

**Для цитирования:**

Запорожец Т.С., Пузь А.В., Синебрюхов С.Л., Гнеденков С.В., Смолина Т.П., Гажа А.К. Сравнительный анализ иммунологической совместимости биоактивных кальций-фосфатных покрытий на сплаве магния МА8 и титане ВТ1-0. *Изв. вузов. Химия и хим. технология*. 2017. Т. 60. Вып. 2. С. 45–51.

**For citation:**

Zaporozhets T.S., Puz A.V., Sinebryukhov S.L., Gnedenkov S.V., Smolina T.P., Gazha A.K. Comparative analysis of immunological compatibility of bioactive calcium phosphate coatings on titanium and magnesium alloys. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.* 2017. V. 60. N 2. P. 45–51.

УДК: 661.882.27:666.651.4:616-089.843

**Т.С. Запорожец, А.В. Пузь, С.Л. Синебрюхов, С.В. Гнеденков, Т.П. Смолина, А.К. Гажа**

Татьяна Станиславовна Запорожец, Татьяна Павловна Смолина, Анна Константиновна Гажа  
Лаборатория иммунологии, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, ул. Сельская, 1,  
Владивосток, Россия, 690087  
E-mail: niiem\_vl@mail.ru, tsmol@mail.ru, angazha@mail.ru

Артем Викторович Пузь (✉), Сергей Леонидович Синебрюхов, Сергей Васильевич Гнеденков  
Лаборатория композиционных покрытий биомедицинского назначения, Институт химии ДВО РАН,  
пр. 100-летия Владивостока, д. 159, Владивосток, Россия, 690022  
E-mail: smol\_shaman@mail.ru (✉), sls@ich.dvo.ru, svg21@hotmail.com

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ СОВМЕСТИМОСТИ  
БИОАКТИВНЫХ КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫХ ПОКРЫТИЙ НА СПЛАВЕ МАГНИЯ МА8  
И ТИТАНЕ ВТ1-0**

*Современные стратегии в разработке биоматериалов предусматривают пассивную модуляцию остеоиндуктивных и остеокондуктивных свойств поверхности имплантатов через изменение их физико-химических параметров. Эффективность остеоинтеграции имплантата зависит от реакции иммунной системы, выраженность которой также определяется физико-химическими свойствами материала и морфологическими особенностями покрытия. В настоящей работе для формирования биологически активных композиционных коррозионностойких кальций-фосфатных покрытий на титане ВТ1-0 и магниевом сплаве МА8, предназначенных для биоинженерии костной ткани, был использован метод плазменно-электролитического оксидирования (ПЭО) в биполярном режиме. Для повышения антикоррозионных свойств биоактивные ПЭО-покрытия дополнительно были обработаны ультрадисперсным политетрафторэтиленом (УПТФЭ). Показано, что ПЭО покрытия на сплаве магния МА8 и технически чистом титане ВТ1-0 индуцируют активацию лейкоцитов периферической крови человека *in vitro*, сопряженную с усилением экспрессии активационных молекул CD69, CD38, CD11b с одновременным шеддингом L-селектина (CD62L). Установлено влияние способа обработки покрытий на выраженность активационных процессов. Контакт клеток с кальций-фосфатными ПЭО-покрытиями, сформированными на сплавах титана и магния, индуцировал менее выраженную активацию по сравнению с необработанными имплантатами. Минимальная реакция наблюдалась при использовании композиционных ПЭО-покрытий с ультрадисперсным политетрафторэтиленом, нанесенным электрофоретическим методом. Композитные покрытия на магниевых сплавах индуцировали активацию клеток иммунной системы, сопоставимую с таковой для покрытий на титановых сплавах. В целом, иммунологические характеристики ПЭО-покрытия на сплаве МА8 и технически чистом титане ВТ1-0 демонстрируют возможность создания материалов и изделий для нужд имплантационной хирургии, в том числе биорезорбируемых на основе магниевых сплавов.*

**Ключевые слова:** имплантаты, плазменное электролитическое оксидирование, гидроксипатит, биоактивность/биоинертность, титан, магний

**T.S. Zaporozhets, A.V. Puz, S.L. Sinebryukhov, S.V. Gnedenkov, T.P. Smolina, A.K. Gazha**

Tatiana S. Zaporozhets, Tatiana P. Smolina, Anna K. Gazha

Immunology Laboratory, G.P. Somov Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Selskaya st., 1, Vladivostok, 690087, Russia

E-mail: niem\_vl@mail.ru, tsmol@mail.ru, angazha@mail.ru

Artyom V. Puz (✉), Sergei L. Sinebryukhov, Sergei V. Gnedenkov

Laboratory of Composition Coatings of Bio Medical Purpose, Institute of Chemistry of Far Eastern Branch of RAS, 100-letiya Vladivostoka ave., 159 d, Vladivostok, 690022, Russia

