

Оценка пролиферативной активности клеточных культур на наноструктурированных покрытиях для дентальных имплантатов

Ал. Ал. Долгалеv^{1,2}, Д. З. Чониашвили³, Р. Д. Юсупов⁴, М. Г. Амбарцумов⁵, Н. Н. Диденко^{1,2}, Ю. А. Сергеев¹

¹ Общество с ограниченной ответственностью «Имплант Аддитивные технологии», г. Ставрополь, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ставрополь, Российская Федерация

³ ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет имени Коста Левановича Хетагурова» (СОГУ), г. Владикавказ, Российская Федерация

⁴ ФГБОУ ВО Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал Волгоградского государственного медицинского университета, г. Пятигорск, Российская Федерация

⁵ ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», г. Ставрополь, Российская Федерация

РЕЗЮМЕ

Успех имплантационного лечения во многом зависит от остеоинтеграции – устойчивого соединения клеток костной ткани с поверхностью имплантата. Одним из ключевых технических факторов, от которого зависит успешная остеоинтеграция, является биосовместимая поверхность имплантата.

Материалы и методы. Авторами на биологическую совместимость были исследованы три серии покрытий на прототипах (образцах) титановых имплантатов: пленки диоксида титана (TiO_2), полученные методом плазмоактивированного атомно-слоевого осаждения (PEALD); пленки диоксида титана (TiO_2), полученные методом золь-гель; пленки алмазоподобного углерода (DLC). Для исследования пролиферативной активности использовали первичные культуры МСК – мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани крысы.

Результаты. Всего было исследовано 30 образцов, контролем послужили образцы, изготовленные из титана марки ВТ6 без покрытия. Образцы, TiO_2 ALD 25 нм, DLC 100 нм и DLC 200 нм, на которых клеточные элементы показали значительно высокие уровни пролиферативной активности показали высокую биологическую совместимость.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: среда для культивирования клеток, биосовместимость, локальные электрохимические методы, механизм коррозии, имплантационная хирургия, защитные биоактивные покрытия.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Evaluation of the proliferative activity of cell cultures on nanostructured coatings for dental implants

Al. Al. Dolgalev^{1,2}, D. Z. Choniashvili³, R. D. Yusupov⁴, N. N. Didenko^{1,2}, M. G. Ambarsumov⁵, Y. A. Sergeev¹

¹ Limited Liability Company «Implant Additive Technologies», Stavropol, Russian Federation

² Stavropol State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Stavropol, Russian Federation

³ FGBOU VO «North Ossetian State University named after Kosta Levanovich Khetagurov» (SOGU)

⁴ Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute-branch of the Volgograd State Medical University Pyatigorsk, Russian Federation

⁵ Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «North Caucasus Federal University», Stavropol, Russian Federation

SUMMARY

The success of implantation treatment largely depends on osseointegration – a stable connection of bone tissue cells with the implant surface. One of the key technical factors on which successful osseointegration depends is the biocompatible surface of the implant.

Materials and methods. The authors investigated three series of coatings on prototypes (samples) of titanium implants for biological compatibility: titanium dioxide (TiO_2) films obtained by plasma activated atomic layer deposition (PEALD); titanium dioxide (TiO_2) films obtained by sol-gel method; diamond-like carbon (DLC) films. Primary cultures of MSCs – mesenchymal stromal cells of rat adipose tissue were used to study proliferative activity.

Results. A total of 30 samples were examined, samples made of titanium grade VT6 without coating served as a control. Samples, TiO_2 ALD 25 nm, DLC 100 nm and DLC 200 nm, on which cellular elements showed significantly high levels of proliferative activity showed high biological compatibility.

KEY WORDS: cell culture medium, biocompatibility, local electrochemical methods, corrosion mechanism, implantation surgery, protective bioactive coatings.

CONFLICT OF INTEREST. The authors declare that they have no conflicts of interest.

