

УДК 661.882.27:666.651.4:616089.843

ВЛИЯНИЕ БИОАКТИВНЫХ ОСТЕОГЕНЕРИРУЮЩИХ ПОКРЫТИЙ, ФОРМИРУЕМЫХ НА МЕТАЛЛИЧЕСКИХ ИМПЛАНТАТАХ, НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

¹Кузнецова Т.А., ¹Запорожец Т.С., ¹Смолина Т.П., ¹Беседнова Н.Н., ²Пузь А.В.,
²Синебрюхов С.Л., ²Гнеденков С.В.

¹Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова,
Владивосток, e-mail: niem_vl@mail.ru;

²Институт химии ДВО РАН, Владивосток, e-mail: chemi@ich.dvo.ru

Изучено влияние биоактивных кальций-фосфатных покрытий, формируемых на технически чистом титане BT1-0 с использованием технологии плазменного электролитического оксидирования (ПЭО), на функции клеток врожденного иммунитета. Установлено, что функциональная активность полиморфноядерных лейкоцитов периферической крови человека (Нф) зависит от способа обработки покрытий. В результате контакта Нф *in vitro* с образцом, представленным технически чистым титаном, и образцом, сформированным на сплаве титана методом ПЭО в биполярном режиме, зарегистрированы значимые изменения функционального состояния клеток. Это выражалось в усилении плотности активационных молекул CD69, CD38, CD11b на клеточных мембранах с одновременным shedding CD62L и увеличении показателей фагоцитарной и бактерицидной активности Нф. Под влиянием композиционного покрытия, полученного путем запечатывания пор ПЭО-слоя ультрадисперсным политетрафторэтиленом, нанесенным электрофоретическим методом, активность Нф не изменялась по сравнению с контролем, что свидетельствует об отсутствии реакции со стороны клеток врожденного иммунитета и, следовательно, о лучшей биосовместимости этого покрытия.

Ключевые слова: имплантационные материалы, покрытия, гидроксипатит, биосовместимость, врожденный иммунитет, нейтрофильные лейкоциты, маркеры активации, фагоцитарная и бактерицидная активность

THE EFFECT OF BIOACTIVE OSTEO-GENERATING COATINGS ON METAL IMPLANTS ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF INNATE IMMUNITY CELLS

¹Kuznetsova T.A., ¹Zaporozhets T.S., ¹Smolina T.P., ¹Besednova N.N., ²Puz A.V.,
²Sinebryuhov S.L., ²Gnedenkov S.V.

¹G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok,
e-mail: niem_vl@mail.ru;

²Institute of Chemistry FEB RAS, Vladivostok, e-mail: chemi@ich.dvo.ru

The influence of bioactive calcium phosphate coatings formed on commercially pure titanium BT1-0 using the technology of plasma electrolytic oxidation (PEO) on the function of innate immunity cells were studied. It was found that the functional activity of human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes (NF) depend on the processing method of coatings. As a result, the significant changes in the functional state of the NF were registered when cells were incubated with the sample of commercially pure titanium and with the sample of coating formed on the titanium by PEO. The cells reaction expressed in enhancing density of activation molecules CD69, CD38, CD11b on the membranes with CD62L shedding and in increasing of phagocytic and bactericidal activity. NF activity did not differ compared to control when cells were incubated with composite PEO-coating with superdispersed polytetrafluoroethylene. These findings indicate on the absence of reaction of innate immunity cells and, consequently, on the best biocompatibility of this coating.

Keywords: implants, coatings, hydroxyapatite, biocompatibility, innate immunity, neutrophils, activation markers, phagocytic and bactericidal activity

В современной медицине широко используются искусственные материалы (имплантаты) для замены поврежденной костной ткани. Введение имплантата в организм всегда связано с риском микробного инфицирования. Инфекционные осложнения, источниками которых могут быть микроорганизмы, присутствующие в операционных, хирургический персонал, оборудование, резидентная микрофлора на коже пациента, очаги хронических инфекций внутри его организма, являются серьезной проблемой в ортопедии. Они требуют необходимости замены имплантата, а в тяжелых случаях, могут стать причиной

ампутации конечности и смерти больного. В основе нежелательного влияния имплантационных материалов лежит каскад событий, проявляющихся в активации иммунокомпетентных клеток, усилении продукции цитокинов и протеолитических ферментов и др., характерных для воспалительной реакции и приводящих к развитию патологического состояния [6].

