

НИИ МЕДИЦИНСКИХ МАТЕРИАЛОВ И ИМПЛАНТАТОВ С ПАМЯТЬЮ ФОРМЫ
Сибирского физико-технического института при Томском государственном университете

МАТЕРИАЛЫ С ПАМЯТЬЮ ФОРМЫ И НОВЫЕ МЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

*Под редакцией
заслуженного деятеля науки РФ, профессора
Виктора Эдуардовича Гюнтера*



ТОМСК
2010

зации органов (гортани, трахеи, глотки) ввиду их подвижности при актах глотания, речи и поворотах головы. Несмотря на наличие определенного числа больных, оставшихся канюленосителями, случаев продолженного роста и рецидивов опухоли, полученные результаты функциональной реабилитации больных после хирургического лечения с протезированием никелидом титана позволяют высказаться в пользу подобных операций. Соблюдение принципов абластики, использование новых методических подходов и технологий функционально- и органосохраняющей хирургии позволяют надеяться на снижение числа осложнений и улучшение результатов реабилитации данной категории больных.

ПОРИСТЫЙ ПРОНИЦАЕМЫЙ ИНКУБАТОР ИЗ НИКЕЛИДА ТИТАНА – ЭФФЕКТИВНЫЙ НОСИТЕЛЬ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ОРГАНОВ

В.Н. Ходоренко, В.Э. Гюнтер, О.В. Кокорев, Ю.Ф. Ясенчук, Г.Ц. Дамбаев

В последние годы перспективными методами лечения сложных заболеваний являются клеточная и тканевая трансплантации. Использование этих методов лечения имеет лучший эффект при правильном выборе инкубатора – носителя клеточного материала. В связи с особенностью используемых различных клеток и тканей, а также в зависимости от выполнения функциональных задач в качестве имплантатов – носителей клеточного материала выбирают имплантаты различные по конфигурации, составу, биосовместимости. В качестве материалов инкубаторов – носителей используют различные материалы – графит, керамику, полимеры, металлы и их сплавы.

Поиск материалов чаще всего определяется влиянием их на клеточные и внутриклеточные процессы – выживаемость, рост, размножение клеток. У клеток должен быть доступ к питательным веществам и выводу ненужных метаболитов, а также они должны быть обеспечены соответствующим трехмерным объемным пространством. По этой причине большинство инкубаторов, независимо от материала, созданы с некоторой пористой объемной структурой и способны осуществлять перенос питательных веществ непосредственно к культивируемым клеткам. Однако конкретный тип материала вносит свои особенности в процесс взаимодействия с клеточным материалом.

Неорганические материалы, такие как биоактивные стекла, и фосфорнокислый кальций широко используются для инжиниринга костной ткани из-за общих черт конфигурации структуры и их незначительной способности к интеграции с естественным минеральным комплексом кости. Биоактивные стекла спечены из порошка и, чтобы создать пористую структуру, их раствор вспенивают, а затем дают загустеть, чтобы образовался золь-гель. Точно так же пористость может быть спроектирована в полимерах, например, в полиуретане и полиэфирах. Пористые подложки также создают из естественных материалов – гели коллагена, которые могут быть высушены сублимацией перед клеточным засевом. У каждого инкубатора есть свои достоинства, недостатки и ограничения использования.

Неорганические скаффолды, такие как керамика и биоактивные стекла имеют тенденцию быть слишком лабильными и слабыми по физико-механическим свойствам, чтобы использоваться в конструкциях, несущих значительную знакопеременную нагрузку. Искусственные полимеры воспринимаются организмом как инородное тело с замкнутой системой пор. Они плохо адгезируют прилипающие клетки и характеризуются низким уровнем смачиваемости. Продукты деструкции, в случае полиэфиров и кислых веществ, опосредованно создают нефизиологически кислую, токсичную среду, которая уничтожает клетки.

Другие проблемы, возникающие с инкубаторами, заключаются в том, что клетка, посеянная на внутренний пористый матрикс, должна понять и ощутить трехмерную макросреду. Это можно достичь в некоторой степени изменением структуры поверхности, варьированием размера пор и состава материала.