Введение

Материалами, традиционно используемыми в имплантологии, являются: химически чистый титан, по российской классификации ВТ 1.0 (соответствует Ti Grade 4 по международной классификации), медицинский сплав титана ВТ 6 (соответствует Ti Grade 5 по международной классификации). Наличие в сплаве легирующих элементов алюминия и ванадия дает возможность изготавливать медицинские изделия с большей прочностью, чем из химически чистого титана, но тканевым ответом на алюминий является образование фиброзной ткани, ванадий же сам по себе токсичен. Практически все системы дентальных имплантатов изготавливают из химически чистого титана, сплавы титана, содержащие алюминий и ванадий используются реже. Перед производителем всегда стоит задача снизить отрицательное влияние на клетки и ткани легирующих добавок. Поэтому задача создания биологически инертных покрытий на имплантаты остается актуальной.

В ряде литературных источников, изменение микро-дизайна достигается как увеличением пористости [6], так и нанесением слоев разнородных металлов [3, 4, 12], однако не всегда возможно оценить позитивную динамику репаративных процессов при таких методиках, учитывая особенности биосовместимости, токсичности и механико-фармакологического взаимодействия [5, 9].

Развитие биотехнологий в 21 веке привело к увеличению числа научных изысканий в различных областях медицины. Использование клеточных культур при тестировании новых препаратов и материалов на цитотоксичность является достаточно прогрессивной методикой исследования с точки зрения биоэтики [7, 8], результаты подобных исследований можно дать возможность провести первичный скрининг разрабатываемых материалов и препаратов.

Цель исследования: сравнить пролиферативную активность клеток на различных видах покрытий для материалов изготовленных из легированных сплавов титана.

Материалы и методы

На биологическую совместимость были исследованы три серии покрытий на прототипах (образцах) титановых имплантатов:

- 1) Пленки диоксида титана (TiO_2). Исследовано 10 образцов с толщинами порядка ~10 нм, 15 нм, 20 нм, 25 нм и 30 нм (по 2 шт образца с каждой толщиной). Погрешность ± 2 нм. Способ получения – метод плазмо-активированного атомно-слоевого осаждения (PEALD);

- 2) Пленки диоксида титана (TiO_2). Исследовано 10 образцов с толщинами порядка ~200 нм, 400 нм, 600 нм, 800 нм и 1000 нм (по 2 шт образца с каждой толщиной). Погрешность ± 50 нм. Способ получения – золь-гель метод;
- 3) Пленки алмазоподобного углерода (DLC). Исследовано 10 образцов с толщинами порядка ~50 нм, 100 нм, 150 нм, 200 нм и 250 нм (по 2 шт образца с каждой толщиной). Погрешность ± 10 нм. Способ получения – метод плазмохимического осаждения из газовой фазы (PECVD).

На рисунке 1 представлено фото внешнего вида образцов пленок диоксида титана на поверхности титановых имплантатов, полученных с различной толщиной.

Для проведения исследования использовали первичные культуры МСК – мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани крысы, так как они доступны, легко культивируются, не склонны к образованию опухолей. МСК культивировали в среде DMEM (Sigma) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (FBS) (Gibco) в культуральных флаконах площадью 25 cm^2 (Thermo Scientific) при 37 °C и 5% CO_2 . Смена среды осуществлялась каждые 3–4 дня. После достижения 80-90% конфлюэнтности монослоя клетки отделяли с помощью 0,25% раствора трипсина (БиолоТ) и подсчитывали с помощью автоматического счетчика клеток Luna-FL (Logos Biosystems). В эксперименте использовались клетки на 3-ем пассаже. [1, 12].

Исследуемые образцы помещали в 24-луночные планшеты. В каждую лунку планшета с образцами вносили суспензию МСК (0,8 мл, содержащих 2×10^4 клеток). Клетки в лунке с образцом ВТ-6 использовали как отрицательные контрольные. Планшеты инкубировали в течение 7 суток при 37 °C и 5% CO_2 .

