

Влияние физических, химических и биологических манипуляций на поверхностный потенциал кальций-фосфатных покрытий на металлических подложках

Хлусов И.А.¹, Пичугин В.Ф.¹, Гостищев Э.А.², Шаркеев Ю.П.³, Сурменев Р.А.¹, Сурменева М.А.¹, Легостаева Е.В.³, Чайкина М.В.⁴, Дворниченко М.В.¹, Морозова Н.С.¹

The influence of physical, chemical and biological manipulations on surface potential of calcium phosphate coatings on metal substrates

Khlusov I.A., Pichugin V.F., Gostischev E.A., Sharkeyev Yu.P., Surmenev R.A., Surmeneva M.A., Legostayeva Ye.V., Chaikina M.V., Dvornichenko M.V., Morozova N.S.

¹ НОЦ «Биосовместимые материалы и биоинженерия» при Томском политехническом университете и Сибирском государственном медицинском университете, г. Томск

² Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск

³ Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, г. Томск

⁴ Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН, г. Новосибирск

© Хлусов И.А., Пичугин В.Ф., Гостищев Э.А. и др.

Показатели потенциала электростатического поля искусственных поверхностей зависят от технологии нанесения покрытий и могут регулироваться через изменение их физико-химических параметров. Химическая модификация высокочастотных (ВЧ) магнетронных кальций-фосфатных (КФ) покрытий посредством введения силикат-иона привела к возрастанию электростатического потенциала изделий. Усложнение рельефа ВЧ-магнетронных КФ покрытий, зафиксированное по росту индекса шероховатости *Ra*, сопровождалось увеличением электретного потенциала поверхности и его статистической девиации. Взвесь клеток костного мозга в модельном биологическом электролите заполняла углубления КФ покрытий и, таким образом, модулировала амплитуду и выравнивала различия их поверхностного электростатического потенциала.

Ключевые слова: *ex vivo*, миелокарициты, модификация поверхности, поверхностный потенциал.

The electret voltage indices of artificial surfaces are dependent on coatings formation technology and may be regulated by means of change in their physical-chemical parameters. Chemical modification of radio frequency magnetron calcium phosphate coatings (RFMCPC) by means of silicious incorporation led to an augmentation of pieces' electrostatic potential. A complication of RFMCPC relief that was fixed by roughness index *Ra* is accompanied by increase in electret voltage index of artificial surface and its statistical deviation. Bone marrow cells suspension in model biological electrolyte populated RFMCPC dimples. In this manner it modulated the amplitude and leveled out the differences of surface electrostatic potential.

Key words: *ex vivo*, myelokaryocytes, surface modification, surface potential.

УДК 57.089.67:[616-089.844:546.3-19:661.635.411-022.532]:544.632.3-046

Введение

Проблема биосовместимости материалов является весьма актуальной в медицинском материаловедении и инженерии биологических тканей. Особую роль при интеграции имплантата с живыми тканями играют свойства его поверхности [13], важной характеристи-

кой которых является электрическая совместимость на всех уровнях биологической организации живых систем (молекулярном, клеточном, тканевом).

В процессах жизнедеятельности клеток ключевую роль играют как молекулярная, так и (био)физическая, в том числе биоэлектрическая, сигнализация [25, 26]. Электрические поля в тканях регулируют миграцию

[41] и жизнедеятельность клеток. Одним из самых интересных направлений в изучении биоэлектрических сигнальных систем считается контроль поведения стволовых клеток. Исследования показывают, что стволовые клетки в недифференцированном состоянии демонстрируют уникальный профиль электрофизиологических характеристик (транс)мембранного потенциала [22]. Мембранный потенциал клеток связан с их поверхностным зарядом (дзета-потенциалом) [7]. Однако о роли биоэлектрических сигналов в клетках и тканях, не считающихся в настоящее время электровозбудимыми, известно очень мало.

Одним из наиболее изученных феноменов воздействия внешних электрических полей на живые системы в настоящее время рассматривают поляризацию их биологических структур. В литературе представлены многочисленные исследования, в основном зарубежных авторов, по индуцированному дзета-потенциалу и его роли в инженерии биологических тканей на различных искусственных поверхностях [16, 21, 23, 26, 30, 35, 37]. Однако при анализе имеющихся работ не формируется краеугольного для биоинженерии представления о связи и векторе взаимодействия естественных электростатических полей искусственных материалов и биологических клеток и тканей, их зависимости от рельефа и химии поверхности.

Одним из наиболее распространенных классов материалов для биологии и медицины являются композиты, состоящие из кальций-фосфатных (в том числе ионоплазменных) покрытий и металлической подложки [4, 13, 29, 33, 38]. Тем не менее электростатические аспекты их биосовместимости в полной мере не рассматривались.

Исследования свойств изделий *in vitro* считаются необходимым условием их тестирования в приложении к биологии и медицине. В связи с этим изучение влияния физико-химических свойств покрытия и способа его нанесения, а также эффекта культуры клеток на электретный потенциал естественного электростатического поля кальций-фосфатных (КФ) покрытий на металлической подложке представляло первостепенный интерес.

Материал и методы

В экспериментах применяли металлические (титановые или стальные) подложки (диаметр 12 мм, толщина 1 мм), несущие двусторонние КФ покрытия. По-

крытия наносили с помощью модифицированного способа микродугового оксидирования [33], высокочастотного (ВЧ) магнетронного напыления [29] либо абляционной плазмы [8]. Гидроксилapatитовый (ГАП) нанопорошок (диаметр частиц 10—40 нм) и порошок кремнийзамещенного гидроксилapatита (Si-ГАП) с содержанием силикатных групп 4,9 масс% $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_4,28(\text{SiO}_4)_{1,72}(\text{OH})_{0,28}$ для изготовления покрытий получали механохимическим способом, как описано ранее [11].