С учетом этого, имплантационные материалы должны соответствовать ряду требований: структурной и поверхностной совместимостью с тканями организма, способностью к биодеградации, свойствами

по обеспечению диффузии питательных веществ и удалению продуктов жизнедеятельности клеток, антикоррозийностью, но прежде всего они должны быть нетоксичными и биологически инертными [4, 6]. К числу материалов, широко используемых в имплантационной хирургии относятся титан и его сплавы [1, 2].

С целью повышения прочности имплантационных материалов, улучшения процессов остеоинтеграции и предотвращения нежелательных реакций, на имплантат наносят покрытия, состоящие из родственных организму материалов. К таким покрытиям относятся соединения на основе фосфатов кальция (гидроксиапатиты), физические и химические свойства которых обеспечивают биосовместимость, стимуляцию остеогенеза и восстановление костной ткани [2, 4]. Для нанесения покрытий используют такие методы, как золь-гель технология, анодирование, электроосаждение, плазменное напыление, плазменное электролитическое окисление (ПЭО) и др. Метод ПЭО позволяет формировать на поверхности изделий слои, включающие в свой состав как элементы матрицы (оксидируемого металла), так и элементы электролита [2].

Ранее нами установлено, что пористая поверхность кальциево-фосфатных покрытий, сформированных на поверхности имплантатов методом ПЭО, по минеральному составу и механическим характеристикам приближается к характеристикам костной ткани и обеспечивает стимуляцию остеогенеза [1]. В то же время безопасность, биосовместимость и функциональность покрытий зависят от реакции иммунной системы на имплантат [6]. В этой связи актуален поиск имплантационных материалов, отвечающих предъявляемым к ним требованиям, в частности препятствующих развитию воспалительной реакции и патологического состояния. Понимание сложных взаимодействий организма человека и имплантатов вызывает необходимость исследования реакции иммунной системы и в первую очередь нейтрофильных лейкоцитов (Нф) как основных эффекторных клеток врожденного иммунитета.

Целью работы явилось изучение влияния биоактивных кальций-фосфатных покрытий, формируемых на технически чистом титане ВТ1-0 с использованием технологии ПЭО, на функциональную активность Нф периферической крови человека.

Материалы и методы исследования

В качестве материала для нанесения покрытия использовался технически чистый титан марки ВТ1-0 (Fe 0,25%; Si 0,12%; C 0,07%; O 0,12%; N 0,04%;

H 0,01%, остальное Ti). Перед окисдированием образцы покрытий в виде дисков с площадью поверхности 49 мм² и толщиной 1 мм обрабатывали механическим способом, освобождая поверхность от различных дефектов, промывали в дистиллированной воде и обезжиривали спиртом (образец 1). Плазменное электролитическое окисдирование проводили в биполярном режиме [1, 2] в электролите, содержащем 30 г/л глицерофосфата кальция (C₃H₇O₆P)Ca·2H₂O и 40 г/л ацетата кальция Ca(CH₃COO)₂·H₂O (образец 2). Согласно данным рентгенофазового анализа, в состав покрытия входит гидроксиапатит Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂. Для запечатывания пор ПЭО-слоя и создания композиционного полимерсодержащего покрытия использовали ультрадисперсный политетрафторэтилен (УПТФЭ, торговая марка Форум®), полученный методом термостатического синтеза (метод разработан в лаборатории фторидных материалов Института химии ДВО РАН). Нанесение полимера на ПЭО-покрытие осуществляли двумя способами. При использовании 1-го образца на 15 секунд погружали в суспензию на основе изопропилового спирта, содержащую частицы УПТФЭ размером 0,2–0,6 мкм (100–150 г/л) и смачиватель ОП-10 (6,0–8,0 г/л). После полного испарения изопропилового спирта с поверхности, образец подвергали термической обработке при 200–250 °С в течение 3 минут (образец 3). При 2-ом способе нанесение полимера осуществляли электрофоретическим методом с последующей термообработкой композиционного покрытия в муфельной печи при 315 °С в течение 15 минут (образец 4). Концентрация частиц в используемой суспензии составляла 20 г/л. Напряжение электрофоретического осаждения частиц полимера на ПЭО-слой поддерживалось потенциостатически при значении 200 В.