Решить многие проблемы в области как поиска необходимого материала для инкубатора-носителя, так и биоинтеграции клеточного материала в нем, позволяет использование для этих целей одного из видов пористого проницаемого материала на основе никелида титана. Созданные в НИИ медицинских материалов и имплантатов с памятью формы (г. Томск) объемные пористо-проницаемые инкубаторы из никелида титана обладают уникальными свойствами: имеют пористо-проницаемую структуру с высокой степенью открытости пор, обладают удивительной смачиваемостью с тканевыми жидкостями, высокой биологической, биомеханической и биохимической совместимостью на клеточном уровне и отвечают всем выше перечисленным требованиям.

Настоящее исследование посвящено анализу структурных особенностей пористого проницаемого никелида титана, как инкубатора–носителя клеточных культур, и анализу особенностей реакции клеток тканей организма на их имплантацию в поровое пространство инкубатора. Проанализированы данные о способности, в частности, мезенхимальных костномозговых клеток развиваться и создавать популяции хондрогенных и остеогенных тканей в пористо-проницаемых инкубаторах из никелида титана.

Исследования проведены на образцах пористо-проницаемого никелида титана, полученного методом СВС. Образцы имеют неупорядоченную пористую структуру (пористость 69%) с размером пор в диапазоне 0,1÷1000 мкм.

Топографию поверхности образцов и анализ порового пространства проводили, используя методы световой и растровой электронной микроскопии. Фазовый состав поверхности определяли с помощью локального микрорентгеноспектрального анализа. Морфологию клеточных структур, их развитие исследовали на растровом электронном микроскопе Quanta 200 3D. Образцы–инкубаторы были вырезаны из пористой заготовки электроэрозионным способом. Перед испытанием инкубаторы выдерживали при $T=180\text{ }^{\circ}\text{C}$ в сухожаровом шкафу, охлаждали и помещали в полную культуральную среду костномозговых клеток. Проводили культивирование инкубаторов с клетками костного мозга в среде, которая состояла: из среды DMEM-F12 («ПанЭко», РФ), 10% эмбриональной телячьей сыворотки («HyClone», США), гентамицин 40 мкг/мл («ПанЭко», РФ), глутамин 250 мг/л («ПанЭко», РФ). Инкубаторы с клетками содержали при постоянной температуре $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 100% влажности с 5% CO_2 . Культивирование продолжалось в течение 28 сут с забором образцов через каждые 7 сут. Затем образцы фиксировали в течение 1 ч в 2,5% глутаральдегиде (SIGMA), промывали 3 раза в PBS (15 мин), далее фиксировались 1 ч в 1% тетраоксиде осмия (SIGMA), промывали 3 раза в PBS и затем дегидратировали, пропуская через ряд растворов этанола (30, 50, 70, 90, 100%) по 15 мин в каждом. Фиксированные и дегидратированные образцы были высушены, и каждый образец инкубатора был исследован на растровом электронном микроскопе.

Структура инкубатора из пористого проницаемого никелида титана представляет собой трехмерное поровое пространство, морфологическое строение которого типично для высокопористых материалов, полученных с участием жидкой фазы. Пористый материал имеет большую удельную поверхность, обусловленную наличием в нем системы открытых и взаимосвязанных пор (рис. 1). Поверхность стенок пор очень развита, она рельефная и шероховато-микропористая.