Исследования морфологии и элементного состава полученных покрытий проводились с использованием сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) Quanta 200 ESEM FEG фирмы FEI со встроенной приставкой энергодисперсионного рентгеновского анализа (EDX). Для определения фазового состава сформированного Si-ГАП покрытия и КФ слоя, не содержащего кремний, рентгенофазовый анализ (РФА) проводился на дифрактометре Shimadzu XRD-7000. Для интерпретации дифрактограмм использовалась база данных International Center for Diffraction Data (ICDD): номер карточки для синтетического ГАП (9-432); для титана (44-1294). РФА показал рентгеноаморфную структуру исследованных покрытий. Для выявления химических связей фосфатной и замещающей групп применялся метод инфракрасной (ИК) спектроскопии. Спектры оптического поглощения получены на приборе Bruker Vertex 70 в диапазоне $400\text{—}4\,000\text{ см}^{-1}$.

Шероховатость поверхности покрытий оценивали по значениям параметров вертикальных неровностей профиля с помощью измерительной системы Talysurf 5-120 (Taylor-Hobson, Великобритания) с разрешающей способностью 10 нм. Определяли *Ra* как среднее арифметическое отклонение профиля в пределах базовой длины 1,5 мм согласно ГОСТ 2789-73.

Тестируемые образцы помещали в лунки (диаметр 22 мм) 12-луночных планшетов (Costar), в каждую лунку добавляли по 1,5 мл равномерно перемешанной клеточной взвеси костного мозга, взятой из бедренных костей мышей линии BALB/c, культивировали при температуре 36 °С, 100%-й влажности в течение 24 ч. Конечная концентрация миелокариоцитов составляла $14 \cdot 10^6$ ядродержащих клеток в 1 мл среды DMEM/F12 («Биолот», г. Санкт-Петербург), применявшейся в качестве модельной электролитной биологической жидкости.

Методы оценки морфологии культивируемых клеток, оптическую и сканирующую электронную микроскопию образцов применяли согласно ранее описанным протоколам [10].

Для исследования электрических параметров биопокровов использовался малогабаритный электронный прибор с цифровым индикатором и автономным питанием от аккумуляторов, разработанный в НИИ интроскопии Томского политехнического университета. Прибор обеспечивает измерение потенциала поля на поверхностях слабозаряженных тел в условиях электростатических воздействий окружающей среды, многократно превышающих уровень измеряемых потенциалов, в частности потенциалов биоэлектрического поля в биологически активных точках кожного покрова человека, сопоставимых с диапазоном потенциалов электрического поля на поверхности биопокровов.

Продольное разрешение прибора определяется диаметром измерительного электрода и составляет 5 мм, диапазон измеряемых потенциалов варьирует от десятков милливольт до сотен вольт. Сопротивление изоляции входа прибора не менее 10^{16} Ом, входная емкость — не более 5 пФ (ГОСТ 25209-82) и удовлетворяет требованиям измерения поля в воздухе.

В основу прибора заложен усовершенствованный метод Егучи (метод подъемного электрода). При установке измерительного электрода на заряженную пластину (биопокровы) толщиной L , находящуюся на заземленной металлической поверхности, на измерительном электроде индуцируется заряд

$$q = C_l V_L, \quad (1)$$

который компенсируется притоком свободных зарядов через нормально замкнутый ключ K .

При разомкнутом положении ключа и установке электрода на заземленную металлическую поверхность на конденсаторах $C_{вх}$ и C_l распределится равный по величине и противоположный по знаку заряд

$$-q = V_{вх} (C_{вх} + C_l), \quad (2)$$

обусловленный свободными зарядами. Приравнявая правые части выражений (1) и (2), получим

$$C_l V_l = V_{вх} (C_{вх} + C_l).$$

Отсюда потенциал $V_{вх}$, индуцируемый на измерительном электроде, будет связан с потенциалом V_L на поверхности пластины соотношением:

$$V_{вх} = \frac{C_l}{C_{вх} + C_l} V_L,$$

где C_l — воздушная емкость между поверхностью образца и измерительным электродом; $C_{вх}$ — входная емкость вольтметра-электрометра (ВЭ); V_L — потенциал на поверхности пластины (биопокровы).

Величина потенциала поля V_l на поверхности образцов определялась как среднее значение из пяти измерений. Измерения проводили при комнатной температуре на сухих образцах (исходный потенциал), а также после их 24-часового контакта с клеточной взвесью или модельной биологической жидкостью. Для этого исследуемые образцы вынимали из клеточной взвеси, сушили до измерения потенциала поверхности в наклонном положении в течение 5 мин.

Полученные результаты выражали как среднее арифметическое X и статистическую девиацию SD . При оценке полученных данных были использованы методы статистического описания, а также методы проверки статистических гипотез. Для анализа имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (критерий Колмогорова—Смирнова). Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали непараметрический U -критерий Манна—Уитни. С целью выявления связи между исследуемыми показателями проводили регрессионный анализ, а также определение коэффициентов ранговой корреляции Спирмена r_s . Различия считались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Перспективным материалом для биомедицинского приложения считается кремнийсодержащий гидроксилпатит $Ca_{10}(PO_4)_{6-x}(SiO_4)_x(OH)_{2-x}$, так как анионы оксида кремния SiO_4^{4-} являются естественной частью межтканевой жидкости [28]. Отмечается, что присутствие силикат-ионов в составе стеклокерамики и гидроксилпатита ускоряет их растворение и остеointеграцию [19]. Описана позитивная реакция остеобла-

стоподобных клеток человека на кремнийсодержащие КФ покрытия [20], в том числе нанесенные методом магнетронного напыления [38].

