

9. Андреевский Р. А. Материаловедение гидридов. – М.: Металлургия, 1986. – 128 с.
10. Лавренко В. А. Кинетика процессов в гидридных системах / В. А. Лавренко, М. М. Антонова, В. Ж. Шемет. – К.: Наук. думка, 1992. – С. 8–12.
11. Самсонов Г. В. Бор, его соединения и сплавы / Г. В. Самсонов, Л. Я. Марковский, А. Ф. Жигач, М. Г. Валяшко. – К.: Изд-во АН УССР, 1960. – С. 136.
12. Гидриды металлов / под ред. В. Мюллера, Д. Блэкледжа, Дж. Либовица. – М.: Атомиздат, 1973. – С. 283–290.
13. Осипова И. И. Оптимизация состава инструментальной нитридной керамики посредством триботехнических испытаний / И. И. Осипова, А. М. Ковальченко, Л. Л. Сартинская // Порошковая металлургия. – 1992. – № 4. – С. 46–51.
14. Зенков В. С. Адсорбционно-химическая активность исходных соединений и механизм взаимодействия составляющих в системе нитрид бора–гидрид титана / В. С. Зенков, А. В. Рагуля // Там же. – 2007. – № 5/6. – С. 102–110.
15. Скороход В. В. Теория физических свойств пористых и композиционных материалов и принципы управления их микроструктурой в технологических процессах // Там же. – 1995. – № 1/2. – С. 53–71.
16. Оделевский В. И. Расчет обобщенной проводимости гетерогенных систем // Журн. техн. физики. – 1951. – Т. 21, № 6. – С. 667–685.

Институт проблем материаловедения  
им. И. Н. Францевича НАН Украины, Киев

Поступила 14.07.10

УДК 621.373.826:621.762.53

**И. В. Шишковский,  
Ю. Г. Морозов, С. В. Фокеев, Л. Т. Волова**

**ЛАЗЕРНЫЙ СИНТЕЗ И СРАВНИТЕЛЬНОЕ  
ТЕСТИРОВАНИЕ ТРЕХМЕРНОГО ПОРИСТОГО  
МАТРИКСА ИЗ ТИТАНА И НИКЕЛИДА ТИТАНА  
КАК РЕПОЗИТАРИЯ ДЛЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

*Обговорено перспективи поширювального лазерного синтезу пористих тканинно-клітинних конструкцій (матриксів) з титану і нітинолу як репозитарію для стовбурових клітин. Дослідження проведено на первинних культурах дермальних фібробластів людини 4–18 пасажів. Культуру дермальних фібробластів отримано з шкірно-м'язової тканини абортусів терміном 6–10 тижнів методом первинних експлантів. Морфологічно вивчено роль поверхні пористих матриксів з даних матеріалів порівняно з литим стоматологічним титаном на умови клітинної адгезії і проліферації. Поверхневу микроструктуру і шорсткість проаналізовано засобами оптичної і скануючої електронної мікроскопії як до, так і після експериментів in vitro. Елементний аналіз дозволив визначити біохімічний склад пост-експериментальних пористих структур матриксів. Показано високий хемотаксис клітин до досліджених зразків і вплив складу матеріалу матриксу на розвиток культури клітин.*

**Ключові слова:** титан, нітинол, тканинно-клітинна конструкція, селективне лазерне спікання, остеointegraція, мультипотентні мізенхімні стромальні клітини, диференціювання, остеогенез, пористий матрикс.

© И. В. ШИШКОВСКИЙ, Ю. Г. МОРОЗОВ, С. В. ФОКЕЕВ, Л. Т. ВОЛОВА, 2011

## Введение

Инженерия тканей в настоящее время является широко развиваемым направлением регенеративной медицины, которое включает культивирование клеток *in vitro*, исследование биологии клетки, формирование и восстановление поврежденных или утраченных тканей, системы контроля и тестирования, а также синтез новых фармацевтических продуктов [1, 2]. В рамках данной концепции наиболее интересным является создание (стимуляция синтеза) тканей или органов *in vitro* путем клеточной имплантации на внеклеточном матриксе (ВМ).

По сравнению с обычным выращиванием клеток *in vitro*, тканево-клеточным конструкциям (ТКК) можно придавать строго индивидуальную для каждого пациента форму, которая не только выполняет функцию поддержки, но и определяет направление развития клеток во внеклеточном матриксе, способствует их искусственной дифференциации и образованию ткани. Такой революционный инженерный подход к синтезу тканей *in vitro* соответствует их естественному развитию *in situ* [3–7].

При этом насущной потребностью дня в репаративной хирургии является стремление к замене литых имплантационных материалов пористыми конструкциями (матриксами), имеющими форму заменяемого органа (кости), для восстановления дефектных участков. Известно, что топография пористой поверхности, в сравнении с гладкой, влияет на морфологические особенности поведения клеток, а на пролиферации клеток сказывается синергетическое влияние топографии микро- и наномасштаба [8, 9]. Сложность задачи состоит еще и в том, что клеточный матрикс должен обладать биопсийными свойствами по всей структуре пор, куда будет прорастать по мере своего развития клеточная масса и синтезироваться *in vitro* новая ткань. В качестве материала матриксов могут быть использованы различные вещества. Изначально предпочтение отдавали биологически инертным, то есть нетоксичным и устойчивым к биохимическим воздействиям организма материалам (титану, керамике и др.).

Использованию титана в медицине посвящено огромное количество публикаций, в которых показаны его биоинертность, причем увеличение содержания титана в организме на несколько порядков не оказывает аллергенного, канцерогенного или токсического воздействия [10–17]. В частности, не обнаружено цитотоксического эффекта при взаимодействии пористого титана с культурой клеток костного мозга. Большой интерес представляют биоактивные пористые деградируемые материалы, в составе которых используется гидроксиапатит (ГАП) [18–25]. Эти материалы сохраняют достаточную механическую прочность в процессе их замещения костной тканью. Однако в реальности восстановление естественной структуры кости часто не успевает за деградацией такого искусственного матрикса.

Нитинол (интерметаллидная фаза — NiTi) является еще одним перспективным материалом для имплантации, поскольку обладает уникальной комбинацией свойств (присущих ему даже в пористом состоянии), включая эффект памяти формы (ЭПФ), высокую прочность и коррозионную устойчивость [9, 24, 26–39]. Более того, открытая пористость облегчает прорастание соединительных тканей в имплант, улучшая, таким образом, прочность соединения имплант–кость. Несмотря на тот факт, что сплавы на основе никелида титана не подвергаются заметной коррозии (поскольку

при пассивации в биологических жидкостях на их поверхности образуется слой, содержащий небольшое количество никеля), проблему их биосовместимости нельзя считать решенной [37]. Ведь в состав этого интерметаллида входит около 50% (ат.) Ni. Известно, что никель является токсичным элементом, обладает аллергенной и канцерогенной активностью, и около 15% людей имеют повышенную чувствительность к нему. Этот металл в виде ионов  $Ni^{2+}$  оказывает сильное хемотаксическое действие на клетки организма и является биокатализатором, ускоряющим процесс деструкции протеинов плазмы крови. При имплантации никеля в организм достоверно установлены канцерогенная активность ионов  $Ni^{2+}$  и широкая зона воспалительных процессов, связанных с растворением никеля в тканевых жидкостях.