E-mail: smol\_shaman@mail.ru (✉), sls@ich.dvo.ru, svg21@hotmail.com

## COMPARATIVE ANALYSIS OF IMMUNOLOGICAL COMPATIBILITY OF BIOACTIVE CALCIUM PHOSPHATE COATINGS ON TITANIUM AND MAGNESIUM ALLOYS

*Current strategies for developing the biomaterials suggest passive modulation of osteoinductive and osteoconductive properties of the implant surface through a change in their physical and chemical parameters. Also, the osseointegration of implant depends on the reaction of the immune system, the severity of which is determined by physical and chemical properties of the material and the morphological features of the coating. In this paper, the plasma electrolytic oxidation (PEO) method for the formation of biologically active compositional corrosion resistant calcium phosphate coatings on titanium BT1-0 and magnesium alloy MA8, designed for bone bioengineering was used. Bioactive PEO coatings were additionally treated with superdispersed polytetrafluoroethylene (SPTFE) in order to improve anti-corrosion properties. The cellular and molecular aspects of immunological compatibility of bioactive calcium phosphate coatings formed on titanium and magnesium alloys by promising technology of plasma electrolytic oxidation and intended for bone tissue bioengineering were studied. It is shown that PEO coatings formed on titanium and magnesium induce an activation of human peripheral blood leukocytes in vitro, associated with increased expression of activation of molecules of CD69, CD38, CD11b on the cell membranes while shedding L-selectin (CD62L). Influence of coating process technologies on the intensity of the activation processes was established. Contact cells with calcium-phosphate PEO coatings formed on titanium and magnesium alloys induced a less pronounced activation in comparison with the untreated implants. The minimal reaction of the cells of the innate immunity was observed at using a composite of PEO coatings with SPTFE, obtained by electrophoretic deposition. The composite coating on magnesium alloys induces response of the cells of the innate immunity, comparable with the response to the coatings on titanium alloys. On the whole, immunological characteristics of the PEO coatings on titanium BT1-0 and magnesium alloy of MA8 demonstrate possibility of development of materials and wares for implant surgery, including bioresorbable alloys on magnesium base.*

**Key words:** implant, plasma electrolytic oxidation, hydroxyapatite, bioactivity/bioinertness, titanium, magnesium

### ВВЕДЕНИЕ

Современные стратегии в разработке биоматериалов предусматривают пассивную модуляцию остеоиндуктивных и остеокондуктивных свойств поверхности имплантатов через изменение их физико-химических параметров. К числу материалов, используемых в имплантационной хирур-

гии, относятся сплавы титана, в том числе обладающие эффектом памяти формы [1, 2]. Одним из приоритетных направлений является также разработка биodeградируемых и биоабсорбируемых металлических имплантатов, не оказывающих вредного воздействия на организм человека и выполняющих свои функции в течение необходимого для восстановления поврежденной кости времени. В

качестве таких имплантатов перспективны магниевые сплавы [3, 4]. Однако вследствие слишком высокой коррозионной активности они без необходимой защиты неприменимы для этих целей [4]. Для повышения прочности соединения материала с костью, улучшения процессов остеоинтеграции и предотвращения накопления вредных ионов в мягких тканях на имплантаты наносят покрытия, состоящие из родственных организму материалов. Это могут быть соединения на основе фосфатов кальция (гидроксиапатиты), физические и химические свойства которых обеспечивают биосовместимость, стимуляцию остеогенеза и восстановление костной ткани [1].

Нами были разработаны условия получения на титане марки VT1-0 и магниевом сплаве МА8 методом плазменного электролитического оксидирования (ПЭО) биологически активных коррозионностойких кальций-фосфатных поверхностных слоев [2, 5], развитая пористая поверхность которых по минеральному составу и механическим характеристикам приближается к характеристикам костной ткани, обеспечивая стимуляцию остеогенеза [2]. Для повышения антикоррозионных свойств биоактивные ПЭО-покрытия дополнительно были обработаны ультрадисперсным политетрафторэтиленом (УПТФЭ). Вместе с тем эффективность остеоинтеграции, безопасность, биосовместимость и функциональность зависят от реакции иммунной системы на имплантат, которая в свою очередь определяется не только химическим составом, но и морфологическими особенностями (шероховатостью) поверхности имплантата [2, 6, 7].

