досліджуваних зразків мали чіткі контури і

дослідження структурної організації клітин виконували на 5-у добу культивування. Для цього клітини на скельцях (для загальної оцінки їх стану) після видалення із чашок Петрі зразків біоматеріалів, фіксували у розчині крижаної оптової кислоти та метилового спирту у співвідношенні 1:3 і фарбували азур-еозинум за методом Романовського. Досліджували наступні показники - форма клітин, цілісність клітинної мембрани, структура ядер (пікноз, каріорексис, лізис) і цитоплазми (вакуолізація цитоплазми), деструкція клітин. Дослідження клітин на скельцях проводили з використанням світлового мікроскопа MICROS. Препарати фотографували за допомогою цифрової фотокамери Canon EOS -300D. Отримані кількісні дані були оброблені методом варіаційної статистики з використанням прикладного пакета Statistica 5.11 for Windows, а рівень вірогідності прийнятий 95%.

Результати бактеріологічних досліджень: У чашках Петрі із культурою *St. aureus* на всі терміни дослідження навколо зразків із покриттями відмічали просвітління живильного середовища, що вказує на затримку росту мікроорганізмів (рис. 1).

Через одну добу культивування діаметри затримки росту *St. aureus* навколо зразків із покриттями TiO_2 +хром та TiO_2 +молібден статистично не відрізнялись і були більшими на 28,7 % та 33,4 % за показники зразків із покриттям чистого оксиду титану (табл.1). Навколо зразка № 4 - затримки росту *St. aureus* не було зафіксовано. Через 3 доби діаметри затримки росту мікроорганізмів для зразків № 1 - № 3 дещо збільшились, проте і на цей термін показники діаметрів затримки росту мікроорганізмів навколо зразка № 3 (чистий оксид) був вірогідно меншим за зразки із покриттями, у склад яких було введено іони хрому та молібдену, відповідно на 32,1 % та 37,7 % (табл.1).

Через 5 діб діаметри зон росту мікроорганізмів, практично, не змінились, проте спостерігалась тенденція до зменшення показників діаметрів затримки росту *St. Aureus*.

Отже, наявність ділянок затримки росту *St. Aureus* навколо досліджуваних зразків впродовж 5-и діб спостереження свідчить про наявність у зразків бактеріцидних якостей.

формували нашарування різної щільності (рис. 2. А, Б, В, Г). Місцями виявлялись невеликі скупчення клітин. На периферії клітинного шару щільність клітин була незначною - спостерігались поодинокі клітини. Клітини мали переважно овальну форму. Відмічені і продовгуваті клітини з тонкими довгими відростками, за рахунок котрих клітини контактували між собою. Цитоплазма клітин займала значну територію, вона була забарвлена слабо оксифільно. Ядра клітин мали чітку мембрану, були гіперхромними, мали округлу форму. В них виявлялось 1- 2 ядериця. На

периферії клітинних пластів на скельцях (зі всіма зразками) відмічені поодинокі клітини з пікнотичними ядрами та вакуолізованою цитоплазмою. У ділянках із незначною щільністю клітин спостерігалися клітини з різними фігурами мітозу. Патологічних мітозів у культурах всіх зразків не було зафіксовано. Мітогічний індекс для зразків № 1 - № 4 становив – 9 %; 13 %; 10% та 15%, що вказує на дещо різну

проліферативну активність клітин у культурах із різними зразками. Найвищий показник мітогічного індексу встановлено для діоксидного покриття із молібденом. Саме висока проліферативна активність клітин у культурі із даним зразком обумовила найвищі показники кількості клітин у культурі на 3 та 5 добу культивування (табл.2).