Стерилизацию образцов осуществляли в 70% этаноле в течение 30 минут, а затем в ламине под лампой УФ0 по 20 мин с каждой стороны образца.

Влияние покрытий на экспрессию поверхностных маркеров Нф осуществляли с использованием культуры лейкоцитов периферической крови здоровых доноров. Кровь разводили 1:2 полной питательной средой RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 0,01 M HEPES, 200 mM L-глутамин, 100 мг/мл гентамицина, и вносили в стерильные пластиковые 24-луночные планшеты («CellStar») с образцами покрытий, инкубировали при 37°С в течение 20 час с 5% CO₂, затем кровь ресуспендировали, переносили по 100 мкл в цитометрические пробирки и добавляли по 10 мкл моноклональных антител к поверхностным антигенам лейкоцитов периферической крови CD69-PE, CD11Bb-FITC, CD62L-FITC, CD38-PE, а также соответствующих изотипических контролей («Beckman Coulter»). Лизис эритроцитов производили с помощью раствора (BD FACS™ Lysing Solution). Клетки анализировали на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» (Becton Dickinson, США). Гейтирование субпопуляций гранулоцитов (основную часть которых составляют Нф), осуществляли по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию. В каждой пробе анализировали не менее 10⁴ клеток. Результаты, отражающие плотность молекул на поверхности клеток, представлены в виде условных единиц средней интенсивности флуоресценции (MFI – mean fluorescence intensity).

Влияние образцов на фагоцитарную и бактерицидную активность исследовали по методике, описанной [3], с этой целью из крови здоровых доноров

выделяли лейкозвесь путем седиментации эритроцитов и доводили до конечной концентрации 2×10^6 /мл, клетки инкубировали с образцами при 37°C в течение 1 часа и 20 час. Объектом фагоцитоза служил латекс 1,5 мкм (10% полистерольная суспензия, ДИА-М, Россия) в разведении 1:80. Учет результатов осуществляли микроскопически путем подсчета 100 клеток. Полученные результаты оценивали по фагоцитарному показателю (ФП%) – процент клеток, участвующих в фагоцитозе и фагоцитарному числу (ФЧ) – среднее число латексных частиц, поглощенных одним фагоцитом. Бактерицидную активность Нф (продукцию активных форм кислорода) исследовали в тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) спектрофотометрическим методом. Результаты рассчитывали в виде разницы значений оптических плотностей, получаемых при длине волны 620 нм и 492 нм на спектрофотометре «Multiscan RC «Labsystems». В качестве контроля использовали лейкозвесь, инкубируемую в физиологическом растворе без имплантатов.

Статистическую обработку цифровых данных проводили с помощью пакета программы «Statistica-7». Критическое значение уровня значимости принималось равным 5% ($p < 0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение

При инкубировании исследуемых образцов имплантационных материалов с цельной кровью наблюдались выраженные изменения функционального состояния Нф, регистрируемые по экспрессии поверхностных антигенов. Так, при контакте в течение 20 час с образцами 1, 2 и 3 выявлено статистически значимое увеличение по сравнению с контролем плотности маркеров активации CD69 и CD38 и молекул CD11b, относящихся к семейству β_2 -интегринов, на мембране Нф. Кроме того активация Нф сопровождалась снижением плотности молекул L-селектина (CD62L), что является отражением процесса шеддинга (слущивания с мембраны) и свидетельствует о готовности Нф к миграции (табл. 1).