Технология быстрого прототипирования (Rapid Prototyping and Manufacturing) имеет неоспоримый медицинский потенциал благодаря возможности создания индивидуальных имплантатов с заранее определенной внутренней и(или) внешней формой поверхности. Преимуществом метода селективного лазерного спекания (СЛС), относящегося к данной технологии, является создание функциональных имплантов по данным трехмерной компьютерной томографии без лишних операций формирования литьевых форм [1, 2, 10–11, 15–17, 23, 25, 40–51]. Контролирование и дизайн внутренней структуры поровых каналов еще на стадии компьютерного моделирования позволяет интенсифицировать прорастание соединительных тканей в пористый матрикс, увеличить площадь соприкосновения (следовательно, и механическую прочность) между имплантом и костью. Пористые каналы могут быть насыщены лекарственными препаратами для активации процесса вживления, предотвращая некроз клеток [1, 6].

Цель настоящей работы — изучить свойства пористого имплантационного материала из титана, нитинола, в том числе с добавлением в эти материалы гидроксиапатита в качестве трехмерного матрикса для стволовых клеток, по сравнению с литым титаном, традиционно используемым в стоматологии. Представлены результаты клеточной адгезии, пролиферации, дифференциации для трехмерных пористых тканево-клеточных матриксов (scaffolds) из этих материалов, наряду с результатами исследования клеточной морфологии методами оптической и сканирующей электронной микроскопии.

### Материалы и оборудование

Порошки нитинола ( $NiTi$  фаза >99,7% (мас.)) марки P55H45 и титана ( $Ti$  > 98,1% (мас.)) марки ПТОМ приобретали в фирме “Полема” (Тула, Россия). Перед лазерным спеканием порошки предварительно просушивали в вакуумном шкафу 2 ч при 300 °С. В ряде наших опытов для повышения биосовместимости в данные порошки добавляли гидроксиапатит марки ГАП-85д (Интермедпатит, Москва). Для тестового сравнения был использован литой титан фирмы “Рема”, широко используемый в стоматологии. Дисперсность всех исходных порошков составляла ~100 мкм (чтобы быть соизмеримой с диаметром пятна лазерного излучения) и контролировалась ситовым анализом. В результате лазерного спекания для биологических испытаний формировали трехмерные плоские пористые образцы матрикса размером ~10 мм × 10 мм с толщиной монослоя ~0,5–1 мм в зависимости от режима лазерного спекания. На рис. 1, а показан внешний вид пористого матрикса из титана, а на рис. 1, б — пористый тканево-клеточный

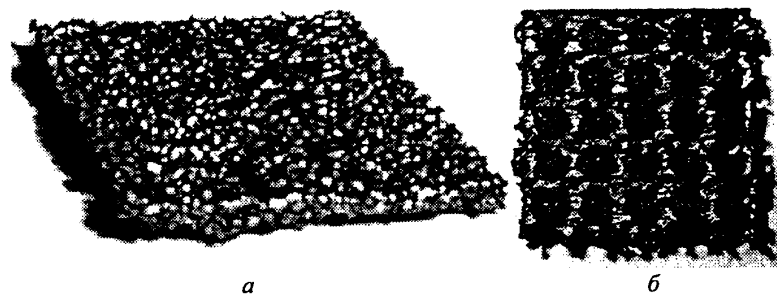


Рис. 1. Внешний вид тканево-клеточных каркасов размером 10 мм × 10 мм:  
*а* — титан, вид сбоку, хаотичная пористость; *б* — нитинол, вид сверху, регулярная пористость

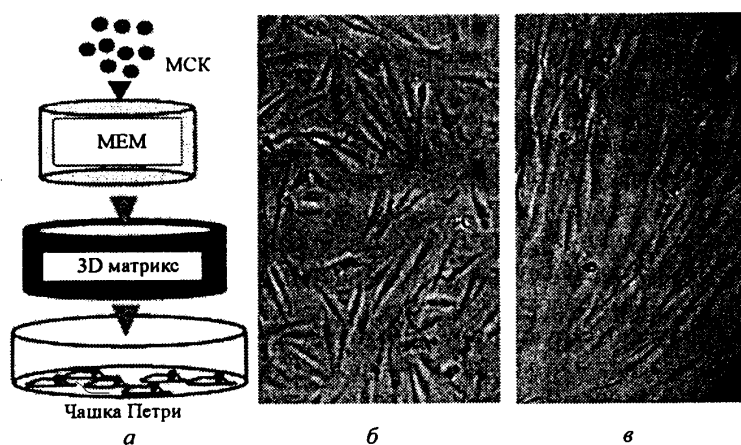


Рис. 2. Схема эксперимента (*а*) и первичная культура клеток эмбриона человека:  
*б* — мезенхимальные стромальные клетки из крыши черепа; *в* — дермальные фибробласты; нативные препараты; ×150

каркас сотового типа из нитинола, структура которого была предварительно спроектирована на компьютере.

Морфологическое исследование проводили в Центральной научно-исследовательской лаборатории Самарского государственного медицинского университета (Россия) на первичных культурах дермальных фибробластов человека 4<sup>го</sup>–18<sup>го</sup> пассажей. Культуру дермальных фибробластов получали из кожно-мышечной ткани абортусов сроком 6–10 недель методом первичных эксплантатов. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) культивировали в стандартных условиях: термостат “Sanyo-Incubator MIR-262”, температура 37 °С, при влажности 100%, с 5%-ным содержанием CO<sub>2</sub>, среда α-MEM (минимальная среда Игла) с 10%-ной эмбриональной телячьей сывороткой, пластиковые культуральные флаконы “Orange Scientific” (Бельгия) и “Corning” (США), площадь 25 см<sup>2</sup>. Тестирование производили в культуральных чашках Петри (Sarstedt) диаметром 3 см.

Опыты осуществляли методом прямого контакта и в двух вариантах (рис. 2, *а*): 1) фибробласты пересеивали из культурального флакона на чашки Петри и культивировали в течение 24 ч (за этот промежуток времени

формировался монослой клеток плотностью  $\sim 315$  клеток/ $\text{мм}^2$ , на который помещали образец исследуемого материала); 2) в культуральные чашки высевали фибробласты и одновременно помещали исследуемый материал. При посеве доза клеток (во всех случаях) оставалась неизменной ( $2 \times 10^4$  клеток/ $\text{см}^2$ ). Контролем и в том, и в другом случае служили: чашки Петри с полной ростовой средой и образцами исследуемого материала, в которые не высевали фибробласты; чашки Петри с культурой фибробластов, которые пассировали и наблюдали одновременно с экспериментальными, но не подвергали никакому воздействию. Для набора статистики в каждом варианте исследований использовали по 5 образцов. Клетки в присутствии исследуемого материала культивировали на протяжении 4–6 сут.