Целью настоящей работы явилось сравнительное исследование влияния поверхностной модификации кальций-фосфатных покрытий, формируемых на сплавах магния и титана с использованием метода ПЭО, на процессы активации лейкоцитов периферической крови человека *in vitro*.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала, на который наносили покрытия, использованы образцы из технически чистого титана марки VT1-0 (масс. %: Fe 0,25; Si 0,12; C 0,07; O 0,12; N 0,04; H 0,01, остальное Ti) и из сплава магния МА8 (масс. %: Mn 1,5-2,5; Ce 0,15-0,35, остальное Mg). Перед оксидированием образцы в виде дисков диаметром 1 см и толщиной 1 мм механически обрабатывали до определенного уровня шероховатости ( $R_a = 0,12$  мкм), промывали в дистиллированной воде и обезжиривали спиртом (образцы 1Ti и 1Mg).

Плазменное электролитическое оксидирование титановых образцов проводили в биполярном режиме [2] в электролите, содержащем 30 г/л глицерофосфата кальция  $(C_3H_7O_6P)Ca \cdot 2H_2O$  и 40 г/л ацетата кальция  $(CH_3COOO)_2Ca \cdot H_2O$  (образцы 2Ti). ПЭО-электролит для образцов из магниевого сплава (2Mg) содержал 25 г/л глицерофосфата кальция  $(C_3H_7O_6P)Ca \cdot 2H_2O$  и 5 г/л фторида натрия NaF. По данным рентгенофазового анализа, в состав покрытий на образцах 2Ti входят фосфаты кальция, в том числе гидроксиапатит  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  [8], а на образцах 2Mg – MgO и гидроксиапатит [9].

Для запечатывания пор ПЭО-слоя и создания композиционного полимерсодержащего покрытия использовали ультрадисперсный политетрафторэтилен, полученный методом термоградиентного синтеза (метод разработан в лаборатории фторидных материалов Института химии ДВО РАН). Полимер на ПЭО-покрытие наносили двумя способами. При использовании первого образцы на 10-15 с погружали в суспензию на основе изопропилового спирта, содержащую частицы УПТФЭ размером 0,2-0,6 мкм (100-150 г/л) и смачиватель ОП-10 (6-8 г/л). После полного испарения изопропилового спирта с поверхности образцы подвергали термической обработке в муфельной печи (Nabertherm B 180, Германия) при 200-250 °C в течение 3 мин, затем выдерживали при комнатной температуре до полного остывания (образцы 3Ti и 3Mg). Во втором случае полимер наносили электрофоретическим способом при анодной поляризации при 200 В из суспензии, содержащей частицы УПТФЭ (20 г/л), смачиватель ОП-10 (1 г/л) и анионный ПАВ (0,5 г/л), в течение 25 с. Затем образцы подвергались 15-минутной термообработке в муфельной печи при 315 °C (образцы 4Ti и 4Mg).

Все образцы стерилизовали в 70%-м этаноле в течение 30 мин, затем в ламинарном боксе с вертикальным нисходящим потоком воздуха (исполнение VIS-A-VIS БАВнп-01-«Ламинар-С») под бактерицидной лампой УФО (TUV TL-D30WSLV, Philips). Время экспозиции составляло 20 мин с каждой стороны образца.

Для получения клеточных культур периферическую гепаринизированную венозную кровь здоровых доноров разводили в пропорции 1:2 полной питательной средой (среда RPMI-1640, содержащая 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 0,01 М НЕПЕС, 200 мМ L-глутамин, 100 мг/мл гентамицин) и вносили в стерильные пластиковые 24-луночные планшеты (CellStar) с образцами (общий объем – 1000 мкл), инкубировали при 37 °C в течение 20 ч в газовой среде – 95% воздуха и 5% CO<sub>2</sub>.

Жизнеспособность клеток через 1 сут после инкубирования составляла 95-98%. После культивирования кровь ресуспендировали, переносили по 100 мкл в цитометрические пробирки и добавляли в каждую по 10 мкл моноклональных антител к поверхностным антигенам лейкоцитов периферической крови CD56-APC, CD3-FITC, CD25-PE, CD14-FITC, CD62L-FITC, CD11b-FITC, CD69-PE, а также соответствующих изотипических контролей (Beckman Coulter), позволяющих оценить неспецифическую фоновую флуоресценцию. Для изучения апоптоза нейтрофилов 2 мл плазмы доноров переносили в стерильную пробирку, добавляли 5 мл полной питательной среды RPMI-1640, концентрацию клеток доводили до  $1 \cdot 10^6$  кл/мл. По 1 мл клеточной суспензии добавляли в лунки 24-луночного планшета с образцами, инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С в течение 24 ч, затем клетки отмывали Cell Wash, добавляли по 5 мкл пропидиума йодида (PI) и 1 мкл Annexin V-FITC. Анализ проводили на проточном цитофлюориметре FACS Calibur (Becton Dickinson, США). Экспрессию молекул на поверхности клеток оценивали по количеству клеток (в %), меченных антителами, и уровню средней интенсивности флуоресценции (MFI - mean fluorescence intensity). Процентное содержание апоптотических клеток определяли с использованием программы FloMax, рассчитывая количество клеток, интенсивно окрашиваемых Annexin V-FITC (ранний апоптоз), и клеток, одновременно интенсивно окрашиваемых Annexin V-FITC и PI (поздний апоптоз).