Таблица 1

Экспрессия поверхностных антигенов нейтрофильных лейкоцитов под влиянием имплантационных материалов

№ образца	Антигены (маркеры) клеточной мембраны (MFI)			
	CD69	CD11Bb	CD62L	CD38
1	25,6±4,2*	1888±380**	33,4±19,0**	27,5±3,5*
2	24,4±2,8*	1853±67**	33,5±4,5**	26,5±3,5*
3	14,2±0,5**	1262±197*	59,4±21,5*	23,2±0,5*
4	8,5±2,1	563±24,3	99,8±11,5	17,5±2,1
Контроль (клетки без имплантатов)	7,5±0,7	573,5±9,1	105,6±25,0	15,5±0,7

Примечание. Показатели $M \pm \sigma$; $n=5$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (значимость различий по отношению к контрольным показателям).

Наибольшие показатели активации Нф наблюдались под влиянием технически чистого титана марки BT1-0 (образец 1) и покрытия на сплаве титана, нанесенного методом ПЭО (образец 2). Инкубирование клеток в присутствии покрытия, нанесенного путем погружения в суспензию, содержащую частицы УПТФЭ и последующей термообработкой (образец 3) привело к аналогичным изменениям в экспрессии поверхностных антигенов клеточной мембраны Нф. Под воздействием композиционного покрытия, полученного путем запечатывания пор ПЭО-слоя УПТФЭ, нанесенным электрофоретическим методом, (образец 4) показатели функциональной активности Нф значимо не отличались от таковых в контрольных образцах (табл. 1).

При исследовании фагоцитарной активности Нф было установлено, что по истечении 1 часа инкубирования лейкозвеси (контроль) с частицами латекса ФП составил $72,6 \pm 2,8\%$; ФЧ – $2,8 \pm 0,29$. В результате контакта лейкоцитов с образцами 1, 2 и 3 выявлено статистически значимое увеличение ФП и ФЧ

($p < 0,05$), при этом наибольшую стимуляцию поглотительной активности фагоцитов вызывал образец 1. При контакте Нф с образцом 4 показатели фагоцитарной активности значимо не отличались от контрольных (табл. 2).

Через 20 час инкубирования интактных Нф (контроль) функциональная активность снижалась. При контакте клеток с образцами 1, 2 и 3 показатели ФП и ФЧ значительно снижались по отношению к контрольным ($p < 0,05$), свидетельствуя об угнетении способности Нф к фагоцитозу. Показатели фагоцитарной активности Нф, инкубированных с образцом 4, значимо не отличались от таковых у интактных клеток (табл. 2).

В отношении показателей бактерицидной активности, регистрируемых в НСТ-тесте, выявлено, что под влиянием образцов 1 и 2 наблюдалось их статистически значимое увеличение по сравнению с контролем ($p < 0,05$), свидетельствующее об усилении продукции активных форм кислорода. При инкубировании лейкозвеси с образцами 3 и 4 показатели НСТ-теста не отличались от контрольных (табл. 2).

Таблица 2

Показатели фагоцитарной и бактерицидной активности нейтрофильных лейкоцитов под влиянием имплантационных материалов

№ образца	ФП (%)		ФЧ (усл. ед.)		НСТ (ODx10 ⁻³)
	1 час	20 час	1 час	20 час	1 час
1	90,4±5,6*	28,2±2,9*	4,1±0,26*	0,52±0,05*	0,842±0,04*
2	86,2±4,8*	36,2±3,3*	3,7±0,39*	0,75±0,04*	0,871±0,05*
3	88,8±5,9*	33,4±3,8*	3,9±0,35*	0,78±0,05*	0,624±0,06
4	74,2±3,8	57,6±3,7	3,2±0,32	1,51±0,08	0,605±0,04
Контроль (клетки без имплантатов)	72,6±2,8	55,2±3,7	2,8±0,29	1,39±0,09	0,564±0,04

Примечание. Показатели M±m; n=5; * p < 0,05 (значимость различий по отношению к контрольным показателям).