Считается, что добавление кремния в структуру наночастиц ГАП делает искусственные поверхности после его напыления гидрофильными и отрицательно заряженными [37]. Это характерно для Si-ГАП покрытий, нанесенных на диэлектрическую подложку (стекло) и имеющих довольно рыхлую структуру в виде конгломератов наночастиц, случайно распределенных по поверхности подложки.

В случае ГАП покрытий стехиометрического состава, равномерно нанесенных ВЧ-магнетронным распылением на стальную подложку, электрический потенциал имеет положительный знак. Добавление кремния в виде силикат-иона в состав ГАП сопровождалось возрастанием на 40—126% положительного электростатического потенциала поверхности покрытий (табл. 1) при одинаковой шероховатости (вариации *Ra* в пределах 0,056—0,061 мкм).

Таблица 1

Электростатический потенциал поверхности ВЧ магнетронных кальций-фосфатных покрытий на стальной подложке ($X \pm SD$)

Номер образца	Потенциал, мВ (<i>n</i> = 5)
41	Кальций-фосфатные покрытия, полученные при распылении электрода из гидроксилapatита 350 ± 5
43	207 ± 3
41	Кальций-фосфатные покрытия, полученные при распылении электрода из силикатсодержащего гидроксилapatита 488 ± 10*
43	467 ± 8* <0,00001

Примечание. Здесь и в табл. 2: *n* — число измерений потенциала электрического поля поверхности. Измерение потенциалов на поверхности образцов проводили в пяти областях с диаметром 5 мм в одной геометрии для всех образцов; * — статистические различия согласно *U*-критерию Манна—Уитни с потенциалом соответствующего покрытия без кремния.

На ИК-спектрах покрытий, сформированных ВЧ-магнетронным распылением, присутствуют полосы поглощения, обусловленные колебаниями связей P—O фосфатного тетраэдра в структуре апатита, в области деформационных колебаний — при частотах 473 и 560 см⁻¹, и валентных колебаний этих связей при 950 и 1 024 см⁻¹. Полоса при 510 см⁻¹ на спектре поглощения покрытий с замещением *x* = 1,72 отвечает дефор-

мационным колебаниям связей Si—O; валентные колебания этих связей в области частот 900—1 200 см⁻¹ могут перекрываться интенсивной полосой поглощения фосфатной группы. Вероятно, изменение молекулярной структуры ГАП, обусловленное частичным замещением фосфатного иона в структуре КФ покрытий на силикатный ион SiO₄⁴⁻, влияет на амплитуду их электростатического потенциала.

Электропроводность поверхности способствует протеканию электрохимических реакций, приводящих к растворению имплантатов и покрытий в биологических жидкостях [3]. По-видимому, возрастание электростатического заряда Si-ГАП покрытия способствует его повышенной растворимости, улучшению на 50% (по сравнению с ГАП магнетронной поверхностью стехиометрического состава) роста костной ткани в тесте эктопического костеобразования [6]. При этом быстрое растворение искусственного КФ матрикса является важным компонентом его остеогенной активности [15].

Интересно, что ВЧ магнетронное напыление Si-ГАП на титановую подложку также приводило к положительному по знаку потенциалу электрического поля КФ покрытия (в среднем (256,20 ± 198,55) мВ; *n* = 25). Абсолютные значения величины потенциала покрытий на подложках из титана оказались почти в 2 раза сниженными в сравнении с таковыми для Si-ГАП покрытия на стали (табл. 1). Это обстоятельство отражает влияние подложки на физико-химическое состояние поверхности тонких КФ пленок (толщина менее 1 мкм). В этом плане известно, что поверхностный слой оксида титана на поверхности титановой подложки обладает свойствами диэлектрика [39], в то время как окисный слой на поверхности стали является полупроводником.

При этом отмечена прямая корреляционная связь (*r_s* = 0,66; *p* < 0,0004; *n* = 25) роста потенциала покрытий на титане с индексом их шероховатости *Ra*. Регрессионная зависимость представлена на рис. 1. Из результатов следует, что усложнение геометрии покрытий сопровождается усилением их поверхностного электрогенеза.

Для Si-ГАП магнетронных покрытий на стальной подложке подобной зависимости не выявлено. Одной из причин может служить резкое различие среднего индекса шероховатости Si-ГАП пленок на стали и титане (*Ra* составило соответственно

($0,058 \pm 0,010$) и ($0,790 \pm 0,233$) мкм; $p < 10^{-6}$; $n = 15$) при одинаковой толщине покрытий. Шероховатость поверхности имеет значение для остеогенеза как на клеточном [27], так и тканевом уровнях [9]. В связи с этим одним из факторов, способствующих остеогенным свойствам микрошероховатости имплантатов, являются, по всей видимости, электрические свойства их поверхности.