Пролиферативную активность клеток определяли с помощью набора EZ4U (Biomedica), модификации теста МТТ, который оценивает метаболическую активность клеток, коррелирующую с количеством живых клеток. Образец каждого типа переносили после инкубации в другой 24-луночный планшет с 0,8 мл свежей среды DMEM. Затем к каждой лунке добавляли 80 мкл активированного раствора EZ4U и инкубировали при 37°C и 5% CO_2 в течение 3,5 часов. После чего образцы извлекали и измеряли оптическое поглощение раствора с использованием многофункционального фотометра-имиджера Cytation1 (BioTek) при длине волны 450 нм с референсной длиной волны 620 нм. Вычисляли оптическую плотность относительно отрицательного контроля в %.



Рисунок 1. Внешний вид образцов пленок диоксида титана на поверхности титановых имплантатов

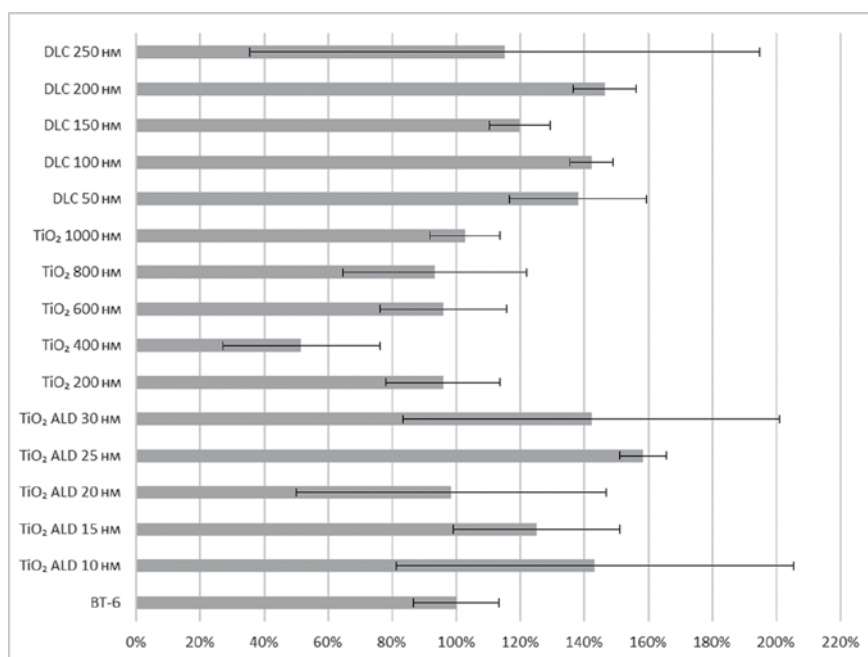


Рисунок 2. Пролиферативная активность МСК через 7 суток в %

Статистическую обработку данных проводили при помощи программного обеспечения MS Excel 2016 с использованием методов описательной статистики).

Результаты и их обсуждение

Значительное статистически значимое увеличение пролиферативной активности отмечалось у клеток, культивируемых на образцах TiO₂ ALD 25 нм ($158,33 \pm 7,292\%$, $t=3,824$, $p<0,05$), DLC 100 нм ($142,19 \pm 6,771\%$, $t=2,810$, $p<0,05$) и DLC 200 нм ($146,35 \pm 9,896\%$, $t=2,783$, $p<0,05$). Клетки на прочих образцах показали статистически не значимое отклонение пролиферативной активности от контрольных значений (от $151,56 \pm 24,479\%$ до $143,23 \pm 61,979\%$).

Полученные результаты представлены на рис. 2.

Оценка и статистически существующая разница пролиферативной активности клеток между исследуемыми вариантами поверхностей образцов дентальных имплантатов позволяет судить о прямой зависимости высокой адгезии, жизнеспособности клеток и их пролиферации на поверхностях изучаемых материалов [11].