Нативную культуру изучали, морфометрировали и фотографировали с помощью инвертированного микроскопа “Биолам П-2-1” при 100- и 150-кратном увеличении. Окраску материала проводили гематоксилинэозином. Ежедневно визуально наблюдали и морфометрировали нативную культуру. Визуально оценивали целостность монослоя, наличие слущенных (погибших) клеток в культуральной жидкости, форму и размеры клеток, оценивали цитотоксический эффект, эффективность прикрепления и пролиферации. При пересеве забирали из экспериментальных и контрольных флаконов культуральную среду, в которой микробиуретовым методом определяли содержание общего белка, свободного и белковосвязанного оксипролина [52]. Статистическую обработку проводили с использованием параметрических и непараметрических критериев оценки достоверности.

Анализировали структуру порового пространства, химический состав спеченных образцов как до, так и после экспериментов *in vitro*. Использовали методы оптической, сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (LEO 1450, “Carl Zeiss”, с приставкой для микрорентгеноспектрального анализа (EDX-Energy Dispersive X-ray Microanalysis) “INCA Energy 300”, “Oxford Instruments”). Для изучения организации клеточного слоя на поверхности матрикса методом СЭМ образцы материалов с клетками фиксировали в 2,5%-ном растворе глутарового альдегида, обезвоживали и высушивали в критической точке на аппарате “Hitachi HCP-2”.

### Результаты исследования и их обсуждение

**Стерилизация материала.** Обычно в нормальной первичной культуре фибробласты имеют вытянутую форму, 2–4 отростка, гомогенную цитоплазму; границы клеток четкие, ядро расположено, как правило, эксцентрично, содержит 1–3 ядрышка (рис. 2, б, в). В контроле клетки, находившиеся на покровных стеклах в центре чашек Петри, за срок наблюдения равномерно пролиферировали и мигрировали на дно чашки по всему периметру. Преобладающими элементами являются “округлые” клетки, которые трансформируются в различные клеточные линии (косы).

Первым этапом работы была отработка методики стерилизации полученного материала. Так как пористый матрикс поступал на исследование не стерильным, он был обработан согласно правилам обработки хирургического инструментария, то есть замочен на 1 сут в растворе хлорамина, а затем тщательно вымыт, высушен и простерилизован в сухожаровом шкафу при 200 °С в течение 3 ч. Несмотря на это, во всех чашках, содержащих образцы однократно обработанного материала (как в опытных с культурой фибробластов, так и в контрольных), уже через 24 ч наблюдали рез-

Рис. 3. Отломанные края образца из никелида титана (NiTi) на монослое фибробластов; бактериальное загрязнение чашки после однократной стерилизации исследуемого материала; слущенные клетки; 4 сутки эксперимента; гибель клеток;  $\times 150$



кое помутнение ростовой среды, изменение ее pH в кислую сторону (до 4,5–4,8) и массивное слущивание клеток в среду (рис. 3). Это свидетельствовало о значительном бактериальном загрязнении образцов, которое не удалось ликвидировать общепринятой обработкой и стерилизацией.

В связи с этим мы вынуждены были подвергнуть образцы трехкратному циклу стерилизации. В этом случае образцы, находившиеся в термостате в полной ростовой среде, уже не вызывали роста бактериальной флоры.

*Количественная оценка клеточной адгезии и пролиферации.* Статистическая обработка результатов морфологического анализа стволовых клеток к синтезированным методом СЛС пористых матриксов выглядит следующим образом. На рис. 4 представлен характер адгезии остеобластов вблизи поверхности пористого матрикса по дням испытаний. Линия контроля характеризует поведение фибробластов в ростовой среде без внешнего воздействия. Ей практически не уступает плотность фибробластов у поверхности нитинола по первому варианту исследований. В основном, все образцы стимулируют пролиферацию фибробластов. От начальной плотности  $\sim 315$  клеток/ $\text{мм}^2$  везде наблюдается удвоение и утроение популяции клеток, что свидетельствует об эффективности их адгезии к поверхности образцов.

Число погибших клеток (рис. 5) также минимально для NiTi (вариант 1). Неплохой результат показывает матрикс из пористого титана (вариант 1).



Рис. 4. Плотность монослоя вблизи образца по дням эксперимента:

здесь и далее на рис. 5, 6 в скобках у названия материала образца указан номер варианта опыта; вертикальными линиями обозначено расчетное среднее квадратичное отклонение от среднего



Рис. 5. Количество поврежденных клеток по дням эксперимента для исследованных материалов и вариантов эксперимента

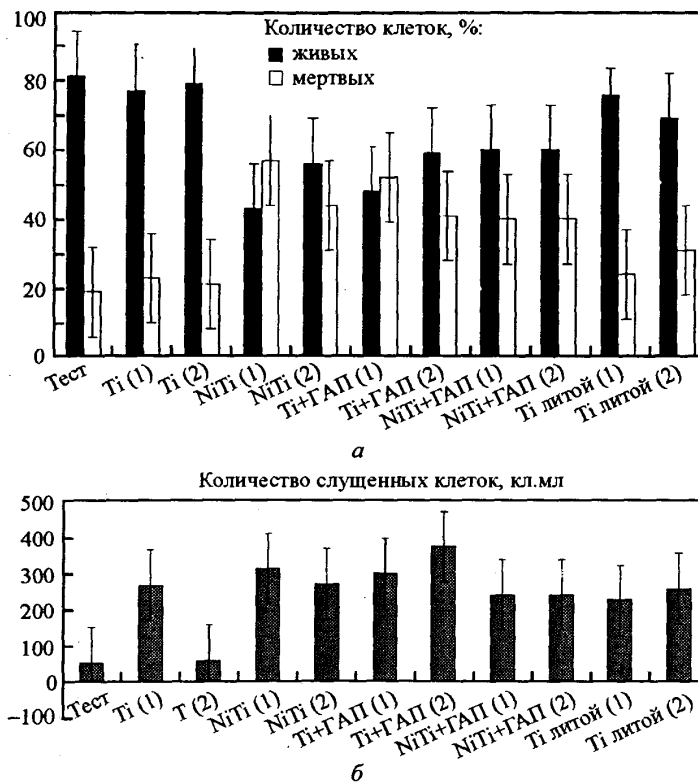


Рис. 6. Соотношение живых и мертвых клеток (а) и количество слущенных клеток (б) к концу эксперимента

При этом число погибших клеток здесь довольно значительно, но меньше, чем в остальных случаях. Массовую гибель клеток на вторые сутки исследования (характерный пик на рис. 5) мы связываем со стресс-реакцией при внесении образцов, их повреждением от такого внешнего воздействия. В

последующие дни происходило восстановление, и число погибших клеток уменьшалось. Важно отметить, что добавление гидроксиапатита существенно не сказывается на характере поведения фибробластов у поверхности пористого матрикса.