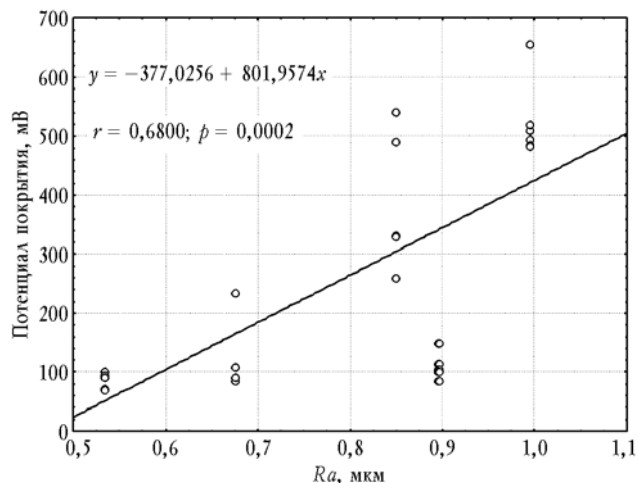


Рис. 1. Связь электростатического потенциала Si-ГАП магнетронного покрытия на титановой подложке с индексом его шероховатости

В то же время при использовании метода абляционного распыления на титане формировался слой Si-ГАП, несущий отрицательный заряд со средним электростатическим потенциалом ($106,65 \pm 8,60$) мВ ($n = 30$). Абляционные КФ пленки на титане, осажденные распылением «чистого» ГАП, имели слабopоложительный потенциал (в среднем 13 мВ) и низкую шероховатость в пределах ($0,192 \pm 0,049$) мкм.

Другими словами, знак и амплитуда потенциала поверхности зависят от технологии нанесения покрытий, могут регулироваться различными способами [3, 16], в том числе через формирование их микрорельефа.

Вопрос о природе носителей заряда в низкотемпературной структурно-чувствительной области пленок, сформированных магнетронным распылением, остается открытым. Электроперенос может быть обусловлен ионами, электронами и дырками.

ГАП керамика представляет собой полупроводник *r*-типа с большой шириной запрещенной зоны, составляющей примерно 4 эВ [31]. Применение метода экзoeлектронной эмиссии, чувствительной к наличию

дефектов в тонких поверхностных слоях, позволило установить, что наноструктурированная кальций-фосфатная поверхность обладает высокой дефектностью. Более того, часть дефектов, представляющих собой центры электронно-дырочного захвата, несут электрический заряд [12]. Вследствие различной подвижности электронов и дырок эти локализованные заряды участвуют в образовании двойного электрического слоя и могут менять потенциал поверхности [3].

Известно, что в случае использования *in vitro* постоянного электрического поля с напряжением в пределах 0,1—1 В/мм остеобласты быстро мигрируют к отрицательному, а остеокласты — к положительному электроду [18]. Аналогичная избирательность остеобластов и остеокластов в отношении знака дзета-потенциала показана большинством исследователей, в частности N. Hamamoto и соавт. [21] и I.O. Smith и соавт. [35]. При напряжении до 1 В поведение клеток *in vitro* регулируется без нарушения состава окружающей питательной среды [30].

Таким образом, технология формирования покрытий может существенно менять характер, например, костеобразования и репаративного ремоделирования кости на модифицированных КФ покрытиях. Ранее обнаружено различное поведение рентгеноаморфных и кристаллических КФ покрытий *in vivo* [2, 9]. Полученные в настоящем исследовании данные предполагают значительный вклад электрофизической компоненты в биомедицинские свойства имплантатов.

Прямое электростатическое взаимодействие считается предиктором прилипания клеток к имплантатам [35]. В принципе, для стимуляции остеогенеза предпочтительнее отрицательный знак дзета-потенциала искусственного материала [34]. Тем не менее на позитивно заряженных Si-ГАП магнетронных покрытиях также отмечается костеобразование [10]. Большую роль в оптимизации и функционализации искусственных поверхностей с различными по знаку зарядами играют белки биологических жидкостей [35].

В связи с этим исследовано *in vitro* взаимодействие костного мозга с покрытием в модельной биологической жидкости, содержащей количество питательных ингредиентов (аминокислот, нуклеотидов, углеводов, витаминов и т.п.) и электролитов, оптимальное для культивирования клеток человека и животных [1]. Были получены экспериментальные ре-

зультаты, фундаментальные основы которых еще только предстоит раскрыть.

Так, 24-часовое осаждение взвеси клеток костного мозга из модельной биологической жидкости на рентгеноаморфные КФ покрытия, сформированные на титановой подложке абляционным способом, приводило к росту дзета-потенциала системы материал — биосреда — клетки от 184 до 326 мВ (ГАП слой) и от -102 до +475 мВ (Si-ГАП слой) соответственно. При этом в случае Si-ГАП пленки различия достигали статистически значимых величин ($p < 10^{-6}$), отмечалась реверсия знака заряда электрического поля с отрицательного на положительный.

Известно, что биологические ткани с низким содержанием телесной жидкости (электролита) (около 15% массы ткани), например костная ткань, обладают незначительной удельной электропроводностью, примерно в 10 раз ниже в сравнении с паренхиматозными тканями (печень, почки, мозг и т.д.), содержание тканевой жидкости в которых достигает 70—80% их массы. Присутствие клеточных элементов уменьшает в 2—3 раза электропроводность биологических электролитов вследствие диэлектрических свойств цитоплазматических мембран [7].

В связи с этим решено дифференцировать влияние культуральной среды и клеточной взвеси на изучаемый показатель. Оказалось, что в случае стальных подложек биологические агенты оказывали выраженный эффект на рост поверхностного потенциала ВЧ магнетронных ГАП, но не Si-ГАП покрытий (рис. 2, табл. 2). При этом отмечалось преимущественное действие растворенных компонентов биологической среды, применяемой для культивирования клеток.

Добавление миелокариоцитов статистически снижало амплитуду дзета-потенциала искусственной КФ поверхности по сравнению с культуральной средой (рис. 2). Подобный результат в достаточной степени предсказуем, если рассматривать слои клеток как диэлектрики, экранирующие электрическое поле в направлении, перпендикулярном к поверхности тести-

руемых образцов. Тем не менее дзета-потенциал системы клетки — покрытие оставался повышенным по сравнению с таковым для исходных искусственных поверхностей (табл. 2).