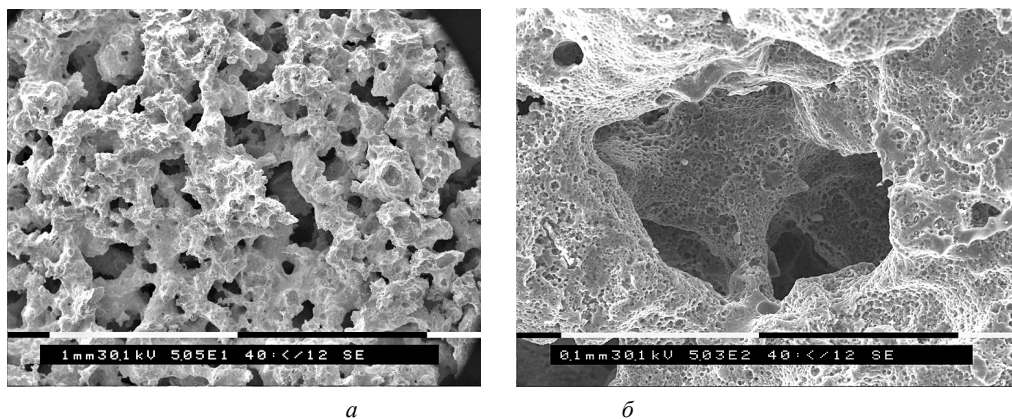


Рис. 1. Структура пористого проницаемого инкубатора из никелида титана (а) и структура стенок пор (б)

Пористость, средний размер пор и распределение пор по размерам – основные структурные характеристики пористого никелида титана. Используя различные режимы получения пористого материала методом СВС – меняя температурные режимы старта и протекания самого процесса СВС, а также исходные параметры порошков никелида титана, можно получить различный по структуре пористо-проницаемый материал. В зависимости от этих факторов, материал имеет различные максимальный и минимальный размеры пор, различное распределение пор по размерам, а также, что особенно важно, различное состояние поверхности порового пространства – фазовая структура, химический состав, топография поверхности стенок пор.

В целом, основной составляющей матрицы – материала инкубатора, является сложное интерметаллическое соединение $\text{TiNi}(\text{MoFe})$, находящееся в двухфазном состоянии (B2, B19). Также присутствуют в значительном количестве вторичные фазы $\text{Ti}_4\text{Ni}_2\text{O}$ и TiNi_3 , неоднородно распределенные в

объеме матричной фазы. Зоны выделения вторичных фаз располагаются, как правило, вдоль границ пор, наследуя, по-видимому, расположение частиц титана и никеля, а также по границам зерен. Фазы, обогащенные никелем $TiNi_3$, – когерентные, мелкодисперсные, чаще округлой и пластинчатой формы, реже в виде сеток. Фазы, обогащенные титаном Ti_4Ni_2O , – некогерентные, крупных размеров, имеют вид компактных пятен или групп. Кроме того, на поверхности материала в процессе синтеза образуются растворимые сернистые выделения, а также выделения солей.

Все эти факторы имеют определяющее влияние на зарождение, развитие и жизнеспособность клеточных культур в объеме порового пространства инкубатора. Необходимо подчеркнуть, что фазовый, химический состав поверхности в пористых инкубаторах с разной топографией внутренней поверхности пор могут значительно отличаться.

Детальные исследования взаимодействия культуральной среды – клеток костного мозга с поверхностью пористого проницаемого никелида титана показали, что пористый материал является идеальным биосовместимым материалом для клеточной культуры. Особенности взаимодействия заключаются в том, что клетки прикрепляются чаще и в больших количествах на развитую, шероховатую микропористо-проницаемую поверхность, где имеется множество мелких пор размером менее 0,1–0,2 мкм, служащие дополнительными хранилищами питательных сред. Клетки прикрепляются к стенкам мелких пор, затем начинают активно расти, размножаться и заполнять всё поровое пространство (рис. 2).

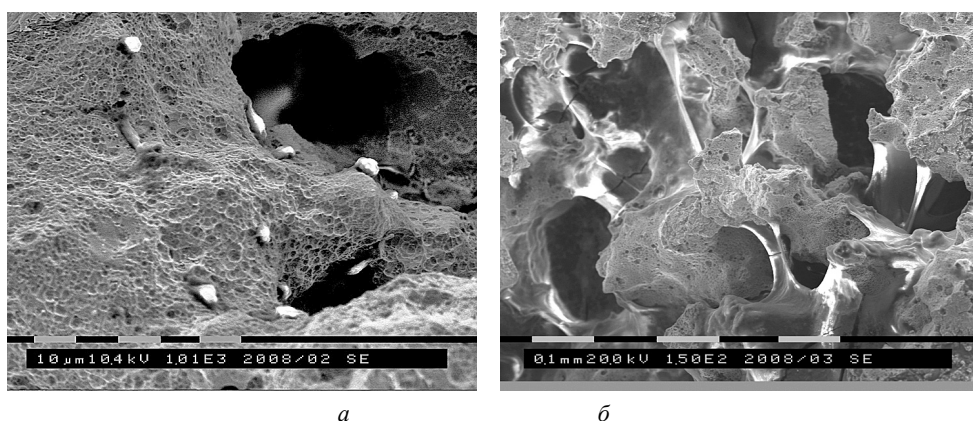


Рис. 2. Закрепление клеток (а) и заполнение порового пространства инкубатора (б)