Статистическая обработка данных, проверка нормальности распределения признаков, расчет средних значений (M), стандартного отклонения ( $\sigma$ ), коэффициента Стьюдента, непараметрического критерия Манна-Уитни выполнены с помощью пакета программы «Statistica-7».

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На основе анализа иммунологической совместимости биоактивных кальций-фосфатных и композиционных покрытий на сплаве магния МА8 и титане марки BT1-0 установлено, что в течение первых 24 ч контакта цельной крови со всеми исследуемыми образцами регистрируется активация нейтрофилов и моноцитов, сопряженная с усилением экспрессии активационных молекул CD69, CD38, CD11b на мембранах клеток с одновременным шеддингом CD62L. Степень активации клеток при контакте с образцами из чистого титана (1Ti) была сопоставима с таковой при инкубировании клеток с образцами на сплаве магния (1Mg) (табл. 1).

Ранее нами было показано [2], что ПЭО-покрытие снижает скорость резорбции металла по сравнению с образцами без покрытия: образцы сплава магния и титана с ПЭО-покрытием на поверхности имеют более стабильное антикоррозионное поведение в искусственной плазме крови (Simulated Body Fluid – SBF-раствор), а после обработки покрытий УПТФЭ скорость коррозии снижается еще больше. Эти процессы нашли отражение и в изменении уровня активации лейкоцитов. Контакт нейтрофилов с образцами, имеющими на поверхности ПЭО-покрытие, индуцировал менее выраженную активацию по сравнению с необработанными пластинами: уровень экспрессии CD69, CD11b на мембранах нейтрофилов, контактирующих с образцами 2Ti и 2Mg, значительно отличался от такового при инкубировании крови с образцами 1Ti и 1Mg (табл. 1). При использовании образцов 3Ti с полимером, нанесенным методом окупания, показатели функциональной активности нейтрофилов значительно снижались по сравнению с таковыми для образцов с ПЭО-покрытиями (2Ti), моноцитов – оставались на прежнем уровне.

Таблица 1

**Влияние способа обработки металлических имплантатов на процессы активации нейтрофилов и моноцитов**  
**Table 1. The influence of a method of processing the metallic implants on the activation processes of neutrophils and monocytes**

№ образца	CD69 MFI		CD69 %		CD11Bb MFI		CD62L MFI		CD38 MFI	
	Ti	Mg	Ti	Mg	Ti	Mg	Ti	Mg	Ti	Mg
Нейтрофилы										
Контроль	7,5±0,7	17,6±5,46	1,7±0,1	3,3±2,6	573,5±9,1	552±148	105,6±25	223,6±77,5	15,5±0,7	29,6±8,1
1	25,6±4,2*	53,0±10,8**	8,2±0,5**	19,6±3,6**	1888±180*	1753±140*	33,4±19**	57,3±15,5**	27,5±3,5*	43,5±4,8**
2	20,4±2,8*	35,0±9,4*	7,5±0,8**	14,3±4,0**	1653±67**	1539±107*	39,5±4,5**	51,7±14,5**	23,5±1,5*	37,7±4,4**
	P <sub>1-2</sub> =0,05	P <sub>1-2</sub> =0,023	P <sub>1-2</sub> =0,045	P <sub>1-2</sub> =0,050	P <sub>1-2</sub> =0,025	P <sub>1-2</sub> =0,026	P <sub>1-2</sub> =0,023	P <sub>1-2</sub> =0,023	P <sub>1-2</sub> =0,047	P <sub>1-2</sub> =0,048
3	14,2±2,5**	41,0±13,3**	6,0±1,2*	13,2±4,0**	1262±197*	1120±411*	59,4±21,5*	85,6±22,7**	21,2±0,5*	37,3±7,4*
	P <sub>2-3</sub> =0,000	P <sub>2-3</sub> =0,434	P <sub>2-3</sub> =0,048	P <sub>2-3</sub> =0,742	P <sub>1-3</sub> =0,000	P <sub>2-3</sub> =0,058	P <sub>2-3</sub> =0,020	P <sub>2-3</sub> =0,000	P <sub>2-3</sub> =0,08	P <sub>2-3</sub> =0,342
4	8,5±2,1	32,6±9,4**	1,6±1,2*	11,2±3,5*	563±24,3	890±266**	99,8±11,5	189,3±34,2*	17,5±2,1	33,0±7,0
	P <sub>2-4</sub> =0,000	P <sub>2-4</sub> =0,282	P <sub>2-4</sub> =0,000	P <sub>2-4</sub> =0,226	P <sub>2-4</sub> =0,000	P <sub>2-4</sub> =0,324	P <sub>2-4</sub> =0,000	P <sub>2-4</sub> =0,000	P <sub>2-4</sub> =0,000	P <sub>2-4</sub> =0,373

