

**МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ ТИТАНОВЫХ ИМПЛАНТАТОВ С ПОМОЩЬЮ
МИКРОДУГОВОГО ОКСИДИРОВАНИЯ В ПРИСУТСТВИИ РАСТВОРОВ ПОЛИМЕРОВ.
ОЦЕНКА ИММУННОГО ОТВЕТА**

А.А. Ракина^{1,2,3}

Научный руководитель: профессор, д.м.н. Е.Г. Чурина^{1,2}, доцент, к. ф.-м. наук С.И. Твердохлебов³

²Сибирский государственный медицинский университет,

³Национальный исследовательский Томский политехнический университет,

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: aar37@tpu.ru

**MODIFICATION OF TITANIUM IMPLANTS SURFACE BY MICROARC OXIDATION IN
PRESENCE OF POLYMERIC SOLUTIONS. THE STUDY OF IMMUNE RESPONSE**

A.A. Rakina¹

Scientific Supervisor: Prof., Dr. E.G. Churina², PhD, S.I.Tverdokhlebov³

²Siberian State Medical University

³Tomsk Polytechnic University

¹Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: aar37@tpu.ru

Abstract. *In the present study, we performed the in vitro evaluation of titanium samples with four types of coatings obtained by microarc oxidation (MAO): pure calcium phosphate (CaP), CaP- chitosan, CaP- hyaluronic acid, CaP - polyvinylpyrrolidone coatings. AlamarBlue test and TNF α secretion analysis (ELISA) were performed to investigate the immune response. It was shown that formation of MAO hybrid calcium-phosphate coatings increases the biocompatibility of samples. Adding of polyvinylpyrrolidone and hyaluronic acid to the electrolyte solution presumably makes it possible to obtain hybrid coatings with anti-inflammatory properties.*

Введение. Основной клинической проблемой при применении имплантируемых материалов является хроническое воспаление. Ключевыми клетками, которые способны как простимулировать, так и подавить воспалительные реакции в условиях микроокружения имплантата являются тканевые макрофаги [1].

Активация тканевых макрофагов и осуществляемые ими в дальнейшем иммунологические функции определяются локальным иммунным статусом микроокружения клеток и происходят в двух основных направлениях: по классическому пути активации (M1-активация), по альтернативному пути активации (M2-активация) [2]. M1-активация вызывает каскад иммунологических реакций, приводящих к развитию воспаления и повреждению тканей и сопровождающихся усиленной секрецией провоспалительных цитокинов. M2-активация, напротив, обусловлена макрофагами второго типа, биологическая роль которых состоит в регуляции интенсивности иммунного ответа, в том числе путем

секреции противовоспалительных цитокинов и приводит к усилению ангиогенеза с последующей репарацией тканей [3].

Для оценки иммунного ответа на разрабатываемые материалы, в данной работе исследовали влияние гибридных кальций-фосфатных покрытий (КАП), полученных методом микродугового оксидирования, на жизнеспособность первичных человеческих макрофагов, а также на секрецию ими провоспалительного цитокина TNF- α .

Материалы и методы. Выделение и культивирование CD14⁺ моноцитов. Первичные макрофаги человека были выделены из лейкоцитарно-тромбоцитарной массы трех индивидуальных здоровых доноров. CD14⁺ моноциты выделяли методом магнитной сепарации на двойном градиенте фикола различной плотности с помощью магнитных бидсов, конъюгированных с антителами к рецептору CD14⁺ (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Германия). Количество выделенных моноцитов определяли на счетчике клеток CASY® Model TT (Roche Innovatis AG, Германия). В качестве контроля культивировали моноциты без исследуемых материалов. Выделенные моноциты были сразу же простимулированы цитокинами: IL4 – 10 нг/мл (Peprotech, Германия), IFN γ – 100 нг/мл (Peprotech, Германия) и культивировались в течение 6 дней в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °C.

Исследование жизнеспособности моноцитов. Жизнеспособность M0, M1 и M2 человеческих макрофагов на 6 день кокультивирования с исследуемыми материалами исследовали с использованием флуоресцирующего красителя Alamar blue (Sigma, США). Полученные значения жизнеспособности нормировали на контроль, результаты представлены в относительных единицах (%).

Иммуноферментный анализ (ИФА). Для определения концентрации TNF- α отбирали супернатанты по окончании культивирования клеток на 6 день эксперимента. Определение концентрации TNF- α (R&D Systems, США), проводилось с помощью сэндвич-ИФА согласно инструкции производителя.

Результаты и обсуждение. Результаты исследования жизнеспособности M0-макрофагов, кокультивированных с исследуемыми материалами, представлены на рис. 1.