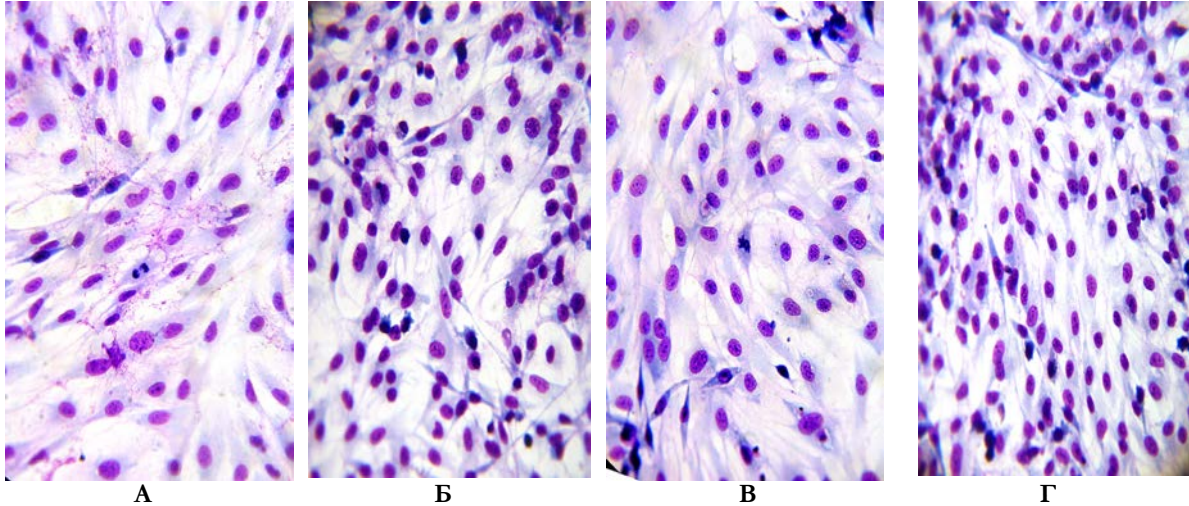


Рис. 2. – Ділянки клітин фібробластичного диферону, культивованих із титановими зразками із різними покриттями: А – титан; Б – діоксиду титану; В – діоксиду титану з хромом; Г – діоксиду титану з молібденом. 5 доба. Азур-созин. Зб.100.

Визначення приросту клітин (проліферативної активності) у культурах із зразками за термінами спостереження. При дослідженні клітин, знятих зі зразків (концентрація при внесенні у живильне середовище була 10000/см²) встановлено, що їх кількість збільшувалась за термінами культивування (табл. 2).

Як свідчать дані таблиці, на першу добу культивування загальна кількість клітин знятих зі зразків та число деструктивних клітин вірогідно не відрізнялись. На 3-ю та 5-у добу відмічається зростання числа клітин на зразках. Проте для контрольного зразка (без покриття) не було встановлено вірогідного збільшення клітин на 3-ю добу, а на 5-у добу кількість клітин збільшилась на 28,1 % стосовно 1-ї доби.

Як свідчать дані таблиці, на першу добу культивування загальна кількість клітин знятих зі зразків та число деструктивних клітин вірогідно не відрізнялись. На 3-ю та 5-у добу відмічається зростання числа клітин на зразках. Проте для контрольного зразка (без покриття) не було встановлено вірогідного збільшення клітин на 3-ю добу, а на 5-у добу кількість клітин збільшилась на 28,1 % стосовно 1-ї доби.

Таблиця 2. Кількість клітин, знятих зі зразків на різні терміни культивування (n=5)

Зразки із покриттями	1 доба		3 доба		5 доба	
	Загальна кількість клітин	Мертві клітини	Загальна кількість клітин	Мертві клітини	Загальна кількість клітин	Мертві клітини
Зразок № 1 (титан -контроль)	137,7 ± 11,7	12,9 ± 1,1 9,4 %	148,7 ± 8,6 p > 0,05	16,8 ± 1,9 11,3 %	191,5 ± 12,3 p < 0,01	24,5 ± 3,1 12,8 %
Зразок № 2 з оксидом	131,4 ± 12,3 p ₁ > 0,05	9,6 ± 0,87 7,3 %	168,6 ± 11,5 p < 0,05; p ₁ > 0,05	17,2 ± 2,2 10,2 %	243,7 ± 11,9 P < 0,001; p ₁ < 0,05	28,3 ± 2,8 11,6 %
Зразок № 3 із хромом	141,7 ± 12,6 P ₁ > 0,05	12,5 ± 1,2 8,9 %	181,4 ± 11,9 p < 0,01; p ₁ < 0,05	21,3 ± 2,7 11,8 %	256,5 ± 13,4 p < 0,001; P ₁ < 0,01	34,8 ± 2,9 13,6 %
Зразок № 4 із молібденом	135,6 ± 10,6 P ₁ > 0,05	11,8 ± 1,8 8,7 %	208,1 ± 13,3 p < 0,01; p ₁ < 0,01 p ₂ < 0,01	16,1 ± 2,5 8,3 %	289,4 ± 12,9 p < 0,01; p ₁ < 0,001 p ₂ 0,01	27,1 ± 3,5 9,4 %

P – статистичні відмінності у кількості клітин на досліджуваних зразках від показників першої доби культивування. P₁ – статистичні відмінності у кількості клітин на зразках у порівнянні з показниками контролю. P₂ – статистичні відмінності кількості клітин між показниками зразків з покриттям із іонами молібдену від покриття з оксидом титану.