На рис. 6, *а* показано процентное соотношение количества живых и мертвых клеток к концу эксперимента. Число мертвых клеток (57%) незначительно, но превышает число живых (43%) лишь у матрикса из нитинола (вариант 1) и пористой конструкции Ti + ГАП (вариант 1). Между тем динамика роста стволовых клеток именно для этого случая была наиболее благоприятной. В остальных случаях количество живых клеток больше, чем количество мертвых. Наилучшие результаты, сопоставимые с контролем, — у титанового матрикса. Число слущенных клеток к концу эксперимента характеризует рис. 6, *б*. Общее число слущенных клеток минимально на контроле и в пористом титановом матриксе (вариант 2), наиболее же критично их количество у NiTi (вариант 1) и Ti + ГАП (вариант 2).

*Оптическая микроскопия распределения клеток.* Характерные микрофотографии поверхности контакта пористых матриксов, синтезированных методом СЛС, в основном на поздних (5–6 сут) стадиях эксперимента, представлены на рис. 7, *б–е*. Для сравнения на рис. 7, *а* показан образец пористого титана в первые сутки экспериментов. Следует отметить снижение плотности монослоя фибробластов в непосредственной близости от образца вследствие повреждения его отломившимися кусочками титана. Стволовые клетки имеют вытянутую форму, плотно упакованы и, как правило, располагаются параллельно поверхности. Однако уже на 5–6 сутки (рис. 7, *б*) наблюдается адгезия ММСК к экспериментальному материалу. Клетки выстраиваются и растут перпендикулярно в поры образца. Такая же

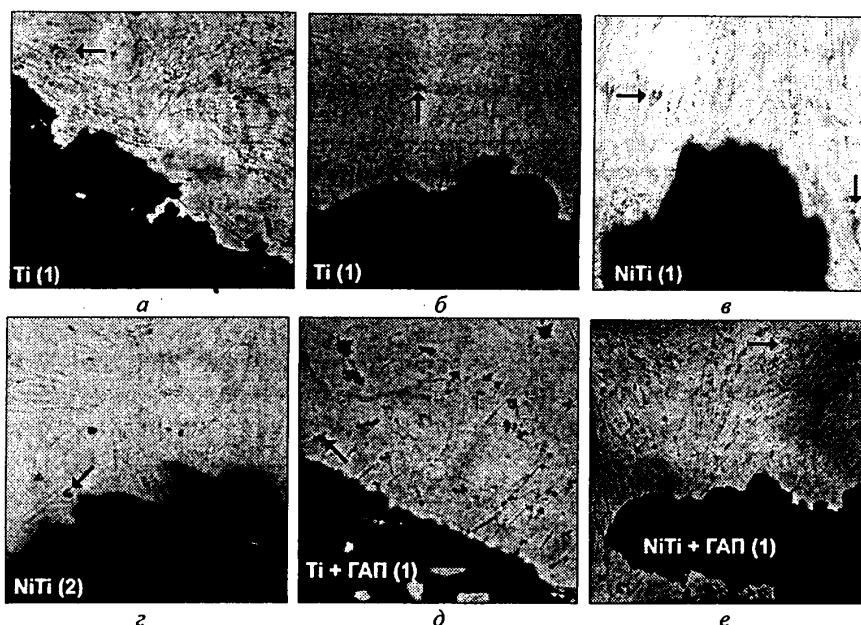


Рис. 7. Край образцов пористых матриксов на монослой фибробластов: в углу фото (черный цвет) видны тестируемые образцы; нативная культура; стрелками показаны примеры слущенных клеток; инвертированный микроскоп;  $\times 100$



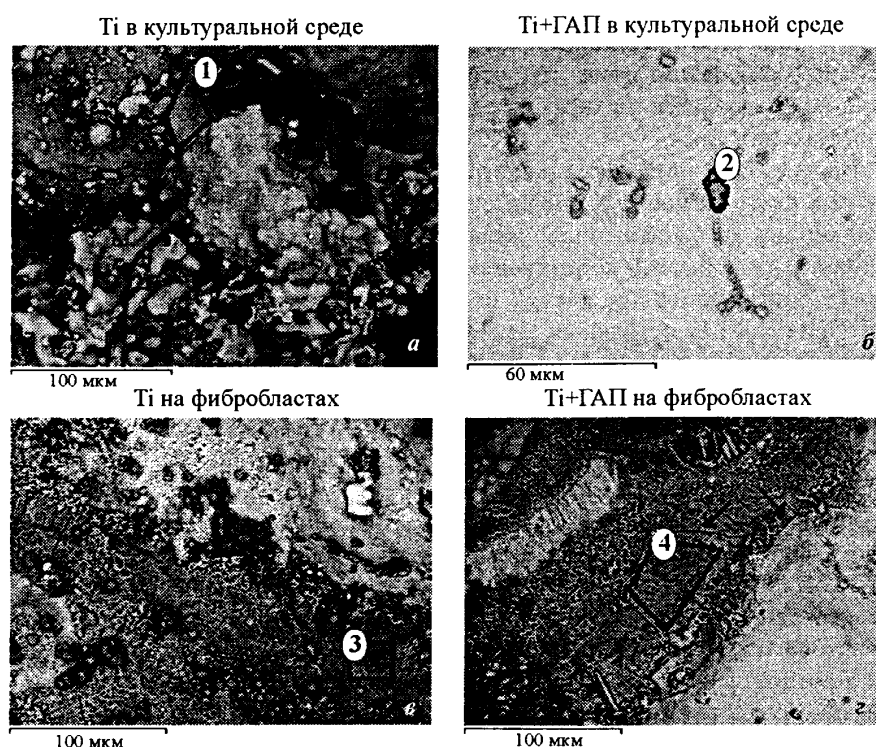


Рис. 8. Сканирующая электронная микроскопия фибробластов, фиксируемых на пористых титановых микроструктурах: здесь и далее на рис. 9, 10 контуром с цифрой отмечается участок, с которого проводился элементный микроанализ

Таблица 1

Элементный (EDX) анализ на участках поверхности титанового имплантата, отмеченных на рис. 8

Элемент	Содержание элементов, % (ат.), в точке			
	1 (рис. 8, а)	2 (рис. 8, б)	3 (рис. 8, в)	4 (рис. 8, г)
C	8,61	8,26	11,89	13,78
O	64,04	25,94	60,45	58,76
Na	—	21,16	—	1,65
Al	0,91	1,48	0,74	1,00
P	—	0,56	0,76	0,72
Cl	—	11,56	0,29	0,82
Ca	0,58	0,49	11,59	9,68
Ti	25,86	30,56	14,28	13,59

картина имеет место и для нитинола (рис. 7, в) на 5 сутки. Плотность клеток вблизи образца не так велика; следует отметить некоторое количество слущенных клеток (обозначено стрелками). На рис. 7, г показана нативная структура фибробластов у поверхности нитинола (вариант 2) на 6 сутки экспериментов. Косы фибробластов располагаются как перпендикулярно, так и наклонно к поверхности матрикса. Добавление ГАП увеличивает

хрупкость краев матрикса (см. об этом при обсуждении рис. 8, з). На рис. 7, д видны кусочки, отколовшиеся от образца. Но пролиферативная активность ММСК, особенно в случае с NiTi + ГАП, очень высока, судя по ориентации кос пролиферирующих клеток.