Моноциты										
Контроль	7,5±2,1	2,1±1,1	1,5±0,2	1,4±0,5	3650±90	1600±475	23,5±3,5	66,3±13,5	91,5±18,2	260,6±32,2
1	50,3±3,5**	12,0±2,7*	4,5±0,9**	3,0±0,8	5247±311**	2496±359*	23,0±1,4	66,0±3,5	112,5±8,6*	311,5±38,6*
2	31,0±1,9**	8,4±2,2*	3,3±0,7**	2,0±0,5*	4707±336**	2211±136*	24,0±2,8	75,0±8,0	101,5±4,1	329,5±30,2
	$P_{1-2}=0,000$	$P_{1-2}=0,045$	$P_{1-2}=0,046$	$P_{1-2}=0,045$	$P_{1-2}=0,030$	$P_{1-2}=0,016$	$P_{1-2}=0,495$	$P_{1-2}=0,050$	$P_{1-2}=0,020$	$P_{1-2}=0,435$
3	31,0±6,2**	6,0±1,2**	3,1±0,8**	2,3±1,5	4875±319**	2203±119*	23,0±4,2	73,0±10,2	101,0±10,2	262,5±36,2
	$P_{2-3}=1,000$	$P_{2-3}=0,415$	$P_{2-3}=0,685$	$P_{2-3}=0,683$	$P_{2-3}=0,441$	$P_{2-3}=0,923$	$P_{2-3}=0,670$	$P_{2-3}=0,739$	$P_{2-3}=0,921$	$P_{2-3}=0,013$
4	21,5±6,6*	5,5±1,9	2,1±0,5*	1,5±1,2*	4316±127**	1480±287	24,0±2,8	83,0±22,0	95,1±17,1	287,1±17,1
	$P_{2-4}=0,015$	$P_{2-4}=0,06$	$P_{2-4}=0,047$	$P_{2-4}=0,415$	$P_{2-4}=0,041$	$P_{2-4}=0,000$	$P_{2-4}=0,670$	$P_{2-4}=0,383$	$P_{2-4}=0,0526$	$P_{2-4}=0,207$

Примечание. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  (значимость различий по отношению к контрольным показателям)

Note: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  (significance of differences with respect to reference parameters)

Таблица 2

### Влияние способа обработки остеогенерирующих покрытий металлических имплантатов на процессы апоптоза нейтрофилов (%)

Table 2. The influence of a method of processing the metallic implants on processes of neutrophil apoptosis

№ образца	Жизнеспособные клетки		Ранний апоптоз		Поздний апоптоз		Некроз	
	Ti	Mg	Ti	Mg	Ti	Mg	Ti	Mg
К 2	78,8±4,8		20,3±2,6		0,8±0,1		0,1±0,01	
К 24	45,9±4,7*		52,6±4,5*		1,2±0,5		0,2±0,25	
1	40,8±4,2	44,8±4,2	57,0±3,5*	55,8±1,6*	2,2±0,6*	1,9±1,2*	0,4±0,1	0,4±0,3
2	38,2±2,8	45,2±5,2	59,7±4,1*	58,1±3,8*	2,4±1,0*	2,6±0,6*	0,5±0,3	0,5±0,1
3	40,1±3,5	44,8±3,5	56,4±4,4	52,1±5,5	1,9±0,5	1,7±0,4	0,3±0,1	0,3±0,05
4	42,3±2,1	43,3±4,1	55,2±3,2	52,3±2,1	1,3±0,3	1,3±0,3	0,3±0,1	0,2±0,07

Примечание: К 2 – контроль через 2 ч, К 24 – контроль через 24 ч; \* $p < 0,05$  - значимость различий по отношению к К 24

Note: К 2 – the control after 2 h, К 24 – the control after 24 h; \* $p < 0,05$  - significance of differences with respect to К 24

Запечатывание пор ПЭО-слоя на сплаве магния МА8 независимо от метода – погружения в суспензию, содержащую частицы УПТФЭ (образцы 3Mg), или электрофоретического (образцы 4Mg) – не приводило к изменению показателей, характеризующих процессы активации нейтрофилов и моноцитов по сравнению с необработанными УПТФЭ покрытиями (табл. 1).

На титане минимальную реакцию со стороны лейкоцитов периферической крови индуцировали композиционные покрытия с УПТФЭ, нанесенным электрофоретическим методом (образцы 4Ti).