Заключение

Таким образом, изучение пролиферативной активности клеточных структур, за счёт выраженной адгезии клеточного компонента позволило определить наиболее биосовместимые материалы для последующего использования их в клинической практике и практическом здравоохранении. Образцы, TiO₂ ALD 25 нм, DLC 100 нм и DLC 200 нм, на которых клеточные элементы показали значительно высокие уровни пролиферативной активности обладают большей биологической совместимостью, в том числе при сравнительной оценке с чистым сплавом титана BT6, что прогнозирует существенную способность данных материалов к формированию полноценной остеинте-

грации. Полученные данные дают основание проводить дальнейшие исследования эффективности и безопасности опытных образцов в доклинических и, в дальнейшем, клинических исследованиях.

Данное исследование проведено в рамках выполнения гранта по программе Старт-1, договор №4374ГСИ/70566 с ФГБУ «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» о предоставлении гранта на проведение научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ по теме: «Разработка, изготовление и исследования прототипа внутрикостных имплантатов из сплавов высокой прочности с биосовместимыми покрытиями для челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии».

Список литературы / References

- ГОСТ ISO 10993-5-2011. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы in vitro. GOST ISO 10993-5-2011. Medical products. Assessment of the biological effect of medical devices. Part 5. Cytotoxicity studies: in vitro methods.
- Волова Л.Т., Пономарева Ю.В., Розенбаум А.Ю. Значение тестирования на культуре клеток для выявления малотоксичного эффекта средств медицинского назначения // Вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2012. – Т. 13. – № 1. – С. 48–51. Volova L.T., Ponomareva Yu.V., Rosenbaum A.Yu. The importance of testing on cell culture to identify the low-toxic effect of medical products // Bulletin of Emergency and Rehabilitation Medicine. – 2012. – Vol. 13. – No. 1. – pp. 48–51.
- Купряхин С.В. Тестирование поверхностей дентальных имплантатов различной подготовки на цитотоксичность, на мезенхимальные стромальные клетки // Вестник медицинского института «Реавиз»: реабилитация, врач и здоровье. 2019. № 1 (37). Kupryakhin S.V. Testing of surfaces of dental implants of various preparation for cytotoxicity, on mesenchymal stromal cells // Bulletin of the medical institute «Reaviz»: rehabilitation, doctor and health. 2019. № 1 (37).
- Новоцадов В.В., Гайфуллин Н.М., Залевский Д.А., Семенов П.С., Шемонаев В.И. Остеоинтеграция имплантатов с биоактивной поверхностью, модифицированной напылением хитозана в эксперименте у крыс // Рос. мед.-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. 2013. № 2. Novochadov V.V., Gaifullin N.M., Zalevsky D.A., Semenov P.S., Shemonaev V.I. Osseointegration of implants with bioactive surface modified by chitosan spraying in the experiment in rats // Russian Medical-biol. vestn. im. akad. I.P. Pavlov. 2013. № 2.

