

УДК 576.57.085.23:616.71:539.25

## АДГЕЗИЯ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА НА МОДИФИЦИРОВАННОМ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ИМПЛАНТОЛОГИИ ТИТАНЕ С АНОДИРОВАННЫМ НАНОТРУБЧАТЫМ ПОКРЫТИЕМ

Ф. А. Фадеев<sup>1</sup>, Ю. Я. Хрунык<sup>2,3,\*</sup>, С. В. Беликов<sup>2</sup>, Д. В. Луговец<sup>1</sup>, О. В. Губаева<sup>1</sup>,  
М. С. Карбанапов<sup>2</sup>, С. Л. Леонтьев<sup>1</sup>, А. А. Попов<sup>2</sup>

Представлено академиком РАН В.А. Черешневым 12.11.2018 г.

Поступило 19.12.2018 г.

Анодирование поверхности титановых имплантатов сопровождается формированием нанотрубок из диоксида титана, улучшающих процессы остеоинтеграции. Избыточная адгезия фибробластов на поверхности может привести к формированию фиброзной капсулы вокруг имплантата и его отторжению. Мы не выявили повышения уровня адгезии кожных фибробластов человека на поверхность анодированного титана, что является благоприятной предпосылкой для использования титана с нанотрубчатой поверхностью в имплантологии.

*Ключевые слова:* анодированный титан, нанотрубки, фибробласты, адгезия.

**DOI:** <https://doi.org/10.31857/S0869-56524861123-126>

Титан является одним из наиболее часто используемых в медицине материалов для изготовления имплантатов [1]. Одной из главных проблем имплантологии является биосовместимость имплантируемых материалов, выражающаяся в способности имплантата к формированию контакта с окружающими тканями, прежде всего с костной тканью, и минимизации реакций организма, которые могут привести к его отторжению [2].

Для улучшения контакта с клетками костной ткани поверхность имплантата подвергают топографическим и/или химическим модификациям. Анодирование является одним из эффективных и недорогих способов топографической модификации поверхности титанового имплантата. В результате электролитической реакции поверхность титана трансформируется в высокоориентированную структуру, состоящую из плотно упакованных нанотрубок оксида титана [3]. Ряд исследований свидетельствует

о высоком уровне биологической активности анодированного титана. В частности, на его поверхности остеобласты имели более высокую скорость адгезии и пролиферации, а также интенсивность отложения минерализованного матрикса [4, 5].

Характер взаимодействия имплантата с клетками костной ткани является далеко не единственным фактором, определяющим его остеоинтеграцию. В процесс приживления имплантата вовлечены многие другие типы клеток, в частности клетки фибробластического дифферона (фибробласты и мезенхимальные стволовые клетки), мигрирующие в очаг воспаления, образующийся после имплантации, и участвующие в ремоделировании сформировавшихся отложений фибрина [6, 7]. Фибробласты принимают непосредственное участие в приживлении имплантата, продуцируя компоненты внеклеточного матрикса и обеспечивая восстановление мягких тканей. Фибробластоподобные клетки присутствуют также в области контакта имплантата с костной тканью [6]. Избыточная пролиферация этих клеток и секреция ими фибриллярных белков матрикса приводит к формированию фиброзной капсулы вокруг имплантата с последующим его отторжением [8].

Ранее мы разработали технологию анодирования титана, позволяющую формировать на его поверхности нанотрубки одинакового диаметра (примерно 40 нм).

<sup>1</sup>Институт медицинских клеточных технологий,  
Екатеринбург

<sup>2</sup>Уральский федеральный университет им. Б.Н. Ельцина,  
Екатеринбург

<sup>3</sup>Институт высокотемпературной электрохимии  
Уральского отделения Российской Академии наук,  
Екатеринбург

\*E-mail: [juliakhrunyk@yahoo.co.uk](mailto:juliakhrunyk@yahoo.co.uk)

Целью настоящего исследования явилась оценка адгезивной активности кожных фибробластов на нанотрубчатой поверхности анодированного титана.