Для інших зразків вірогідне збільшення клітин спостерігалось вже на 3-ю добу. Найбільшим воно було в експерименті з покриттям та іонами молібдену. Так, якщо зростання кількості клітин (від першої доби до третьої) для зразків № 2 та 3 становило 22,2 % та 21,5 %, то для зразка із молібденом воно досягло 29,6 %. Подібна залежність відмічена і на 5-у добу. Кількість клітин збільшилась (відносно першої доби) на 46,1 %, на 44,8 % та на 53,2 %, відповідно для зразків № 2 – 4. Найменша кількість клітин на зразках, відповідно і найменша проліферативна активність клітин, була зафіксована для контрольного зразка, а найбільша кількість клітин і, відповідно, найвища проліферативна активність спостерігалась на зразку № 4. Відносно контролю кількість клітин на зразку

№ 4 на 5-у добу була більшою на 33,8 %. Різні кількості клітин на зразках за термінами дослідження може свідчити про різні темпи проліферації клітин або різну кількість деструктивних та мертвих клітин.

При порівнянні показників числа мертвих клітин для різних зразків між собою відмічено дещо вищий відсоток таких клітин на зразку № 3 - покриття з іонами хрому. Проте ці показники не перевищувала допустимих значень для первинних культур. Вірогідних відмінностей у кількості деструктивних клітин для всіх останніх зразків не було встановлено. Наявність приросту клітин за термінами дослідження та незначна кількість деструктивних і мертвих клітин вказує на практичну відсутність клітин, котрі відкріплялись від поверхні досліджуваних зразків.

Отже представлені у таблиці дані свідчать, що клітини, культивовані в присутності металевих зразків із різними покриттями, прикріплювались до зразків, були життєздатними і активно ділились. Спостерігалась незначна кількість деструктивних клітин, які забарвлювались трипановим синім. Одержані результати щодо цитології клітин у культурах зі зразками та щодо проліферативної активності клітин на зразках свідчать про біосумісність та не токсичність досліджуваних зразків із розробленими покриттями.

Визначення адгезії культивованих фібробластів до поверхні досліджуваних зразків. Кількість клітин, знятих зі зразків за термінами їх осідання на поверхню досліджуваного зразка, представлені у таблиці 3.

Як свідчать дані таблиці, найменш виражена адгезія клітин до поверхні досліджуваних зразків (за кількістю клітин, знятих зі зразків) була зафіксована для контрольного зразка без покриття на всі терміни дослідження (табл. 3). Через 15хв кількість клітин на

зразку із діоксидом титану була вищою за показники у контролі на 30 %, з показники зразка з молібденом (№ 4) перевищували контрольні значення на 42,2 %. Адгезія клітин на зразках із покриттям з іонами хрому не відрізнялась від контролю. Через 35 хв кількість клітин на зразках № 4 була вірогідно вищою за показники контрольного зразка та із розробленими покриттями (TiO₂ та TiO₂ з хромом), відповідно на 51,5 %, на 35,5 % та на 40,7 %.

В літературі є дані стосовно впливу на адгезію клітин (і, опосередковано, на остеointegraцію) матеріалу імплантата та топографії його поверхні [2, 9]. Приведені в літературі дані щодо впливу матеріалу імплантатів на прояви адгезії та проліферативної активності свідчать про те, що титан біосумісний матеріал і має хороші адгезивні якості, проте при порівнянні його з цирконієм - вказані якості більш виражені саме у цирконію [8].

Таблиця 3. Кількість клітин, знятих зі зразків на різні терміни

Досліджувані зразки	15 хв	25 хв	35 хв
	Кількість клітин	Кількість клітин	Кількість клітин
Зразок № 1	32,7 ± 3,1	47,4 ± 3,6	79,6 ± 6,8
Зразок № 2 TiO ₂	46,8 ± 3,9 p<0,05; p ₁ > 0,05	75,3 ± 6,1 p<0,05; p ₁ > 0,05	134,2 ± 9,1 p<0,01; p ₁ < 0,05
Зразок № 3 TiO ₂ з Cr	39,4 ± 3,5 p>0,05; p ₁ < 0,05	69,3 ± 5,4 p<0,05; p ₁ < 0,05	123,4 ± 7,9 p<0,01; p ₁ < 0,05
Зразок № 4 TiO ₂ з Mo	56,5 ± 5,1 p<0,05	95,8 ± 7,9 P<0,001	164,1 ± 10,2 p<0,001

p – статистичні відмінності у кількості клітин на зразках від показників контролю; p₁ – статистичні відмінності у кількості клітин на зразках від показників зразка із молібденом.