Нанесение КАП на титановую подложку способствует увеличению жизнеспособности M0 человеческих макрофагов (относительная жизнеспособность клеток больше, чем в контроле (>100%)) (Рис.1). Жизнеспособность M1 макрофагов, кокультивированных с материалами, ниже, чем в контрольной культуре (<100%).

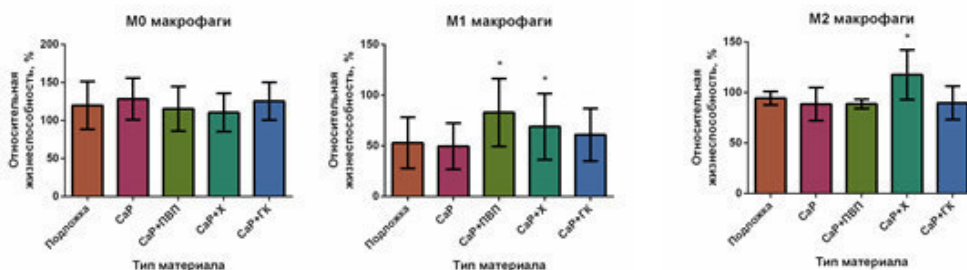


Рис. 1. Результаты исследования жизнеспособности M0, M1 и M2 макрофагов, кокультивированных с исследуемыми материалами: CaP – КАП, (КАП) CaP+ПВП – КАП с добавлением поливинилпирролидона, CaP+X – Кап с добавлением хитозана, CaP+ГА – КАП с добавлением гиалуроновой кислоты, * – $p < 0,05$ по сравнению с подложкой

При этом, нанесение на подложку КАП, полученных с добавлением поливинилпирролидона и хитозана в раствор электролита, способствует достоверному увеличению жизнеспособности M1 макрофагов по сравнению с другими материалами. Кокультивирование M2 макрофагов с исследуемыми материалами не влияет на их жизнеспособность, за исключением материала с покрытием из КАП с добавлением хитозана, где жизнеспособность M2 макрофагов достоверно выше. Таким образом, нанесение гибридных КАП способствует увеличению биосовместимости материалов.

Наблюдаемые реакции первичных макрофагов человека являются донор-специфичными (Рис.2). Среди 3 доноров один (BC-1021-6, показан зеленым на Рис.2) имеет выраженные воспалительные реакции на все исследуемые типы материалов. Присутствие материалов не стимулирует секрецию TNF- α M2-макрофагами двух других доноров. У этих же доноров наблюдается снижение секреции TNF- α при кокультивировании M0 и M1 макрофагов с материалами, покрытыми КАП с добавлением поливинилпирролидона и гиалуроновой кислоты, и увеличение секреции TNF- α при совместном культивировании M0 и M1 макрофагов с материалами, покрытыми КАП с добавлением хитозана (по сравнению с подложкой).

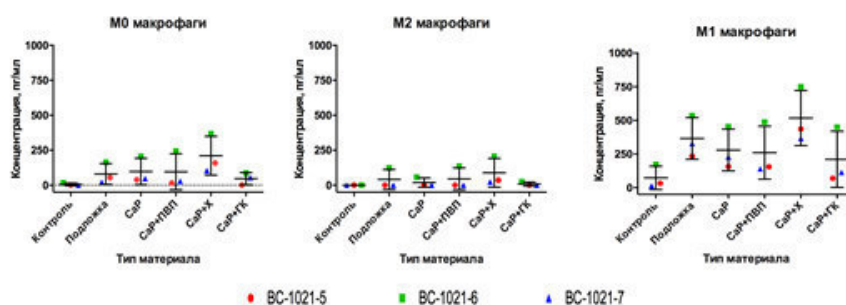


Рис. 2. Концентрация TNF- α на 6 день совместного культивирования первичных человеческих макрофагов с исследуемыми материалами, измеренная методом ИФА. BC – обозначение номера индивидуального донора

Таким образом, КАП с добавлением поливинилпирролидона и гиалуроновой кислоты обладают противовоспалительными свойствами.

Выводы. Нанесение гибридных кальций-фосфатных покрытий, полученных методом микродугового оксидирования, увеличивает биосовместимость материалов. Добавление в раствор электролита поливинилпирролидона и гиалуроновой кислоты позволяет получать гибридные покрытия с противовоспалительными свойствами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Murray P. J. et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines // Immunity. – 2014. – Т. 41. – №. 1. – С. 14-20.
2. Sridharan R. et al. Biomaterial based modulation of macrophage polarization: a review and suggested design principles // Materials Today. – 2015. – Т. 18. – №. 6. – С. 313-325.
3. Baugh J. A., Bucala R. Mechanisms for modulating TNF alpha in immune and inflammatory disease // Current opinion in drug discovery & development. – 2001. – Т. 4. – №. 5. – С. 635-650.