Подробный структурный анализ роста клеток костного мозга в структуре пористого инкубатора из никелида титана выявил ряд особенностей в механизме роста клеток разного типа.

Наблюдали клетки, у которых ножки-псевдоподии, образуясь на разных краях, прикрепляются к стенкам пор одновременно. Ножки вытягиваются и растягивают клетку в разные стороны, уплотняя ее форму (рис. 3).

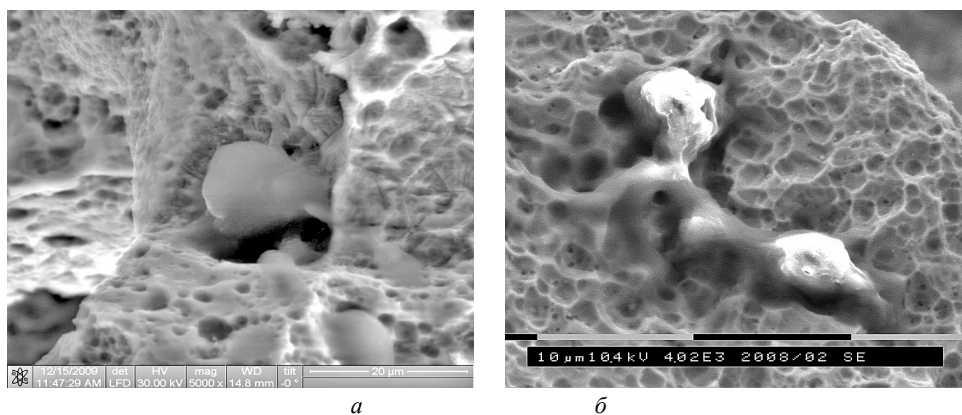
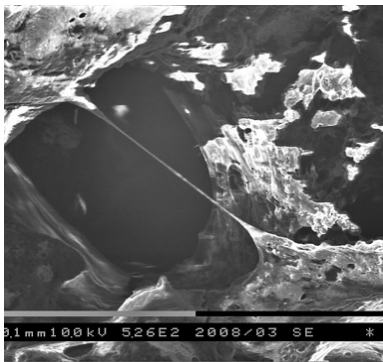
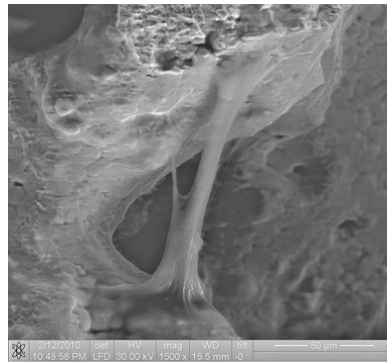


Рис. 3. Размножение клеток: а – прикрепление клетки к стенкам поры, б – распластывание клеток

Другой наблюдаемый случай роста и размножения клеток сопровождается выбрасыванием тонкого длинного уса (псевдоподии) из основания клетки. Все клетки растут, образуя на своем переднем крае динамические выросты – псевдоподии (усы), которые могут быть разной формы и протяженности (рис. 4).