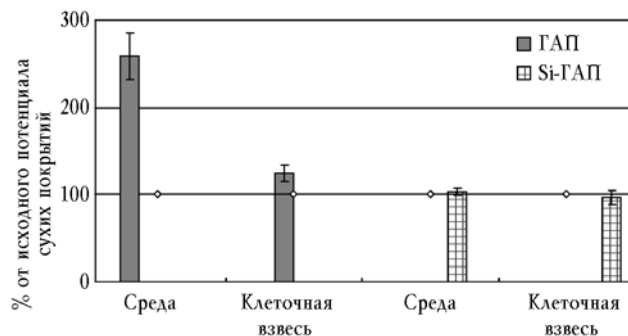


Рис. 2. Электретный потенциал ГАП и Si-ГАП ВЧ магнетронных покрытий на стали после биологических манипуляций *in vitro*. Доверительные интервалы при $p = 0,05$

Одной из гипотез роста электростатического потенциала, опосредованного биологическими объектами, может быть неравномерное распределение зарядов межклеточного вещества вдоль клеточных пластов и искусственной поверхности, формирование неравномерного двойного электрического слоя вследствие биологической компарментализации не только внутриклеточных, но и внеклеточных электролитов. В таком случае можно фиксировать разную величину сигнала, зависящую от приспособления биологических объектов к физико-химическому состоянию искусственной поверхности.

Процесс взаимодействия клеток с искусственной поверхностью очень динамичен [32]. Согласно К. Саи и соавт., шероховатость искусственной поверхности в наномасштабе не влияет на адсорбцию белков и пролиферацию остеобластов [14]. Микрорельеф, напротив, способствует дифференцировке стромальных стволовых клеток в остеобласты *in vitro* [10], костеобразованию *in vivo* [9] и росту электретного потенциала (см. рис. 1).

Таблица 2

Дзета-потенциал поверхности ВЧ магнетронных кальций-фосфатных покрытий на стальной подложке до и после 24-часового взаимодействия с жидкой культурой клеток костного мозга ($X \pm SD$)

Исследуемые образцы (n = 15)	Потенциал, мВ		
	Исходный	После осаждения компонентов	После осаждения компонентов

		культуральной среды	культуральной среды и клеток
ГАП покрытие	367,20 ± 133,40	—	458,80 ± 73,25 [#]
	123,90 ± 281,05	320,00 ± 50,00	<0,032
Si-ГАП покрытие	400,55 ± 181,70	—	386,80 ± 57,60
	313,35 ± 257,00	322,80 ± 19,70	—

[#] Статистические различия согласно *U*-критерию Манна—Уитни с соответствующим исходным потенциалом покрытия.

Проведенное тестирование шероховатости покрытий, изготовленных по различным технологиям (магнетронное напыление, микродуговое оксидирование), показало прямую корреляционную ($r_s = 0,68$; $p < 10^{-6}$; $n = 84$) и регрессионную зависимость (рис. 3) статистического отклонения *SD* показателя *Ra* от его величины в диапазоне 0,5—4,5 мкм.

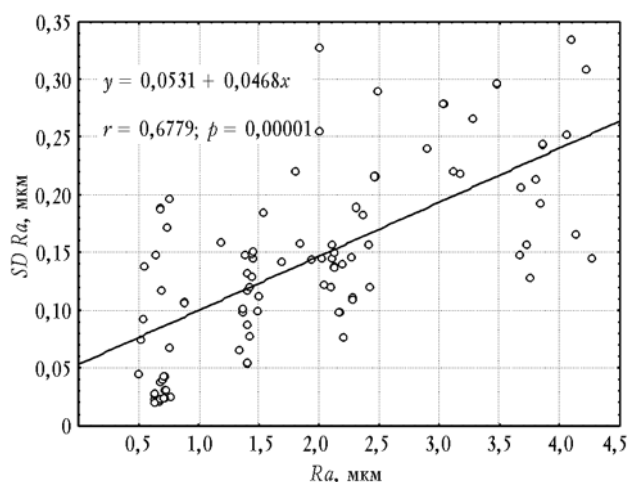


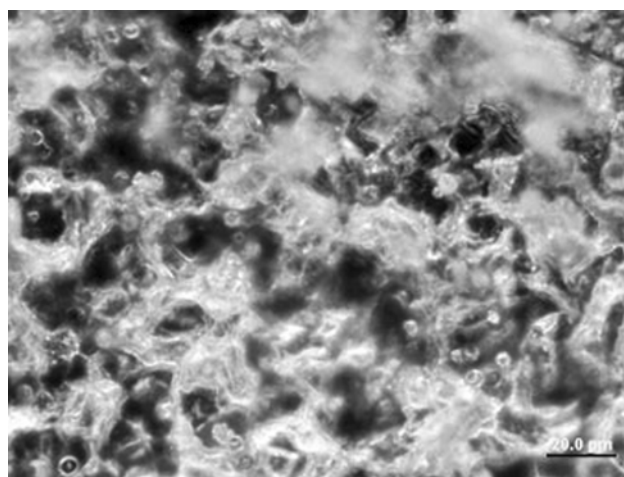
Рис. 3. Регрессионная зависимость статистической девиации индекса шероховатости *Ra* от его амплитуды

Кроме того, с *Ra* коррелирует амплитуда дзета-потенциала (см. рис. 1), следовательно, должна существовать ее связь с разбросом *SD* значений шероховатости, который характеризует при одинаковых отрезках измерений *Ra* увеличение пути индентора вследствие возрастания высоты пиков и впадин покрытия.