Исходным материалом для получения линии кожных фибробластов человека был фрагмент кожи площадью  $0,5 \text{ см}^2$ , полученный хирургическим путём от донора после подписания им информированного согласия. Фибробласты из фрагмента кожи выделяли путём диссоциации в растворе коллагеназы. Выделенные клетки выращивали в культуральных флаконах T25 (“Nunc”, Дания) в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе ( $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$ ) до формирования монослоя плотностью  $70\text{--}90\%$ . В качестве ростовой среды использовали смесь сред DMEM + F-12 (Gibco®, “ThermoFisher Scientific”, США) с добавлением  $12\%$  фетальной телячьей сыворотки (Gibco);  $0,03\%$  глутамина и гентамицина ( $50 \text{ мкг/мл}$ ). При пересевах для снятия клеток с культурального пластика использовали  $0,25\%$  раствор трипсина (Gibco®). В экспериментах использовали клетки  $5\text{--}10$  пассажей.

Перед анодированием пластины титана BT1-0 размером  $40 \times 40 \text{ мм}$  (толщина фольги  $0,210 \text{ мм}$ ) промывали изопропанолом. Анодирование производили в ячейке из фторопласта. Титановая пластина служила анодом, а платиновая — катодом. В качестве электролита использовали раствор, содержащий фторид аммония ( $0,5 \text{ г}$  на  $50 \text{ мл}$  воды). После анодирования под напряжением  $20 \text{ В}$  в течение  $1$  часа диаметр нанотрубок составил примерно  $40 \text{ нм}$ . В эксперименте использовали диски из титановой фольги с анодированной и с необработанной поверхностью диаметром  $13 \text{ мм}$ .

Для сравнительной оценки уровня адгезии фибробластов титановые диски раскладывали в чашки Петри (диаметр  $35 \text{ мм}$ ) по  $1$  необработанному диску и  $1$  диску с анодированной поверхностью в каждую. Для дополнительного контроля адгезии на культуральном пластике использовали чашки Петри с обработанной поверхностью (Nunclon™ Delta,) того же размера. В чашки вносили суспензию фибробластов в ростовой среде с плотностью посева  $3000 \text{ клеток/см}^2$ , после чего чашки помещали в  $\text{CO}_2$ -инкубатор. Через определённые промежутки времени клетки фиксировали для последующего окрашивания.

Фиксацию клеток для подсчёта их количества и оценки площади осуществляли с помощью  $2,5\%$  раствора глутарового альдегида. Цитоплазму клеток окрашивали FITC-фаллоидином (“Sigma-Aldrich”, США), ядра окрашивали 4',6-диамиидно-2-фенилиндолом (DAPI, “ThermoFisher Scientific”). Окрашенные диски и чашки Петри с клетками фотогра-

фировали при  $100$ -кратном увеличении в  $9$  позициях. Фотографирование каждой позиции осуществляли в  $2$  каналах флуоресценции: флуоресценция изотиоцианата флуоресцеина (FITC, для цитоплазмы и DAPI для ядер). Изображения анализировали с помощью программы ImageJ.

Все эксперименты выполняли в  $6$  повторностях. Для оценки достоверности различий в количестве клеток и их площади при попарном сравнении трёх групп (анодированный титан, необработанный титан, культуральный пластик) использовали непараметрический критерий Ньюмена–Кейлса.

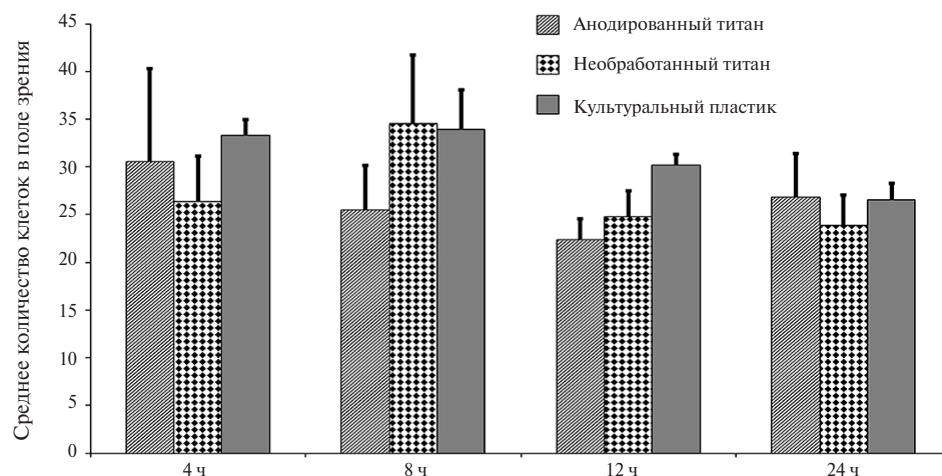
Сравнение уровня адгезии кожных фибробластов на поверхность анодированного и необработанного титана и культурального пластика осуществляли после фиксации клеток через  $4, 8, 12$  и  $24$  ч после посева.