а



б

Рис. 4. Псевдоподии (усы), длинные и тонкие (а), короткие и объемные (б)

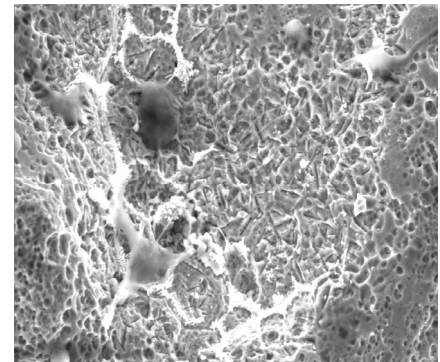
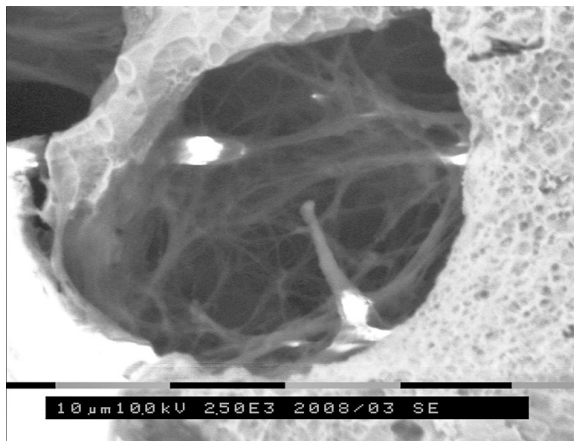


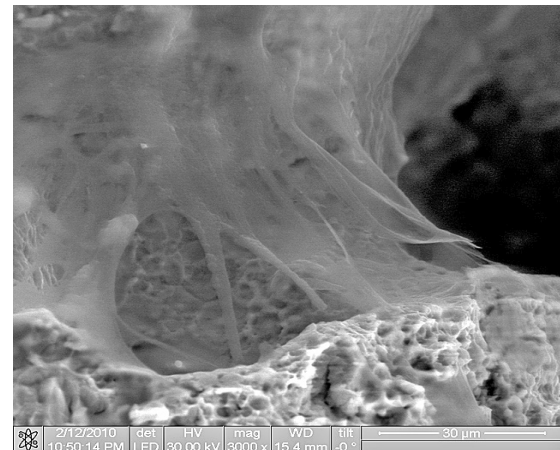
Рис. 5. Вариант размножения клетки посредством длинного уса (псевдоподии)

Преодолевая гигантское поровое пространство и закрепляясь по пути продвижения ус (псевдоподия), зарождает и обеспечивает рост новой идентичной клетки (рис. 5). Впоследствии совокупность большого количества ус (псевдоподий) и клеток образуют ткань.

Выбрасывание и прикрепление ножек клеток происходит в разных направлениях, как по поверхности поры, так и от стенки одной поры через поровое пространство к стенке другой поры (рис. 6).



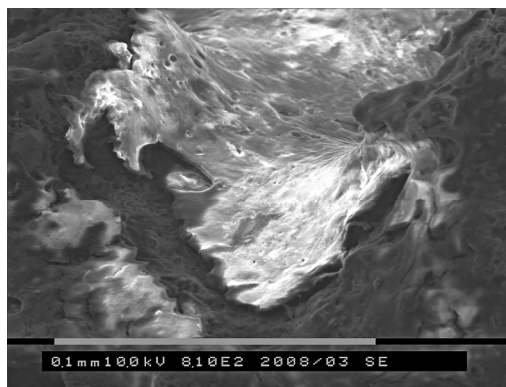
а



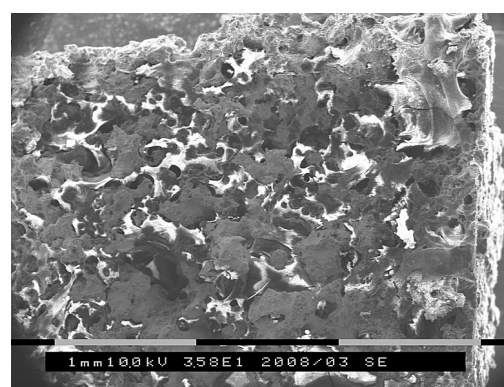
б

Рис. 6. Развитие псевдоподий в поре: а – сетчатая система ус в пространстве пор; б – более зрелая масса ус (псевдоподий), преобразующаяся в ткань

Постепенно количество клеток растет, тонкие ножки (усы) растут в размерах, иногда превращаются в плотные переплетенные жгутики, происходит активное образование ткани. Ткань выстилает внутреннюю поверхность пор и заполняет все поровое пространство. К 21 сут поры оказываются заполненными тканью на 80% (рис. 7).