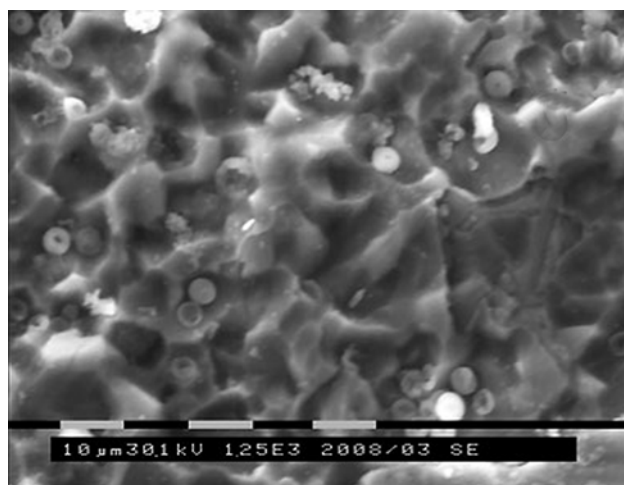
В экспериментах *in vitro* компоненты культуральной среды и клеточная взвесь снижали *SD* дзета-потенциала поверхности в 2 раза и более (см. табл. 2). Предположительно это вызвано заполнением неровностей покрытия биологическим материалом. Действительно, оптическая микроскопия и СЭМ показали, что клетки (рис. 4) заполняют прежде всего углубления КФ поверхности. При большой плотности клеточной культуры будут формироваться неравномерные

по толщине клеточные пласты, сглаживающие рельеф покрытия.

Таким образом, исходя из полученных результатов можно предположить, что клеточная взвесь в питательно-солевом электролите может по-разному себя вести на искусственных поверхностях с различными физическими свойствами. Это обусловлено пластичностью биологического материала и клеточной конкуренцией. Клетки, не сумевшие встроиться в тканевую иерархию, погибают [24].



a



б

Рис. 4. Топография клеток костного мозга мышей на ВЧ магнетронном кальций-фосфатном покрытии: *а* — оптическая темнопольная микроскопия в отраженном свете клеток, окрашенных азуром (маркер 20 мкм, ув. 1 000); *б* — растровая электронная микроскопия (маркер 10 мкм, ув. 1 250)

При этом, согласно данным W.-S. Yeo, M. Mrksich, индуцированный знакопеременный дзета-потенциал с амплитудой 650 мВ, близкой к выявленному потенциалу спонтанного электрического поля КФ покрытий (см. табл. 1), позволяет управлять взаимодействием популяций клеток с искусственным материалом [40].

Кроме того, знакопеременные по заряду поверхности приводят к различной адсорбции молекул экстрацеллюлярного матрикса [35], несущего важнейшую информацию для жизнедеятельности клеток от стволовых до зрелых форм. Матрикс принимает активное участие в поддержании клеточного фенотипа, влияет на морфологические (форма, полярность) и функциональные (адгезия, подвижность, пролиферация, дифференцировка) свойства клеток [17]. Как следствие, могут формироваться клеточные пласты, которые в перпендикулярном к покрытию направлении диэлектрически экранируют и снижают амплитуду дзета-потенциала. С другой стороны, за счет неравномерного распределения зарядов (ионов) между горизонтальными слоями клеток и в отдельных их зонах электростатические свойства искусственных покрытий могут возрастать. Этому должны способствовать «нанопространства», формирующиеся при взаимодействии клеток между собой и с подложкой [36].

Что касается неоднородности клеток по амплитуде и знаку поверхностных зарядов [21, 30], то обнаружено, что вследствие микрорельефа и заряда поверхности в разных участках покрытия способна сосредотачиваться различная по массе и свойствам клеточная взвесь. Это стабилизирует колебания потенциала поверхности и, с другой стороны, формирует структурно-функциональную мозаичность костного мозга, известную как домены [5]. С биологической точки зрения доменная структура клеточной взвеси говорит о начальных этапах самосборки биологической ткани на имплантате. С точки зрения электрофизики доменная структура (компарментализация) позволяет предполагать наличие у костного мозга, как и у других биологических тканей [7], сегнетоэлектрических свойств.

Важным следствием экспериментов является то обстоятельство, что амплитуда поверхностного, по

сути, дзета-потенциала КФ покрытий на металле и, возможно, его знак связаны с параметрами их шероховатости (см. рис. 1). Это позволяет надеяться на создание естественных электрических полей для регуляции активности клеток человека и животных, в том числе их стволовых форм, на искусственных материалах и покрытиях за счет целенаправленного формирования геометрии их поверхности без применения дополнительных технологических воздействий.

Заключение

Знак и амплитуда потенциала поверхности зависят от технологии нанесения покрытий и могут регулироваться через изменение их физико-химических параметров. Так, химическая модификация КФ поверхности посредством введения силикат-иона приводит к возрастанию электростатического потенциала изделий.

Усложнение рельефа ВЧ магнетронных КФ покрытий, зафиксированное по росту индекса шероховатости *Ra* в диапазоне 0,5—1 мкм, сопровождается линейным усилением их электростатического потенциала.

Взвесь клеток костного мозга в модельном биологическом электролите заполняет углубления КФ покрытий и, таким образом, модулирует амплитуду и выравнивает разброс их поверхностного электростатического потенциала.