Одним из основных регуляторов продолжительности жизни нейтрофилов является быстрый спонтанный апоптоз [10]. Из данных, приведенных в табл. 2, видно, что в исходной популяции клеток (контроль 2 ч) количество клеток, находящихся в состоянии раннего спонтанного апоптоза, составляло (20,3±2,6)%, позднего апоптоза – (0,8±0,1)%. Через 24 ч инкубирования клеток в полной питательной среде (контроль 24 ч) значительно увеличилось количество клеток в области, соответствующей ранней стадии спонтанного апоптоза, и, соответственно, уменьшилось количество жизнеспособных клеток. При оценке индуцированного в результате контакта с имплантатами апоптоза

нейтрофилов значимое увеличение показателей зарегистрировано при использовании образцов без покрытия (образцы 1Ti и 1Mg) и с покрытием, сформированным методом ПЭО (образцы 2Ti и 2Mg) (табл. 2). В остальных случаях (образцы 3 и 4) показатели индуцированного апоптоза значимо не отличались от таковых в контрольных пробах (интактные клетки). Не выявлено значимых различий показателей апоптоза нейтрофилов и при сравнении магниевых и титановых имплантатов.

Реакция клеток иммунной системы на имплантат при контакте с исследуемыми образцами в условиях *in vitro* является выражением воспалительно-репаративной функции иммунной системы. Ключевую роль в этих процессах играют клетки врожденного иммунитета – нейтрофилы и моноциты/макрофаги. В молекулярных механизмах таких реакций принимает участие множество мембранных белков, в том числе ранний активационный антиген CD69 [11], CD38, участвующий в активации остеокластов и усиливающий костную резорбцию [12], CD11Bb, играющий ведущую роль во взаимодействии моноцитов, макрофагов и нейтрофилов, [13], CD62L – L-селектин, опосредующий адгезию лейкоцитов между собой и к межклеточному матриксу и сливающийся с мембраной в момент активации клетки [14]. Установленное

нами увеличение экспрессии CD69, CD38, CD11b на мембранах лейкоцитов с одновременным шеддингом CD62L при контакте клеток крови с образцами исследуемых покрытий отражает индуцируемые ими активационные процессы. Следует подчеркнуть, что активация нейтрофилов и моноцитов, наблюдаемая при использовании покрытий, сформированных на исследуемых образцах методом ПЭО, не изменяется по сравнению с активацией клеток, соприкасающихся с образцами без покрытия. Вместе с тем сочетание поляризационного и плазменного воздействий на поверхность образцов, реализуемое при ПЭО и позволяющее создать пористую поверхность, может быть дополнительным преимуществом ПЭО, поскольку развитая поверхность способствует лучшему обрастанию имплантата костной тканью [2, 3].

Апоптоз нейтрофилов и механизм их удаления, связанный с поглощением апоптотических клеток макрофагами, имеет важное значение для процессов нормального разрешения воспаления, предотвращая выброс содержимого нейтрофилов и ограничивая разрушительную способность нейтрофильных продуктов для окружающих тканей [10]. Ингибирование апоптоза нейтрофилов продлевает период высвобождения провоспалительных медиаторов. Вместе с тем чрезмерная активация нейтрофилов может инициировать массовую гибель и приводить к развитию инфекционных осложнений. Полученные нами результаты свидетельствуют об отсутствии выраженных изменений процессов апоптоза в нейтрофилах при контакте с кальций-фосфатными покрытиями на исследуемых образцах и соотносятся с данными об изменении уровня экспрессии активационных антигенов на их поверхности.

Ранее в экспериментах *in vivo* было показано [2], что подкожная имплантация образцов с ПЭО-покрытиями в организм лабораторных мышей не вызвала побочных эффектов, связанных с воспалительными и аллергическими явлениями. В

то же время в течение 40 сут на поверхности кальций-фосфатных покрытий образовывалась грубоволокнистая костная ткань толщиной до 50 мкм с полостями, заполненными костным мозгом. Выполненные нами исследования позволяют заключить, что биоактивные кальций-фосфатные покрытия на сплавах магния и титана индуцируют активацию клеток врожденного иммунитета, достаточную для увеличения остеоиндуктивного и остеокондуктивного потенциала *in vivo*, при отсутствии нежелательных реакций.

#### ВЫВОДЫ

Кальций-фосфатные покрытия, сформированные методом ПЭО на сплаве магния МА8 и технически чистом титане ВТ1-0, индуцируют активацию клеток врожденного иммунитета, сопряженную с усилением экспрессии активационных молекул CD69, CD38, CD11b на мембранах клеток с одновременным шеддингом CD62L.

Степень активации клеток при контакте с образцами из технически чистого титана ВТ1-0 сопоставима с таковой при инкубировании клеток с образцами из магниевых сплавов МА8.