а



б

Рис. 7. Заполнение тканью пор инкубатора: а – этап активного заполнения порового пространства; б – ткань в порах инкубатора

Таким образом, выбрасывая псевдоподию, клетка обеспечивает последующее размножение. При этом клетка проявляет удивительную способность выбирать нужную ориентировку. Эти движения отдельных клеток приводят к образованию сложных многоклеточных структур. Клетка меняет направление роста в ответ на изменение ее окружения и изменение питательной среды. Также на рост и размножение клеток по поверхности влияет разная адгезивность и смачиваемость («липкость») участков поверхности. Развитая шероховато-микропористая поверхность пор и наличие большого количества мелких пор в стенках крупных пор, где всегда есть питательная среда, являются идеальными условиями для роста и размножения клеток.

Совокупность представленных особенностей структуры и свойств инкубатора из никелида титана определяются топографией поверхности стенок пор, распределением пор по размерам, фазовым, химическим составом поверхности, условиями создания движущей силы для движения клеток – градиентом концентраций питательных веществ.

Таким образом, пористый проницаемый инкубатор из никелида титана является уникальным биосовместимым носителем клеточных культур тканей организма и может использоваться для создания искусственных тканеинженерных конструкций.

Литература

1. Васильев Ю.М. Клетка как архитектурное чудо. Цитоскелет, способный чувствовать и помнить. Ч.2.//Соросовский образовательный журнал. Биология. 1996. № 4. С.4-10.
2. Ченцов Ю.С. Общая цитология. (Введение в биологию клетки). М.: Изд-во МГУ, 1995.
3. Альбертс А., Брей Д., Льюис Р., Рафф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки в 3 т. Пер. с англ. М.: Мир, 1994.
4. Хэм А., Кормак Д. Гистология. Пер.с англ. М.: Мир, 1982, Т.1. 272 с., Т.2. 254 с.

ОСОБЕННОСТИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ФОРМИРОВАТЕЛЕЙ ДЕСНЫ ВОКРУГ ДЕНТАЛЬНЫХ ИМПЛАНТАТОВ НА ОСНОВЕ ПРИМЕНЕНИЯ ЛИТЬЕВОГО СПЛАВА «ТИТАНИД»

М.З. Миргазизов, Р.Г. Хафизов, Ф.А. Хафизова, Р.М. Миргазизов, Ф.А. Хайруллин

Способность никелида титана приливаться к титану нами была использована для создания индивидуализируемого формирователя десны, который представляет собой фиксируемый винтом универсальный опорно-соединительный элемент, прецизионно изготовленный заводским способом из титана в соответствии с параметрами соединительного узла имплантата (внутренний или наружный шестигранник). Опорно-соединительный элемент имеет пришеечный ободок, узел сопряжения с имплантатом, основание для приливаемой части формирователя, пластиковый моделировочный рукав и фиксирующий винт. На базе этого опорно-соединительного элемента моделируется индивидуальная форма формирователя десны с учетом сегментного расположения зуба, который далее в процессе литья из никелида титана приливается к поверхности титана, образуя монолитную конструкцию.

Способ изготовления индивидуального формирователя заключается в следующем. Снимается оттиск, используя слепочные трансферы и высокоточный слепочный материал. Затем отливается гипсовая модель челюсти. На модели с эластичной десневой маской в лабораторный аналог имплантата устанавливается титановый универсальный опорно-соединительный элемент, на котором осуществляется моделирование индивидуального формирователя с учетом толщины десны, параллельности и местоположения имплантатов по сегментам (при введении нескольких имплантатов), высоты будущего формирователя, расположения фиксирующего винта и других особенностей, связанных с функцией и эстетикой планируемой конструкции.

Смоделированная таким образом конструкция снимается с лабораторного аналога имплантата и передается на литье. Установка литников, паковка, плавка металла и отливка осуществляется по технологическим требованиям литья никелида титана в инертной среде под защитой аргона.

Технология изготовления индивидуального формирователя десны к опорно-соединительному элементу из титана представлена на рис. 1, 2.