Исследование выполнено при поддержке федеральных целевых программ «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг. (государственный контракт П861 от 25.05.2010), «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007—2012 гг.» (государственный контракт № 16.512.11.2087), грантов президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых — кандидатов наук (государственный контракт МК_6360.2010.8), аналитической ведомственной целевой программы (АВЦП) «Развитие научного потенциала высшей школы на 2009—2011 гг.» (регистрационный номер проекта 2.1.1/14204), гранта № 5ФНМ-27 программы Президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине», интеграционного проекта № 126 СО РАН и гранта РФФИ № 09-04-00287а.

Литература

1. *Введение* в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей / под ред. В.В. Новицкого, В.П. Шахова, И.А. Хлусова. Томск: STT, 2004. 386 с.
2. Карлов А.В., Хлусов И.А. Зависимость процессов репаративного остеогенеза от поверхностных свойств имплантатов для остеосинтеза // *Гений ортопедии*. 2003. № 3. С. 46—51.
3. Карлов А.В., Шахов В.П. Системы внешней фиксации и регуляторные механизмы оптимальной биомеханики. Томск: STT, 2001. 480 с.
4. Карлов А.В., Хлусов И.А., Зайцев К.В. и др. Взаимодействие *in vivo* остеогенных клеток с наноструктурными кальций-фосфатными покрытиями при электронно-индуцированном изменении их поверхностного электрического потенциала // *Бюл. СО РАМН*. 2010. Т. 30, № 3. С. 105—112.
5. Конопляников А.Г. Радиобиология стволовых клеток. М.: Энергоатомиздат, 1984. 120 с.
6. Пичугин В.Ф., Сурменева М.А., Сурменев Р.А. и др. Исследование физико-химических и биологических свойств кальций-фосфатных покрытий, созданных методом ВЧ-магнетронного распыления кремнийзамещенного гидроксилатапата // *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования*. 2010 (в печати).
7. Самойлов В.О. Медицинская биофизика. СПб.: СпецЛит, 2007. 560 с.
8. Струц В.К., Петров А.В., Матвиенко В.М. и др. Свойства кальций-фосфатных покрытий, осаждаемых из абляционной плазмы, создаваемой мощными ионными пучками // *Взаимодействие ионов с поверхностью (ВИП-2009): сб. науч. трудов. Т. 2*. М.: Галлея-принт, 2009. С. 402—405.
9. Хлусов И.А., Карлов А.В., Шаркеев Ю.П. и др. Остеогенный потенциал мезенхимальных стволовых клеток костного мозга *in situ*: роль физико-химических свойств искусственных поверхностей // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2005. № 3. С. 164—173.
10. Хлусов И.А., Хлусова М.Ю., Зайцев К.В. и др. Пилотное исследование *in vitro* параметров искусственной ниши для остеогенной дифференцировки пула стромальных стволовых клеток человека // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2010. № 4. С. 216—224.
11. Чайкина М.В., Хлусов И.А., Карлов А.В., Пайчадзе К.С. Механохимический синтез нестехиометрических и замещенных апатитов с наноразмерными частицами для использования в качестве биосовместимых материалов // *Химия в интересах устойчивого развития*. 2004. Т. 12. С. 389—399.
12. Aronov D., Rosenman G. Traps states spectroscopy studies and wettability modification of hydroxyapatite nano-bioceramics // *J. Appl. Phys.* 2007. V. 101. P. 034701.
13. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 2nd edition / ed. by B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. 851 p.
14. Cai K., Bossert J., Jandt K.D. Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation? // *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 2006. V. 49, № 2. P. 136—144.
15. Damien C.J., Ricci J.L., Christel P. et al. Formation of a calcium phosphate-rich layer on absorbable calcium carbonate bone graft substitutes // *Calcif. Tissue Int.* 1994. V. 55. P. 151—158.
16. Dekhtyar Yu., Dvornichenko M.V., Karlov A.V. et al. Electrically functionalized hydroxyapatite and calcium phosphate surfaces to enhance immobilization and proliferation of osteoblasts *in vitro* and modulate osteogenesis *in vivo* // *WC 2009 / O. Dössel and W.C. Schlegel (eds.)*. V. 25. Springer, 2009. P. 245—248.
17. Discher D.E., Mooney D.J., Zandstra P.W. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells // *Science*. 2009. V. 324. P. 1673—1677.
18. Ferrier J., Ross S.M., Kanehisa J., Aubin J.E. Osteoclasts and osteoblasts migrate in opposite directions in response to a constant electrical field // *J. Cell. Physiol.* 1986. V. 129. № 3. P. 283—288.
19. Gibson I.R., Best S.M., Bonfield W. Chemical Characterization of Silicon-Substituted Hydroxyapatite // *J. Bio. Mater. Res. Symp.* 1999. V. 44. P. 422—428.
20. Gomes P.S., Botelho C., Lopes M.A. et al. Evaluation of human osteoblastic cell response to plasma-sprayed silicon-substituted hydroxyapatite coatings over titanium substrates // *J. of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials*. 2010. V. 948. Issue 2. P. 337—346.
21. Hamamoto N., Hamamoto Y., Nakajima T., Ozawa H. Histological, histochemical and ultrastructural study on the effects of surface charge on bone formation in the rabbit mandible // *Arch. Oral Biol.* 1995. V. 40, № 2. P. 97—106.
22. Heubach J.F., Graf E.M., Leutheuser J. et al. Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells // *Journal of Physiology*. 2004. V. 554. P. 659—672.
23. Johnson L.A. Competitive interactions between cells: death, growth and geography // *Science*. 2009. V. 324, № 5935. P. 1679—1682.
24. Iwasa F., Hori N., Ueno T. et al. Enhancement of osteoblast adhesion to UV-photofunctionalized titanium via an electrostatic mechanism // *Biomaterials*. 2010. V. 31, № 10. P. 2717—2727.
25. Levin M. Large-scale biophysics: ion flows and regeneration // *Trends in Cell Biology*. 2007. V. 17. P. 261—270.
26. McCaig C.D., Rajnicek A.M., Song B., Zhao M. Controlling cell behavior electrically: Current views and future potential // *Physiological Reviews*. 2005. V. 85. P. 943—978.
27. Meyer U., Buchter A., Wiesmann H.P. et al. Basic reactions of osteoblasts on structured material surface // *European Cells and Materials*. 2005. V. 9. P. 39—49.
28. Morks M.F. Fabrication and characterization of plasma-sprayed HA/SiO₂ coatings for biomedical application // *J. Mech. Beh. Bio. Mater.* 2008. S. 1. P. 105—111.
29. Pichugin V.F., Eshenko E.V., Surmenev R.A. et al. Application of High-Frequency Magnetron Sputtering to Deposit Thin Calcium-Phosphate Biocompatible Coatings on a Titanium Surface // *Journal of Surface Investigation. X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques*. 2007. V. 1, № 6. P. 679—682.
30. Qiu Q., Sayer M., Kawaja M. et al. Attachment, morphology, and protein expression of rat marrow stromal cells cultured on charged substrate surfaces // *J. Biomed. Mater. Res.* 1998. V. 42, № 1. P. 117—127.