В процессе культивирования было установлено, что к 5–6 суткам доминирующей популяцией являются фибробластоподобные элементы, далее в количественном составе преобладают элементы того дифференцировочного фактора, который был добавлен. После этого отдельные очаги, с характерным прикреплением к стенкам пор титана или нитинола, сливаются и формируют в порах клеточный монослой. При культивировании *in vivo* ранее нами уже отмечалось стабильное возрастание хондрогенных и остеогенных элементов в порах титана и никелида титана [40]. Колонии остеобластов в порах никелида титана формируют соответствующий хондроили костный матрикс.

Для литого образца был зафиксирован рост клеток преимущественно около дефектов шлифовки. Фибробласты концентрировались по направлению к титану. К концу эксперимента наблюдали дегенерацию клеток. Морфология их также соответствовала сроку роста: клетки имели веретеновидную форму с гомогенной цитоплазмой и центрально расположенным пузырьвидным ядром, неплотно прилегали друг к другу и анастомозировали своими отростками.

*Сканирующая электронная микроскопия.* Исследование рельефной топографии поверхности спеченного порошка титана показывает (рис. 8, а), что его строение относится к типичному губчатому морфологическому типу, при этом на гладких поверхностях частиц видны округлые выросты размером ~10–30 мкм. После СЛС порошинки образуют каркас матрикса с открытыми порами, имеющими размер в интервале 50–200 мкм. Пory характеризуются неопределенной формой с морфологически развитыми поверхностями, в значительной части наследующими форму и вид поверхности исходных частиц. Пористость спеченного материала составляла 50–65% в зависимости от режима спекания [40]. На рис. 8 и 9 более темный цвет имеют области, содержащие клеточные структуры, так как съемка происходила в обратном излучении. Если на чистом титане они практически непрерывно покрывают пористую поверхность матрикса (рис. 8, а, в), то при добавлении ГАП фибробласты расположены фрагментарно, вероятно, в местах преимущественной концентрации ГАП (рис. 8, б, з). Кроме того, добавление ГАП делает поверхность более хрупкой (стрелками на рис. 8, з отмечены трещины).

Данные EDX-анализа представлены в табл. 1, а на рис. 8 место энергодисперсионного анализа отмечено цифрой. Анализ показывает, что концентрация основных примесных элементов соответствует их содержанию в исходном порошке. Наличие алюминия на большинстве участков съемки мы связываем с влиянием на результаты анализа алюминиевой фольги, которая использовалась для закрепления образцов в камере. Белый поверхностный налет, видимый на фото СЭМ, очевидно, свидетельствует об образовании оксида титана. Таким образом, спеченный титан полностью наследует состав исходного порошка. Наличие углерода, видимо, свидетельствует о присутствии органики (ростовой среды для фибробластов). Следует отметить присутствие в культуре клеток, продуцирующих щелочную фосфатазу, которая является маркером стволовых и остеогенных клеток [1].

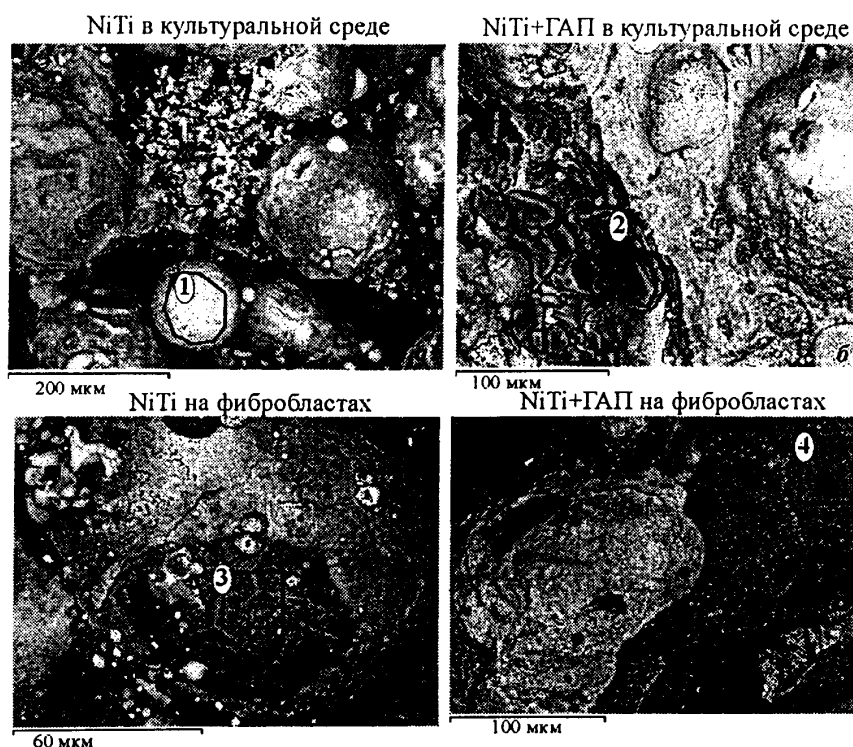


Рис. 9. Сканирующая электронная микроскопия фибробластов, фиксируемых на пористых титановых микроструктурах

Таблица 2

Элементный (EDX) анализ на участках поверхности титанового имплантата, отмеченных на рис. 9

Элемент	Содержание элементов, % (ат.), в точке			
	1 (рис. 9, а)	2 (рис. 9, б)	3 (рис. 9, в)	4 (рис. 9, г)
C	14,75	–	9,12	12,84
O	43,35	7,78	55,91	51,03
Mg	–	–	0,80	–
Al	–	–	0,72	–
Na	–	48,31	–	1,78
P	–	0,78	4,52	0,81
Cl	–	41,01	0,35	0,73
Ca	0,56	–	14,25	15,37
Ti	26,41	1,45	14,33	17,44
Ni	14,93	0,67	–	–

Накопление минерала кальция наиболее отчетливо выявлено на рис. 8, в, г. Важным параметром биосовместимости является соотношение элементов Ca / P, которое следует связать с добавлением ГАП при СЛС титанового матрикса. Наличие натрия свидетельствует об активности фибробластов в чистом титане.