5. Порошин Алексей Владимирович, Ярыгина Е.Н., Михальченко В.Ф., Хвостов С.Н., Шемонаев В.И. Повышение эффективности остеоинтеграции дентальных имплантатов в эксперименте // Вестник ВолГМУ. 2015. №3 (55). Poroshin Alexey Vladimirovich, Yarygina E.N., Mikhachenko V.F., Khvostov S.N., Shemonaev V.I. Improving the efficiency of osteointegration of dental implants in experiment // Bulletin of VolGМУ. 2015. No. 3 (55).
6. Корыткин А.А., Орлинская Н.Ю., Новикова Я.С., Герасимов С.А., Давыденко Д.В., Кулакова К.В., Твердохлебов С.И., Большасов Е.Н. Биосовместимость и костная интеграция титановых имплантатов различной пористости с кальций-фосфатным покрытием и без покрытия // Соврем. технол. мед. 2021. № 2. Korytkin A.A., Orlynskaya N.Yu., Novikova Ya.S., Gerasimov S.A., Davydenko D.V., Kulakova K.V., Tverdokhlebov S.I., Bolbasov E.N. Biocompatibility and bone integration of titanium implants of various porosity with and without calcium phosphate coating // We'll lie. technol. med. 2021. No. 2.
7. Волова Л.Т., Трунин Д.А., Пономарева Ю.В., Попов Н.В. Исследование биосовместимости и цитотоксичности персонализированных костных имплантатов с применением клеточных технологий // Вестник медицинского института «Реавиз»: реабилитация, врач и здоровье. 2017. № 5 (29). Volova L.T., Trunin D.A., Ponomareva Yu.V., Popov N.V. Investigation of biocompatibility and cytotoxicity of personalized bone implants using cellular technologies // Bulletin of the medical Institute «Reaviz»: rehabilitation, doctor and health. 2017. № 5 (29).
8. Котельников Г.П., Колсанов А.В., Николаенко А.Н., Волова Л.Т., Россинская В.В., Болотская В.В., Попов Н.В., Щербовских А.Е., Приходько С.А. «Тестирование аддитивных материалов на культурах клеток фибробластов человека» Клиническая и экспериментальная хирургия, vol. 6, no. 2, 2018, pp. 67–73. doi:10.24411/2308-1198-2018-12009
- Kotelnikov G.P., Kolsanov A.V., Nikolaenko A. N., Volova L.T., Rossinskaya V.V., Boltovskaya V.V., Popov N.V., Shcherbovskikh A.E., Prihodko S.A. «Testing of additive materials on human fibroblast cell cultures» Clinical and experimental surgery, vol. 6, No. 2, 2018, pp. 67–73. doi:10.24411/2308-1198-2018-12009
9. В.В. Казбанов, М.С. Баталов, А.А. Вишневецкий Особенности биосовместимости и перспективы применения титановых имплантатов с алмазоподобными покрытиями на основе модифицированного углерода // Проблемы здоровья и экологии. 2015. № 2 (44). V.V. Kazbanov, M.S. Batalov, A. A. Vishnevsky Features of biocompatibility and prospects for the use of titanium implants with diamond-like coatings based on modified carbon // Problems of health and ecology. 2015. 2 (44).
10. Fadeeva I.V., Kalita V.I., Komlev D.I., Radiuk A.A., Fomin A.S., Davidova G.A., Fursova N.K., Murzakhanov F.F., Gafurov M.R., Fosca M., Antoniac I.V., Barinov S.M., & Rau J.V. (2020). In Vitro Properties of Manganese-Substituted Tricalcium Phosphate Coatings for Titanium Biomedical Implants Deposited by Arc Plasma. Materials (Basel, Switzerland), 13(19), 4411.
11. Kalinichenko S.G., Matveeva N.Y., Kostiv R.Y., & Edranov S.S. (2019). The topography and proliferative activity of cells immunoreactive to various growth factors in rat femoral bone tissues after experimental fracture and implantation of titanium implants with bioactive biodegradable coatings. Bio-medical materials and engineering, 30(1), 85–95.
12. Matveeva N.Y., Kalinichenko S.G., & Kostiv R.E. (2021). Dynamics of Renewal of Cell Populations of the Bone Tissue on the Surface of Titanium Implants with Bioactive Coating during Fracture Modeling in Rats. Bulletin of experimental biology and medicine, 171(4), 559–565.

Статья поступила / Received 08.09.2022
Получена после рецензирования / Revised 10.09.2022
Принята в печать / Accepted 10.09.2022

Информация об авторах

Долгалева Александр Александрович^{1,2}, д.м.н., доцент, профессор кафедры стоматологии общей практики и детской стоматологии, начальник центра инноваций и трансфера технологий, профессор кафедры клинической стоматологии с курсом ХС и ЧЛХ

E-mail: dolgalev@dolgalev.pro. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6352-6750>

Чониашвили Давид Зурабович³, д.м.н., доцент кафедры терапевтической, хирургической и детской стоматологии с курсом имплантология, реконструктивная хирургия полости рта, детская ЧЛХ, декан медицинского факультета, главный врач