31. *Rosenman G., Aronov D.* Wettability engineering and bioactivation of hydroxyapatite nanoceramics // Intern. Tech. Proc. Nanotech. Conf. Boston, 2006. V. 2. P. 91—94.
32. *Scarano A., Degidi M., Iezzi G. et al.* Maxillary sinus augmentation with different biomaterials: a comparative histologic and histomorphometric study in man // Implant Dent. 2006. V. 15. P. 197—207.
33. *Sharkeev Yu.P., Legostaeva E.V., Eroshenko A.Yu. et al.* The structure and physical and mechanical properties of a novel biocomposite material, nanostructured titanium-calcium-phosphate coating // Composite Interfaces. 2009. V. 16. P. 535—546.
34. *Smeets R., Kolk A., Gerressen M. et al.* A new biphasic osteoinductive calcium composite material with a negative Zeta potential for bone augmentation // Head Face Med. 2009. V. 5, № 13. (PMCID: PMC2706807; doi: 10.1186/1746-160X-5-13).
35. *Smith I.O., Baumann M.J., McCabe L.R.* Electrostatic interactions as a predictor for osteoblast attachment to biomaterials // J. Biomed. Mater. Res. A. 2004. V. 70. P. 436—441.
36. *Sniadecki N.J., Desai R.A., Ruiz S.A., Chen C.S.* Nanotechnology for cell-substrate interactions // Annals of Biomedical Engineering. 2006. V. 34. P. 59—74.
37. *Thian E.S., Ahmad Z., Huang J. et al.* The role of surface wettability and surface charge of electrosprayed nanoapatites on the behaviour of osteoblasts // Acta Biomater. 2010. V. 6. P. 750—755.
38. *Thian E., Huang J., Best S. et al.* The response of osteoblasts to nanocrystalline silicon-substituted hydroxyapatite thin films // Biomaterials. 2006. V. 27. P. 2692—2698.
39. *Thull R.* Titan in der Zahnheilkunde-Grundlagen // Z. Mitteilungen. 1992. V. 82. P. 39—45.
40. *Yeo W.-S., Mrksich M.* Electroactive Self-Assembled Monolayers that Permit Orthogonal Control over the Adhesion of Cells to Patterned Substrates // Langmuir. 2006. V. 22. P. 10816—10820.
41. *Zhao M., Song B., Pu J. et al.* Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-c and PTEN // Nature. 2006. V. 442. P. 457—460.

Поступила в редакцию 11.03.2011 г.

Утверждена к печати 01.04.2011 г.

Сведения об авторах

И.А. Хлусов — д-р мед. наук, профессор кафедры морфологии и общей патологии СибГМУ, научный руководитель НОЦ «Биосовместимые материалы и биоинженерия» (г. Томск).

В.Ф. Пичугин — д-р физ.-мат. наук, профессор, зав. кафедрой теоретической и экспериментальной физики НИ ТПУ, научный руководитель НОЦ «Биосовместимые материалы и биоинженерия» (г. Томск).

Э.А. Гостищев — канд. техн. наук, ст. науч. сотрудник НИ ТПУ (г. Томск).

Ю.П. Шаркеев — д-р физ.-мат. наук, профессор, зав. лабораторией физики наноструктурных биосовместимых композитов ИФПМ СО РАН (г. Томск).

Р.А. Сурменев — канд. физ.-мат. наук, ассистент кафедры теоретической и экспериментальной физики НИ ТПУ (г. Томск).

М.А. Сурменева — аспирант, инженер кафедры теоретической и экспериментальной физики НИ ТПУ (г. Томск).

Е.В. Легостаева — канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотрудник лаборатории физики наноструктурных биосовместимых композитов ИФПМ СО РАН (г. Томск).

М.В. Чайкина — д-р хим. наук, ведущий науч. сотрудник Института химии твердого тела и механохимии СО РАН (г. Новосибирск).

М.В. Дворниченко — канд. мед. наук, докторант кафедры патофизиологии СибГМУ, инженер кафедры теоретической и экспериментальной физики НИ ТПУ (г. Томск).

Н.С. Морозова — магистрант кафедры теоретической и экспериментальной физики НИ ТПУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Хлусов Игорь Альбертович, тел. 8-913-823-39-62; e-mail: khlusov63@mail.ru