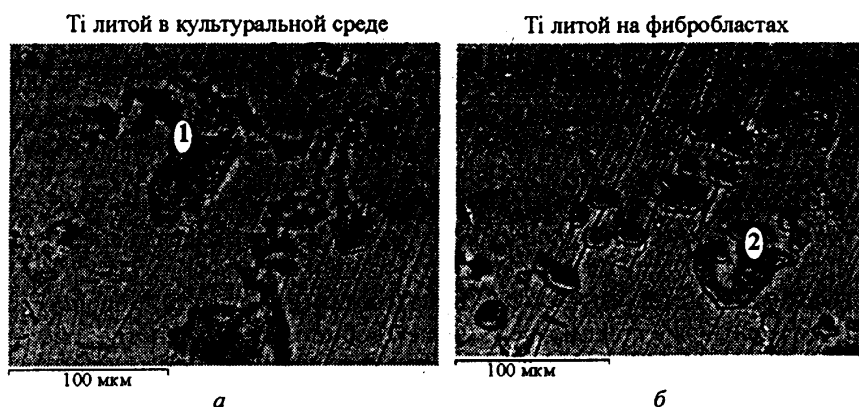


Рис. 10. Сканирующая электронная микроскопия фибробластов, фиксируемых на литых титановых микроструктурах

Таблица 3

Элементный (EDX) анализ на участках имплантата из литого титана, отмеченных на рис. 10

Элемент	Содержание элементов, % (ат.), в точке	
	1 (рис. 10, а)	2 (рис. 10, б)
C	15,42	43,49
O	9,37	5,77
Na	32,01	21,18
K	—	0,32
Cl	23,75	28,26
Ti	19,45	0,98

Микроструктура спеченного лазером нитинола (рис. 9, а) также имеет губчатое строение с развитой системой пор. Большое количество кислорода свидетельствует о выделении титана из структуры никелида титана и последующем его активном окислении до  $Ti_2O_3$ . Общий белый налет на рис. 9 подтверждает этот факт. Соотношение титана и никеля (две последние строки в табл. 2) отвечает исходному порошку интерметаллидной фазы — нитинолу. В участках микроанализа на рис. 9, б–г никель практически отсутствует на поверхности. Размер частиц также порядка размеров исходной фракции. В среде стволовых клеток (рис. 9, в) на стыках отчетливо видна органика (более темного цвета). По соотношению элементов — хлора, фосфора и натрия (табл. 2; рис. 9, б) можно предположить присутствие соли натрия и щелочной фосфатазы. Использование ГАП увеличивает адгезию органических материалов к нитинолу. Фибробласты практически полностью (рис. 9, з) покрывают поверхность нитинола.

Характер расположения фибробластов на литом титане показан на рис. 10. Видно, что гладкая шлифованная поверхность титана слабо способствует закреплению клеток, и лишь в местах царапин от шлифования выделяются клеточные массивы. Однако продуцирование щелочной фосфатазы (табл. 3), вероятно, и здесь имеет место. Вследствие “гладкости” литой образец “перемещался” по ростовой среде, что затрудняло оценку.

### Заключение

Представлены сравнительные результаты морфологического анализа роста стволовых клеток на пористых матриксах, созданных методом СЛС из титана и нитинола, для тканевой инженерии. Очевидно, что создание тканеинженерных конструкций, например, для челюстно-лицевой хирургии — реальная перспектива сегодняшнего дня.

Метод СЛС позволяет послойно синтезировать имплантаты из титана или нитинола, которые не обладают цитотоксичностью, что подтверждается выраженной адгезией клеток в присутствии имплантата, хорошим состоянием монослоя в прилегающей к образцу зоне с высокой плотностью клеток. Клетки сохраняют свою структурную и пролиферативную активность.

Пористые матриксы на основе Ti, NiTi, Ti + ГАП и NiTi + ГАП имеют настолько развитую пористость, что, с одной стороны, открывает широкие перспективы для эффектов прорастания и адгезии, а с другой стороны, создает проблемы с прочностью данных изделий.

Оба из проанализированных вариантов размножения стволовых клеток характеризуются высоким хемотаксисом клеток к образцам, что приводит к снижению количества клеток в промежуточных зонах.

Наличие гидроксиапатита существенно не меняет картину размножения, что говорит о собственно высокой биосовместимости титана или нитинола. По характеру роста клеток можно сказать, что титан скорее биотолерантный материал для имплантации, в то время как нитинол является биосовместимым материалом.

Повреждающий эффект культуры фибробластов в первые сутки экспериментов и недостаточная механическая прочность пористых матриксов, не позволяют их рекомендовать как универсальный материал для матриц-подложек. Несмотря на указанные минусы, эти материалы смогут составить конкуренцию органотипичным полимерам. В будущем следует перейти от лазерного спекания к сплавлению при послойном создании подобных имплантатов, что позволит их использовать для замещения кожных, хрящевых и костных дефектов в хирургической практике.

Исследования проводились при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (Проект № 10-08-00208-а) и гранта по программе Президиума РАН “Фундаментальные науки — медицине” (этапы 2009–2011 гг).

*Обсуждены перспективы послойного лазерного синтеза пористых тканево-клеточных конструкций (матриксов) из титана и нитинола в качестве репозитария для стволовых клеток. Исследования проведены на первичных культурах дермальных фибробластов человека 4–18 пассажей. Культура дермальных фибробластов получена из кожно-мышечной ткани абортусов сроком 6–10 недель методом первичных эксплантатов. Морфологически изучена роль поверхности пористых матриксов из данных материалов в сравнении с литым стоматологическим титаном на условиях клеточной адгезии и пролиферации. Поверхностная микроструктура и шероховатость проанализированы средствами оптической и сканирующей электронной микроскопии как до, так и после экспериментов in vitro. Элементный анализ позволил определить биохимический состав пост-экспериментальных пористых структур матриксов. Показаны высокий хемотаксис клеток к исследованным образцам и влияние состава материала матрикса на развитие культуры клеток.*

**Ключевые слова:** титан, нитинол, тканево-клеточные конструкции, послойное лазерное спекание, остеоинтеграция, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, дифференцировка, остеогенез, пористый матрикс.