E-mail: davidchoniashvili@mail.ru

Юсупов Руслан Доккаевич⁴, д.м.н., профессор кафедры клинической стоматологии с курсом хирургической стоматологии и ЧЛХ

E-mail: doctoryusupov@mail.ru. ORCID: 0000-0002-6137-2516

Диденко Николай Николаевич^{1,2}, ассистент кафедры патологической физиологии

E-mail: nikolai.n.didenko@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9734-8158>

Амбарцумов Михаил Георгиевич⁵, к.т.н., ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории технологии тонких пленок и наногетероструктур научно-лабораторного комплекса чистых зон Физико-технического факультета

E-mail: ambmg@yandex.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3392-8588>

Сергеев Юрий Андреевич¹, заочный аспирант кафедры стоматологии общей практики и детской стоматологии

E-mail: serg_yuriy@mail.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6183-2586>

¹ Общество с ограниченной ответственностью «Имплант Аддитивные технологии», г. Ставрополь, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения РФ, г. Ставрополь, Российская Федерация

³ ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет имени Коста

Левановича Хетагурова» (СОГУ), г. Владикавказ, Российская Федерация

⁴ ФГБОУ ВО Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал

Волгоградского государственного медицинского университета, г. Пятигорск,

Российская Федерация

⁵ ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», г. Ставрополь,

Российская Федерация

Контактная информация:

Долгалева Александр Александрович. E-mail: dolgalev@dolgalev.pro

Author information

Dolgalev Alexander Alexandrovich^{1,2}, PhD, MD, Head of the Center for Innovation and Technology Transfer, Professor of the Department of General Practice Dentistry and Pediatric Dentistry, Professor of the Department of Clinical Dentistry with a course of OS and MFS

E-mail: dolgalev@dolgalev.pro. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6352-6750>

Choniashvili David Zurabovich³, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Therapeutic, Surgical and Pediatric Dentistry with the course Implantology, reconstructive surgery of the oral cavity, pediatric CHLH; Dean of the Faculty of Medicine, Chief Physician of the Clinical and Diagnostic Center of Dentistry

E-mail: davidchoniashvili@mail.ru

Yusupov Ruslan Dokkaevich⁴, PhD, MD, Head of the Department of Clinical Dentistry with a course of OS and MFS

E-mail: doctoryusupov@mail.ru. ORCID: 0000-0002-6137-2516

Didenko Nikolai Nikolaevich^{1,2}, Assistant, Pathophysiology Department

E-mail: nikolai.n.didenko@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9734-8158>

Ambartsumov Mikhail Georgievich⁵, Ph. D., Leading Researcher of the Thin Films and Nanoheterostructures Technology Research Laboratory of the Clean Zones Scientific Laboratory Complex, Physics and Technology Faculty

E-mail: ambmg@yandex.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9734-8158>

Sergeev Yuriy Andreevich¹, Postgraduate Student, Department of General Practice and Pediatric Dentistry, Stavropol State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Stavropol, Russian Federation

E-mail: serg_yuriy@mail.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6183-2586>

¹ Limited Liability Company «Implant Additive Technologies», Stavropol, Russian Federation

² Stavropol State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation,

Stavropol, Russian Federation

³ FGBOU VO «North Ossetian State University named after Kosta Levonovich

Khetagurov» (SOGU)

⁴ Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute-branch of the Volgograd State

Medical University Pyatigorsk, Russian Federation

⁵ Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «North Cau-

cassus Federal University», Stavropol, Russian Federation

Contact information

Dolgalev Alexander Alexandrovich. E-mail: dolgalev@dolgalev.pro

For citation: Dolgalev A.I., Choniashvili D.Z., Yusupov R.D., Didenko N.N., Ambartsumov M.G., Sergeev Y.A. Evaluation of the proliferative activity of cell cultures on nanostructured coatings for dental implants. Medical alphabet. 2022; (22):7–10. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2022-22-7-10>