Морфология клеток на анодированном титане, необработанном титане и культуральном пластике существенно не различалась, что свидетельствует о примерно одинаковой скорости адгезии фибробластов на всех трёх типов поверхности.

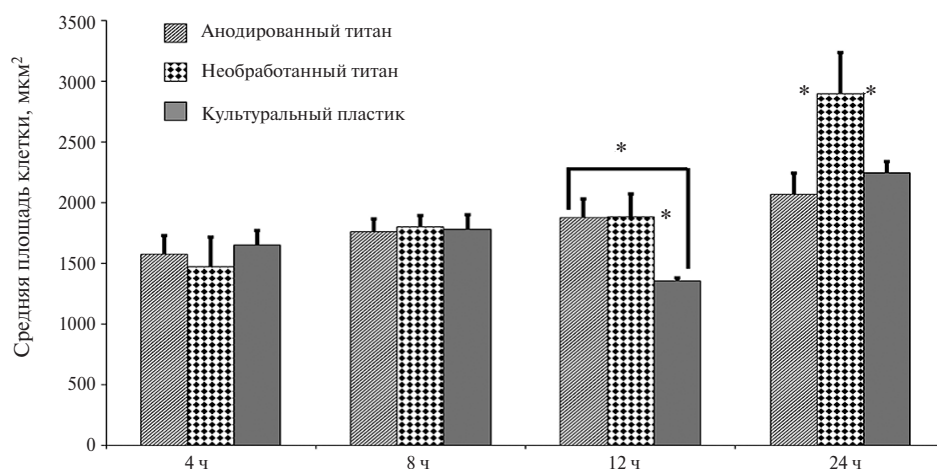
Количество адгезированных фибробластов на поверхность обработанного и необработанного титана достоверно не различалось во всех временных точках. Необходимо отметить, что разница в количестве клеток между культуральным пластиком и обоими типами титана также не была достоверной (рис. 1).

Значения площади клеток на поверхности пластика и на поверхности титана достоверно различались лишь через  $12$  и  $24$  ч культивирования. Достоверные различия этого показателя между анодированным и необработанным титаном мы зарегистрировали только через  $24$  ч, и в этом случае разница составила лишь  $1,4$  раза (рис. 2).

Сведения о влиянии рельефности поверхности титана (в том числе и нанотрубок) на адгезию фибробластов неоднозначны. По данным [9], формирование нанотрубчатой поверхности не приводило к повышению уровня адгезии фибробластов кожи по сравнению с необработанным титаном. В других исследованиях, напротив, отмечено влияние нанотрубчатой поверхности на адгезию фибробластов. Так, в работе [10] анодирование титана, сопровождавшееся образованием нанотрубок, привело к значительному увеличению суммарной площади адгезированных на его поверхность фибробластов кожи [10]. В работе [11] было показано, что клетки культуры фибробластов мыши на нанотрубчатой поверх-



**Рис. 1.** Количество клеток (в среднем в одном поле зрения), адгезированных на поверхность анодированного титана, необработанного титана и культурального пластика через 4, 8, 12 и 24 ч после посева. Здесь и на рис. 2  $M \pm m$ ,  $n = 6$  для каждой группы.



**Рис. 2.** Средняя площадь клеток, адгезированных на поверхность анодированного титана, необработанного титана и культурального пластика через 4, 8, 12 и 24 ч после посева. \* $p < 0,05$ .

ности имели большее количество филоподий и большую их длину.