*The paper discusses the prospects of layer-by-layer synthesis of porous tissue scaffolds (matrices) of titanium and NiTi (nitinol) as a repository for stem cells. The experiments are performed on primary cultures of human dermal fibroblasts of 4–18 passages. The culture of dermal fibroblasts is obtained from the skin and muscle tissue of 6 to 10-week abortuses with the method of primary explants. The role of surface morphology of porous matrices of these materials in cell adhesion and proliferation is examined in comparison with cast dental titanium. The surface microstructure and roughness are analyzed with optical and scanning electron microscopy before and after experiments in vitro. The elemental analysis is used to determine the biochemical composition of post-experimental porous matrix structures. The results show high chemotaxis of cells to the samples and effect of the matrix composition on the development of cell culture.*

**Keywords:** titanium, nitinol, tissue scaffold, selective laser sintering, osseointegration, multipotent mesenchymal stromal cells, differentiation, bone formation, porous matrix

1. Kanczler J. M. Biocompatibility and osteogenic potential of human fetal femur-derived cells on surface selective laser sintered scaffolds / J. M. Kanczler, S. Mirmalek-Sani, N. A. Hanley et al. // *Acta Biomaterialia*. – 2009. – Vol. 5. – P. 2063–2071.
2. Leong K. F. Fabrication of porous polymeric matrix drug delivery devices using the selective laser sintering technique / K. F. Leong, K. K. S. Phua, C. K. Chua et al. // *Proc. Instn. Mech. Eng. Part H*. – 2001. – Vol. 215. – P. 191–201.
3. Behraves E. Synthetic biodegradable polymers for orthopedic applications / E. Behraves, A. Yasko, P. Angel, A. Mikos. // *Clin. Orthop.* – 1999. – Vol. 367S. – P. 118–185.
4. Burg K. J. L. Biomaterials development for bone tissue engineering / K. J. L. Burg, S. Porter, J. F. Kellam // *Biomaterials*. – 2000. – Vol. 21. – P. 2347–2359.
5. Allcock H. L. A highly porous 3-dimensional polyphosphazene polymer matrix for skeletal tissue regeneration / H. L. Allcock, A. A. Ambroso, M. Attawia et al. // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1996. – Vol. 30. – P. 133–138.
6. Ogura N. Differentiation of the human mesenchymal stem cells derived from bone marrow and enhancement of cell attachment by fibronectin / N. Ogura, M. Kawada, W. Chang et al. // *J. Oral Sci.* – 2004. – Vol. 46, No. 4. – P. 207–213.
7. Итун В. И. Имплантат — носитель клеточного материала из пористого проницаемого титана / В. И. Итун, Г. А. Прибытков, И. А. Хлусов и др. // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. – 2006. – Т. 5, № 3. – С. 59–63.
8. Zinger O. Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography / O. Zinger, K. Anselme, A. Denzer et al. // *Biomaterials*. – 2004. – Vol. 25, No. 14. – P. 2695–2711.
9. Shishkovsky I. V. Nanostructural self-organization under selective laser sintering on exothermal powder mixtures / I. V. Shishkovsky, Y. Morozov, I. Smurov. // *Appl. Surf. Sci.* – 2009. – Vol. 255, No. 10. – P. 5565–5568.
10. Tolochko N. K. Dental root implants produced by the combined selective laser sintering/melting of titanium powders / N. K. Tolochko, V. V. Savich, T. Laoui et al. // *Proc. Inst. Mech. Eng., Part L: J. Mater.: Des. Appl.* – 2002. – Vol. 216. – P. 267–270.
11. Hayashi T. Selective laser sintering method using titanium powder sheet toward fabrication of porous bone substitutes / T. Hayashi, K. Maekawa, M. Tamura, K. Hanyu // *Jap. SME Int. J., Ser. A*. – 2005. – Vol. 48, No. 1. – P. 369–275.
12. Nakamura H. Molecular and Biomechanical Characterization of Mineralized Tissue by Dental Pulp Cells on Titanium / H. Nakamura, L. Saruwatari, H. Aita et al. // *J. Dent. Res.* – 2005. – Vol. 84, No. 6. – P. 515–520.
13. Joob-Fancsaly A. Pulsed laser-induced micro- and nanosized morphology and composition of titanium dental implants / A. Joob-Fancsaly, T. Divinyi, A. Fazekas et al. // *Smart Mater. Struct.* – 2002. – Vol. 11. – P. 819–824.
14. Kim H.-M. Formation of bioactive functionally graded structure on Ti-6Al-4V alloy by chemical surface treatment / H.-M. Kim, H. Takadama, F. Miyaji et al. // *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* – 2000. – Vol. 11. – P. 555–559.
15. Fischer P. Sintering of commercially pure titanium powder with a Nd:YAG laser source / P. Fischer, V. Romano, H. P. Weber et al. // *Acta Mater.* – 2003. – Vol. 51. – P. 1651–1662.
16. Engel B. Titanium alloy powder preparation for SLS / B. Engel, D. L. Bourell // *Rapid Prototyping J.* – 2000. – Vol. 6. – P. 97–106.

17. *Suman Das U.* Processing of titanium net shapes by SLS/HIP / U. Suman Das, M. Wohler, J. J. Beaman, D. L. Bourell // *Mater. Des.* – 1999. – Vol. 20. – P. 115–121.
18. *Buma P.* Histological and biomechanical analysis of bone and interface reactions around hydroxyapatite coated intramedullary implants of different stiffness: a pilot study on the goat / P. Buma, P. J. M. van Loon, H. Versleyen et al. // *Biomaterials.* – 1997. – Vol. 18, No. 1. – P. 251–260.
19. *Cai Y.* Role of hydroxyapatite nanoparticle size in bone cell proliferation / Y. Cai, Y. Liu, W. Yan et al. // *J. Mater. Chemistry.* – 2007. – Vol. 17, No. 36. – P. 3780–3787.
20. *Tsuruga E.* Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis / E. Tsuruga, H. Takita, H. Itoh et al. // *J. Biochemistry.* – 1997. – Vol. 121, No. 2. – P. 317–324.
21. *Rose R.* In vitro assessment of cell penetration into porous hydroxyapatite scaffolds with a central aligned channel / R. Rose, L. A. Cyster, D. M. Grant et al. // *Biomaterials.* – 2004. – Vol. 25. – P. 5507–5514.
22. *Salih V.* Glass reinforced hydroxyapatite for hard tissue surgery. Part II: in vitro evaluation of bone cell growth and function / V. Salih, G. Georgiou, J. C. Knowles, I. Olsen // *Ibid.* – 2001. – Vol. 22. – P. 2817–2824.
23. *Chua C. K.* Development of tissue scaffolds using selective laser sintering of polyvinyl alcohol/hydroxyapatite / C. K. Chua, K. F. Leong, K. H. Tan et al. // *J. Mat. Sci.: Materials in Medicine.* – 2004. – Vol. 15. – P. 1113–1121.
24. *Jiang H. C.* Effect of hydroxyapatite coating on nickel release of the porous NiTi shape memory alloy fabricated by SHS method / H. C. Jiang, L. J. Rong // *Surf. Coat. Techn.* – 2006. – Vol. 201. – P. 1017–1021.
25. *Wiria F. E.* Poly-ε-caprolactone/hydroxyapatite for tissue engineering scaffold fabrication via selective laser sintering / F. E. Wiria, K. F. Leong, C. K. Chua, Y. Liu. // *Acta Biomaterialia.* – 2007. – Vol. 3. – P. 1–12.
26. *Медицинские материалы и имплантаты с памятью формы; под ред. В. Э. Гюнте-ра.* – Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1998. – 487 с.
27. *Man H. C.* Corrosion properties of laser surface melted NiTi shape memory alloy / H. C. Man, Z. D. Cui, T. M. Yue // *Scripta Mater.* – 2001. – Vol. 45. – P. 1447–1453.
28. *Kohl M.* Production of highly porous near-net-shape NiTi components for biomedical application / M. Kohl, M. Bram, H.-P. Buchkremer et al. // *MetFoam 2007: Proceedings of the 5th International Conference on Porous Metals and Metallic Foams.* – Montreal, Canada, 2008. – P. 295–298.
29. *Michiardi A.* Oxidized NiTi surfaces enhance differentiation of osteoblast-like cells / A. Michiardi, E. Engel, C. Aparicio // *J. Biomedical Mater. Research. Part A.* – 2008. – Vol. 85, No. 1. – P. 108–114.
30. *Clarke B.* Effect of nitinol wire surface properties on albumin adsorption / B. Clarke, P. Kingshott, X. Hou // *Acta Biomaterialia.* – 2007. – Vol. 3. – P. 103–111.
31. *Kapanen J.* Behaviour of Nitinol in osteoblast-like ROS-17 cell cultures / J. Kapanen, A. Ilvesaro J. Danilov et al. // *Biomaterials.* – 2002. – Vol. 23. – P. 645–650.
32. *Kujalaa S.* Biocompatibility and strength properties of nitinol shape memory alloy suture in rabbit tendon / S. Kujalaa, A. Pajala, M. Kallioinen et al. // *Ibid.* – 2004. – Vol. 25. – P. 353–358.
33. *Li C. Y.* In vivo histological evaluation of bioactive NiTi alloy after two years implantation / C. Y. Li, X. J. Yang, L. Y. Zhang et al. // *Mater. Sci. Eng.* – 2007. – Vol. C 27. – P. 122–126.
34. *Robertson S. W.* In vitro fatigue–crack growth and fracture toughness behavior of thin-walled superelastic Nitinol tube for endovascular stents: A basis for defining the effect of crack-like defects / S. W. Robertson, R. O. Ritchie // *Biomaterials.* – 2007. – Vol. 28. – P. 700–709.
35. *Sargeant T. D.* Covalent functionalization of NiTi surfaces with bioactive peptide amphiphile nanofibers / T. D. Sargeant, M. S. Raa, C.-Y. Koh, S. I. Stuppa. // *Ibid.* – 2008. – Vol. 29. – P. 1085–1098.
36. *Sevilla P.* Comparison of the mechanical properties between tantalum and nickel–titanium foams implant materials for bone ingrowth applications / P. Sevilla, C. Aparicio, J. A. Planell, F. J. Gil // *J. Alloys. Compd.* – 2007. – Vol. 439. – P. 67–73.
37. *Shabalovskaya S.* Critical overview of Nitinol surfaces and their modifications for medical applications / S. Shabalovskaya, J. Anderegg, J. van Humbeeck. // *Acta Biomaterialia.* – 2008. – Vol. 4. – P. 447–67.