ПЭО-покрытие снижает активационный потенциал технически чистого титана ВТ1-0.

Минимальную реакцию со стороны клеток врожденного иммунитета индуцируют композиционные покрытия на ВТ1-0, сформированные электрофоретическим нанесением УПТФЭ.

Иммунологические характеристики ПЭО-покрытия на сплаве МА8 и технически чистом титане ВТ1-0 демонстрируют возможность создания материалов и изделий для нужд имплантационной хирургии, в том числе биорезорбируемых на основе магниевых сплавов.

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

#### ЛИТЕРАТУРА

1. **Gnedkov S.V., Sinebryukhov S.L., Zavidnaya A.G., Mashtalyar D.V., Puz' A.V., Merkulov E.B.** Thermal and adhesion properties of bioinert layers on a titanium nickelide surface. *Prot. Met.* 2015. V. 51. N 1. P. 127–130. DOI: 10.1134/S2070205115010037.
2. **Гнеденков С.В., Синебрюхов С.Л., Сергиенко В.И.** Композиционные многофункциональные покрытия на металлах и сплавах, формируемые плазменным электролитическим окислением. Владивосток: Дальнаука, 2013. 200 с.
3. **Staigera M.P., Pietaka A.M., Huadmaia J., Dias G.** Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: A review. *Biomaterials.* 2006. V. 27. N 9. P. 1728–1734. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.10.003.

#### REFERENCES

1. **Gnedkov S.V., Sinebryukhov S.L., Zavidnaya A.G., Mashtalyar D.V., Puz' A.V., Merkulov E.B.** Thermal and adhesion properties of bioinert layers on a titanium nickelide surface. *Prot. Met.* 2015. V. 51. N 1. P. 127–130. DOI: 10.1134/S2070205115010037.
2. **Gnedkov S.V., Sinebryukhov S.L., Sergienko V.I.** Composite multi-functional coatings on metals and alloys formed by plasma electrolytic oxidation. Vladivostok: Dal'nauka. 2013. 200 p. (in Russian).
3. **Staigera M.P., Pietaka A.M., Huadmaia J., Dias G.** Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: A review. *Biomaterials.* 2006. V. 27. N 9. P. 1728–1734. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.10.003.