Біоактивні керамічні матеріали – трикальційфосфат та гідроксиапатит також перевищують титан за біосумісністю [2, 11]. Дослідження зразків із модифікованим покриттям діоксиду титану свідчать, що введення у склад покриття іонів хрому та молібдену позначається на їх властивостях – проліферативна активність клітин та їх адгезія були найбільш вираженими у культурах зі зразками із покриттям, де введені іони молібдену.

Висновок: розроблені покриття із діоксиду титану із додаванням іонів хрому та молібдену виявляють бактерицидні властивості, а за високими показниками проліферативної активності клітин на зразках та незначною кількістю загинувших клітин характеризуються як біосумісні та не токсичні. Покриття характеризуються хорошими адгезивними якостями.

Робота підтримана Грантом Євросоюзу № 4231.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Белоус В.А. Фотокаталитические покрытия на основе диоксида титана [Текст] / В.А. Белоус, И.В. Залывадная // Физика и химия обработки материалов. – 2006. – №1. – С.31-35.
2. Карлов А.В. Остеоиндуктивные, остеокондуктивные и электрохимические свойства кальцийфосфатных покрытий на титановых имплантатах и влияние их на минеральный обмен при переломах трубчатых костей в эксперимента [Текст] / А.В. Карлов, В.И. Верещагин, В.П. Шахов // Гений ортопедии. – 1999. – № 4. – С. 28 – 33.
3. Кузин В.В. Профилактика и лечение гнойных осложнений при первичном эндопротезировании тазобедренного и коленного суставов [Текст] / В.В.Кузин, В.К.Зуев, Ю.С.Володин, А.Ф.Маздыков, С.С. Шевченко // Ортопед, травматол. — 2003. — №4. — С. 162-169.
4. Малишкіна С.В. Дослідження in vitro біосумісності нових антибактеріальних покриттів для ортопедичних

імплантатів [Текст] / С.В. Малишкіна, В.А. Білоус, І.В. Вишнякова, О.В. Шевцова // Збірник наукових праць XV з'їзду ортопедів-травматологів України. - 2010. - С. 34.

5. Методические рекомендации по получению, культивированию и использованию в научных и производственных ветеринарных лабораториях первичных, перививаемых и диплоидных культур клеток живого происхождения. - М. – 1978.-30 с.
6. Методические рекомендации по криоконсервированию и цитологическому контролю качества культур клеток и фрагментов ткани. - Харьков: НИИ экспериментальной ветеринарии. - 1981. - 27 с.
7. Поспелов А.С. Профилактика возникновения воспалительных осложнений при наружном чрескостном остеосинтезе бедра [Текст] / А.С.Поспелов, А.Я.Лобко, В.Ю.Черныш, В.П.Танцюра // Клиническая хирургия. - 1998.-№2.- С. 553-554.
8. Biasotto M. Porous titanium obtained by a new powder metallurgy technique. Preliminary results of human osteoblast adhesion on surface polished substrates [Text] / M. Biasotto, R. Ricceri, N. Scuor [et al.] // J. Appl. Biomater. Biomech. - 2003. -№1. - P. 172-177.
9. Eisenbarth E. Interactions between cells and titanium surfaces [Text] / E. Eisenbarth, K. Schenk-Meuser [et al.] // Biomolecular Eng. - 2002. - № 19. -P. 243-249.
10. Garvin K.L. Infection after total hip arthroplasty. Past, present, and future [Text] / K.L. Garvin, A.D. Hanssen // J. Bone J. Surg. - 1995. - Vol 77A. - № 10. - P. 1576 – 1588.
11. Santin M. Calcium-binding phospholipids as a coating material for implant osteointegration [Text] / M. Santin, W. Rhys-Williams, J. O'Reilly [et al.] // J. R. Soc. Interface. – 2006. – Vol. 3. – P. 277–281.

Надійшла 02.10.2010 р.
Рецензент: проф. В.І.Лузін