В проведённых нами экспериментах количество и средняя площадь фибробластов, адгезированных на титане с нанотрубчатой поверхностью, была не выше, чем на необработанной титановой поверхности. При этом уровень адгезии фибробластов на обработанном культуральном пластике не превышал таковой на титане. Таким образом, формирование нанотрубчатой поверхности не способствовало избыточной адгезии фибробластов. Из полученных результатов можно сделать предварительный вывод, что формирование биосовместимой нанотрубчатой поверхности не должно приводить к избыточной колонизации титана фибробластами. Принимая во внимание роль фибробластов в отторжении имплан-

тата, это можно считать благоприятной предпосылкой для успешной остеоинтеграции имплантата в живую ткань. Вместе с тем очевидна необходимость дальнейших исследований характера взаимодействия фибробластов с нанотрубками из диоксида титана.

**Источник финансирования.** Работа выполнена при частичном финансировании грантом РФФИ 18-13-00220.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liu X., Chen S., Tsoi J.K.H., Matinlinna J.P. // Regen. Biomater. 2017. V. 4. № 5. P. 315–323.
2. Civantos A., Martinez-Campos E., Ramos V., Elvira C., Gallardo A., Abarrategi A. // ACS Biomater. Sci. Eng. 2017. V. 3. P. 1245–1261.

3. *Bhosle S.M., Friedrich C.R.* // *Nanotechnology*. 2017. V. 28. № 40. 405603. DOI: 10.1088/1361-6528/aa8399
4. *Zhang Y., Luo R., Tan J., Wang J., Lu X., Qu S., Weng J., Feng B.* // *Regen. Biomater.* 2017. V. 4. № 2. P. 81–87.
5. *Das K., Bose S., Bandyopadhyay A.* // *J. Biomed. Mat. Res. A*. 2009. V. 90. № 1. P. 225–237.
6. *Villar C., Huynh-Ba G., Mills M.P., Cochran D.L.* // *Endodontic Topics*. 2012. V. 25. P. 44–62.
7. *Gittens R.A., Olivares-Navarrete R., Schwartz Z., Boyan B.D.* // *Acta Biomater.* 2014. V. 10. № 8. P. 3363–3371.
8. *Carver W., Esch A.M., Fowlkes V., Goldsmith E.C.* / *The Immune Response to Implanted Materials and Devices*. Switzerland: Springer Int. Publ., 2017. 241 p.
9. *Wei H., Wu S., Feng Z., Zhou W., Dong Y., Wu G., Bai S., Zhao Y.* // *Int. J. Nanomedicine*. 2012. V. 7. P. 1091–1100.
10. *Smith B.S., Yoriya S., Johnson T., Popat K.C.* // *Acta Biomater.* 2011. V. 7. № 6. P. 2686–2696.
11. *Lin S.P., Huang S.Y., Chen S.F., Vinzons L.U., Ciou J.Y., Wong P.J.* // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2014. V. 6. № 15. P. 12 071–12 082.

## THE ADHESION OF HUMAN DERMAL FIBROBLASTS ON ANODIZED NANOTUBE-LAYERED TITANIUM, MODIFIED FOR IMPLANTOLOGY APPLICATION

**F. A. Fadeyev<sup>1</sup>, Yu. Ya. Khrunyk<sup>2,3</sup>, S. V. Belikov<sup>2</sup>, D. V. Lugovets<sup>1</sup>, O. V. Gubaeva<sup>1</sup>,  
M. S. Karabanalov<sup>2</sup>, S. L. Leontyev<sup>1</sup>, A. A. Popov<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*GAUZ SO Center of specialized types of medical care Institute for Medical Cell Technologies,  
Ekaterinburg, Russian Federation*

<sup>2</sup>*Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation*

<sup>3</sup>*Institute of High Temperature Electrochemistry of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,  
Ekaterinburg, Russian Federation*

Presented by Academician of the RAS V.A. Chereshnev November 12, 2018

Received December 27, 2018

Anodization of titanium implants is accompanied by the formation of titanium oxide nanotubes improving osseointegration. An excessive fibroblast adhesion on the surface might lead to the formation of fibrous capsule resulting in implant rejection. In our research, we demonstrated that the adhesion activity of human dermal fibroblasts on anodized surface was not elevated, which is promising for the use of titanium with nanotube-layered surface for implantology.

*Keywords:* titanium, nanotubes, fibroblasts, adhesion.