4. **Witte F.** The history of biodegradable magnesium implants: A review. *Acta Biomaterialia*. 2010. V. 6. N 5. P. 1680–1692. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.02.028.
5. **Gnedenkov S.V., Khrisanfova O.A., Zavidnaya A.G., Sinebryukhov S.L., Egorkin V.S., Nistratova M.V., Yerokhin A., Matthews A.** PEO coatings obtained on an Mg–Mn type alloy under unipolar and bipolar modes in silicate-containing electrolytes. *Surf. Coat. Technol.* 2010. V. 204. N 14–15. P. 2316–2322. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2009.12.024.
6. **Gnedenkov S.V., Sharkeev Yu.P., Sinebryukhov S.L., Khrisanfova O.A., Legostaeva E.V., Zavidnaya A.G., Puz' A.V., Khlusov I.A., Opra D.P.** Functional coatings formed on the titanium and magnesium alloys as implant materials by plasma electrolytic oxidation technology: fundamental principles and synthesis conditions. *Corros. Rev.* 2016. V. 34(12). P. 65–83. DOI: 10.1515/correv-2015-0069.
7. **Franz S., Rammelt S., Scharnweber D., Simon J.C.** Immune responses to implants – a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials*. 2011. V. 32. P. 6692–6709. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.078.
8. **Гнеденков С.В., Шаркеев Ю.П., Синебрюхов С.Л., Хрисанфова О.А., Легостаева Е.В., Завидная А.Г., Пузь А.В., Хлусов И.А.** Формирование и свойства биоактивных покрытий на титане. *Перспективные материалы*. 2011. № 2. С. 49–59.
9. **Gnedenkov S.V., Sinebryukhov S.L., Khrisanfova O.A., Zavidnaya A.G., Egorkin V.S., Puz' A.V., Sergienko V.I.** Formation of bioactive anticorrosion coatings on resorbable implants by plasma electrolytic oxidation. *Prot. Met.* 2013. V. 49. N 7. P. 874–879. DOI: 10.1134/S2070205113070071.
10. **Fox S., Leitch A.E., Duffin R., Haslett C., Rossi A.G.** Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J. Innate Immun.* 2010. V. 2. N 3. P. 216–227. DOI: 10.1159/000284367.
11. **Hasegawa A., Nakayama T.** Role of CD69 in the pathogenesis of inflammation. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2010. V. 33. N 4. P. 189–195.
12. **Sun L., Adebajo O.A., Moonga B.S., Corisdeo S., Anandatheerthavarada H.K., Biswas G., Arakawa T., Hakeda Y., Koval A., Sodam B., Bevis P.J., Moser A.J., Lai F.A., Epstein S., Troen B.R., Kumegawa M., Zaidi M.** CD38/ADP-ribosyl cyclase: A new role in the regulation of osteoclastic bone resorption. *J. Cell. Biol.* 1999. V. 146. P. 1161–1172.
13. **Davis H.M., Carpenter D.C., Stahl J.M., Zhang W., Hynicka W.P., Griswold D.E.** Human granulocyte CD11b expression as a pharmacodynamic biomarker of inflammation. *J. Immunol. Methods*. 2000. V. 240. N 1–2. P. 125–132. DOI: 10.1016/S0022-1759(00)00183-6.
14. **Smolen J., Petersen T., Koch C., O'Keefe S.J., Hanlon W.A., Seo S., Pearson D., Fossett M.C., Simon S.I.** L-Selectin signaling of neutrophil adhesion and degranulation involves p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 2000. V. 26. P. 15876–15884. DOI: 10.1074/jbc.M906232199.
4. **Witte F.** The history of biodegradable magnesium implants: A review. *Acta Biomaterialia*. 2010. V. 6. N 5. P. 1680–1692. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.02.028.
5. **Gnedenkov S.V., Khrisanfova O.A., Zavidnaya A.G., Sinebryukhov S.L., Egorkin V.S., Nistratova M.V., Yerokhin A., Matthews A.** PEO coatings obtained on an Mg–Mn type alloy under unipolar and bipolar modes in silicate-containing electrolytes. *Surf. Coat. Technol.* 2010. V. 204. N 14–15. P. 2316–2322. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2009.12.024.
6. **Gnedenkov S.V., Sharkeev Yu.P., Sinebryukhov S.L., Khrisanfova O.A., Legostaeva E.V., Zavidnaya A.G., Puz' A.V., Khlusov I.A., Opra D.P.** Functional coatings formed on the titanium and magnesium alloys as implant materials by plasma electrolytic oxidation technology: fundamental principles and synthesis conditions. *Corros. Rev.* 2016. V. 34(12). P. 65–83. DOI: 10.1515/correv-2015-0069.
7. **Franz S., Rammelt S., Scharnweber D., Simon J.C.** Immune responses to implants – a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials*. 2011. V. 32. P. 6692–6709. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.078.
8. **Gnedenkov S.V., Sharkeev Yu.P., Sinebryukhov S.L., Khrisanfova O.A., Legostaeva E.V., Zavidnaya A.G., Puz' A.V., Khlusov I.A.** Formation and properties of bioactive coatings on titanium. *Perspektivnye materialy*. 2011. N 2. P. 49–59 (in Russian).
9. **Gnedenkov S.V., Sinebryukhov S.L., Khrisanfova O.A., Zavidnaya A.G., Egorkin V.S., Puz' A.V., Sergienko V.I.** Formation of bioactive anticorrosion coatings on resorbable implants by plasma electrolytic oxidation. *Prot. Met.* 2013. V. 49. N 7. P. 874–879. DOI: 10.1134/S2070205113070071.
10. **Fox S., Leitch A.E., Duffin R., Haslett C., Rossi A.G.** Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J. Innate Immun.* 2010. V. 2. N 3. P. 216–227. DOI: 10.1159/000284367.
11. **Hasegawa A., Nakayama T.** Role of CD69 in the pathogenesis of inflammation. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2010. V. 33. N 4. P. 189–195.
12. **Sun L., Adebajo O., Moonga B., Corisdeo S., Anandatheerthavarada H.K., Biswas G., Arakawa T., Hakeda Y., Koval A., Sodam B., Bevis P.J., Moser A.J., Lai F.A., Epstein S., Troen B.R., Kumegawa M., Zaidi M.** CD38/ADP-ribosyl cyclase: A new role in the regulation of osteoclastic bone resorption. *J. Cell. Biol.* 1999. V. 146. P. 1161–1172.
13. **Davis H.M., Carpenter D.C., Stahl J.M., Zhang W., Hynicka W.P., Griswold D.E.** Human granulocyte CD11b expression as a pharmacodynamic biomarker of inflammation. *J. Immunol. Methods*. 2000. V. 240. N 1–2. P. 125–132. DOI: 10.1016/S0022-1759(00)00183-6.
14. **Smolen J., Petersen T., Koch C., O'Keefe S.J., Hanlon W.A., Seo S., Pearson D., Fossett M.C., Simon S.I.** L-Selectin signaling of neutrophil adhesion and degranulation involves p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 2000. V. 26. P. 15876–15884. DOI: 10.1074/jbc.M906232199.

Поступила в редакцию 05.09.2016  
Принята к опубликованию 23.12.2016

Received 05.09.2016  
Accepted 23.12.2016