38. *Wirth C.* Nitinol surface roughness modulates in vitro cell response: a comparison between fibroblasts and osteoblasts / C. Wirth, V. Comte, C. Lagneau et al. // *Mater. Sci. Eng.* – 2005. – Vol. C25. – P. 51–60.
39. *Wu S.* In vitro bioactivity and osteoblast response on chemically modified biomedical porous NiTi synthesized by capsule-free hot isostatic pressing / S. Wu, X. Liu, Y. L. Chan et al. // *Surface Coatings Technology.* – 2008. – Vol. 202. – P. 2458–2462.
40. *Шишковский И. В.* Лазерный синтез функциональных мезоструктур и объемных изделий. – М.: Физматлит, 2009. – 424 с.
41. *Bibb R.* Rapid manufacture of removable partial denture frameworks / R. Bibb, D. Eggbeer, R. Williams // *Rapid Prototyping J.* – 2006. – Vol. 12, No. 2. – P. 95–99.
42. *He J.* Custom fabrication of a composite hemi-knee joint based on rapid prototyping / J. He, D. Li, B. Lu et al. // *Ibid.* – 2006. – Vol. 12, No. 4. – P. 198–205.
43. *Ibrahim D.* Dimensional error of selective laser sintering, three-dimensional printing and PolyJet- models in the reproduction of mandibular anatomy / D. Ibrahim, T. L. Broilo, C. Heitz et al. // *J. Cranio-Maxillofacial Surgery.* – 2009. – Vol. 37. – P. 167–173.
44. *Leiggener C.* A selective laser sintering guide for transferring a virtual plan to real time surgery in composite mandibular reconstruction with free fibula osseous flaps / C. Leiggener, E. Messo, A. Thor et al. // *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* – 2009. – Vol. 38. – P. 187–192.
45. *Li X.* Laser densification of extruded dental porcelain bodies in multi-material laser densification process / X. Li, J. Wang, L. L. Shaw, T. B. Cameron // *Rapid Prototyping J.* – 2005. – Vol. 11, No. 1. – P. 52–58.
46. *Pham C. B.* Rapid freeze prototyping technique in bio-plotters for tissue scaffold fabrication / C. B. Pham, K. F. Leong, T. C. Lim, K. S. Chian. // *Ibid.* – 2008. – Vol. 14, No. 4. – P. 246–253.
47. *Rimell J. T.* Selective Laser Sintering of Ultra High Molecular Weight Polyethylene for Clinical Applications / J. T. Rimell, P. M. Marquis // *Inc. J. Biomed. Mater. Res. (Appl Biomater).* – 2000. – Vol. 53. – P. 414–420.
48. *Taboas J. M.* Indirect solid free form fabrication of local and global porous, biomimetic and composite 3D polymer-ceramic scaffolds / J. M. Taboas, R. D. Maddox, P. H. Krebsbach, S. J. Hollister // *Biomaterials.* – 2003. – Vol. 24. – P. 181–194.
49. *Vandenbroucke B.* Selective laser melting of biocompatible metals for rapid manufacturing of medical parts / B. Vandenbroucke, J.-P. Kruth // *Rapid Prototyping J.* – 2007. – Vol. 13, No. 4 – P. 196–203.
50. *Williams J. M.* Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering / J. M. Williams, A. I. Adewunmi, R. M. Schek et al. // *Biomaterials.* – 2005. – Vol. 26. – P. 4817–4827.
51. *Goodridge R. D.* Biological evaluation of an apatite–mullite glass-ceramic produced via selective laser sintering / R. D. Goodridge, D. J. Wood, C. Ohtsuki, K. W. Dalgarno // *Acta Biomaterialia.* – 2007. – Vol. 3. – P. 221–231.
52. *Крель А. А.* Методы определения оксипролина в биологических жидкостях и их применение в клинической практике / А. А. Крель, Л. Н. Фурцева // *Вопр. мед. химии.* – 1968. – Т. 6. – С. 635–640.

Физический институт им. П. Н. Лебедева РАН,  
Самарский филиал, Россия  
Институт структурной макрокинетики и проблем  
материаловедения РАН, Черноголовка, Россия  
ЦНИЛ Самарского государственного медицинского  
университета, Самара, Россия

Поступила 15.12.09