При оценке биосовместимости имплантационных материалов важное значение имеет исследование реакции на имплантат клеток врожденного иммунитета, в частности Нф. Непосредственно после введения имплантатов, провоспалительные клетки, преимущественно Нф, мигрируют из крови к объекту имплантации. Движение (таксис) Нф начинается с серии адгезионных событий, каждое из которых связано с изменением экспрессии определенного типа поверхностных молекул и определяет дальнейшие особенности активации и осуществление эффекторных функций этих клеток [5]. Достигая имплантата, Нф взаимодействуют с его поверхностью, индуцируя фагоцитарную реакцию и дегрануляцию, продуцируют протеолитические ферменты, факторы активации моноцитов, макрофагов, незрелых дендритных клеток и лимфоцитов [7, 8], повреждая окружающие ткани и пролонгируя воспалительную реакцию, а также вызывая повреждение поверхности имплантационных материалов. Другим нежелательным (отрицательным) эффектом активации Нф биоматериалом является индуцированное метаболическое истощение и разрушение окислительных ресурсов Нф. Вследствие непрерывного высвобождения активных форм кислорода способность Нф к киллингу микробов резко снижается, что связано с индуцированными биоматериалом инфекциями [8, 9].

Выявленная нами активация Нф в результате их контакта с образцами имплантационных материалов 1, 2, 3 регистрировалась как по экспрессии поверхностных антигенов, так и при оценке фагоцитарной и бактерицидной функций. Активация Нф, наблюдаемая при краткосрочном контакте с образцами 1 и 2, сопровождалась последующим снижением показателей, что свидетельствует об истощении функциональных резервов клеток. В тоже время при инку-

бировании клеток с образцом 4 показатели функциональной активности Нф сохранились на уровне интактного контроля на протяжении 20 часов контакта.

Заключение

Таким образом, в настоящем исследовании показано, что изменение поверхности имплантатов, улучшающее их остеогенный потенциал, не приводит к ухудшению показателей, характеризующих биосовместимость материала.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 14-33-00009) и Федерального агентства научных организаций.

Список литературы

1. Гнеденков С.В., Шаркеев Ю.П., Синебрюхов С.Л. и др. Функциональные покрытия для имплантационных материалов // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2012. – № 1. – С.12-19.
2. Гнеденков С.В., Синебрюхов С.Л., Сергиенко В.И. Композиционные многофункциональные покрытия на металлах и сплавах, формируемые плазменных электролитическим окислением. – Владивосток: Дальнаука, 2013. – 460 с.
3. Хаитов, Р.М. Экологическая иммунология / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин, Х.И. Истамов. – М.: ВНИРО, 1995. – 219 с.
4. Хлусов И.А., Сурменова М.А., Сурменев Р.А. и др. Клеточно-молекулярные аспекты иммунологической совместимости имплантов с наноструктурным кальций-фосфатным покрытием // Бюлл. Сибирской медицины. – 2012. – №4. – С.78-85.
5. Beutler B. Innate immunity: an overview // J. Molecular Immunology. 2004. Vol.40. P. 845–859.
6. Franz S., Rammelt S., Scharnweber D., Simon J. Immune responses to implants – A review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials // Biomaterials. 2011. Vol.32. P. 6692–6709.
7. Kobayashi S.D., Voyich J.M., Burlak C., DeLeo F.R. Neutrophils in the innate immune response // Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2005. Vol. 53. P. 505–517.
8. Nimeri G., Ohman L., Elwing H. et al. The influence of plasma proteins and platelets on oxygen radical production and F-actin distribution in neutrophils adhering to polymer surfaces // Biomaterials. 2002. Vol. 23. P. 1785–1795.
9. Patel J.D. I, Krupka T., Anderson J.M. iNOS-mediated generation of reactive oxygen and nitrogen species by biomaterial-adherent neutrophils // J Biomed Mater Res. 2007. Vol. 80. P. 381–390.