



УДК 615.466

ОЦЕНКА БИОАКТИВНОСТИ И БИОСОВМЕСТИМОСТИ ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА В ОПЫТАХ IN VITRO И IN VIVO

М.З. ФЕДОРОВА¹
С.В. НАДЕЖДИН¹
В.Ф. ПОСОХОВА²
В.В. ЧУЕВ¹
В.А. ШАТЕРНИКОВА¹

¹ Белгородский
государственный
национальный
исследовательский
университет

² ЗАО «ОЭЗ «ВладМиВа»

e-mail: : nadezhdin@bsu.edu.ru

Проведена оценка цитотоксичности и способности поддерживать гистотипическую дифференцировку клеток при имплантации нового остеопластического материала для восстановления дефектов костных тканей. Работа выполнена в двух сериях с использованием лабораторных белых крыс линии Вистар. В качестве материала исследования использовалась резорбируемая биомембрана на основе ксеноколлагена, изготовленная на предприятии ЗАО «ОЭЗ «ВладМиВа», г. Белгород. Исследование образцов проводилось при помощи микроскопии проходящего света, конфокальной лазерной сканирующей микроскопии и растровой электронной микроскопии. В ходе исследования было установлено, что материал в виде резорбируемой мембраны на основе коллагена не является цитотоксичным, инкубированные на нем клетки сохраняют жизнеспособность и свои морфологические особенности. Инокулированный под кожу остеопластический материал является биоактивным и биосовместимым, в зоне дефекта отмечается его резорбция и активное протекание регенераторного процесса соединительных тканей

Ключевые слова: остеопластический материал, резорбируемая биомембрана, биоактивность, биосовместимость, биорезистентность.

В настоящее время наиболее перспективную и стремительно развивающуюся группу материалов, используемых в современной хирургической стоматологии, челюстно-лицевой хирургии и травматологии, представляют материалы на основе металла, керамики, полимеров и композитов [3, 5, 6]. Любой материал, применяемый для профилактики или устранения дефектов соединительных тканей, следует оценивать с учетом основных характеристик, к которым относятся биоактивность, биосовместимость, биорезистентность. Степень выраженности биоактивности имплантированного образца, в зависимости от его физико-химических характеристик, лежит в диапазоне от биорезистентности до цитотоксичности. При этом биоактивность и биосовместимость находятся в прямой зависимости от биорезистентности материала, что оказывает существенное влияние на сроки применения лечебных препаратов и остеопластических материалов. На сегодняшний день для оценки биоактивности создаваемых прототипов остеопластических стоматологических материалов широко используют различные клеточные культуры и нативные клетки красного костного мозга [4]. Биосовместимость медицинских изделий принято оценивать методом прямой имплантации материала под кожу, в мышечную ткань или непосредственно в кость [2].

Целью исследования явилась оценка цитотоксичности и способности поддерживать гистотипическую дифференцировку клеток при имплантации нового остеопластического материала для восстановления дефектов костных тканей.

Материалы и методы.

В качестве материала исследования использовалась резорбируемая биомембрана на основе ксеноколлагена, изготовленная на предприятии ЗАО «ОЭЗ «ВладМиВа», г. Белгород. Натуральная белковая структура мембраны имеет морфологию плотно ориентированных волокон, легко моделируется, обладает оптимальной жесткостью и пластичностью. Плотный внешний слой мембраны, обращенный к мягким тканям, предотвращает пролиферацию эпителиоцитов и инокуляцию рыхлой и плотной соединительной ткани. Пористый внутренний слой, обращенный к кости, способствует созданию оптимальных условий для связывания факторов роста и дифференциации

остеоцитов из предшественников (рис. 1). Благодаря пористой структуре, непосредственно перед применением, в материал можно дополнительно вводить лекарственные средства (антисептики, антибиотики, гемостатики) и факторы роста, что позволяет предотвратить воспалительные процессы и ускорить процесс регенерации костной ткани.

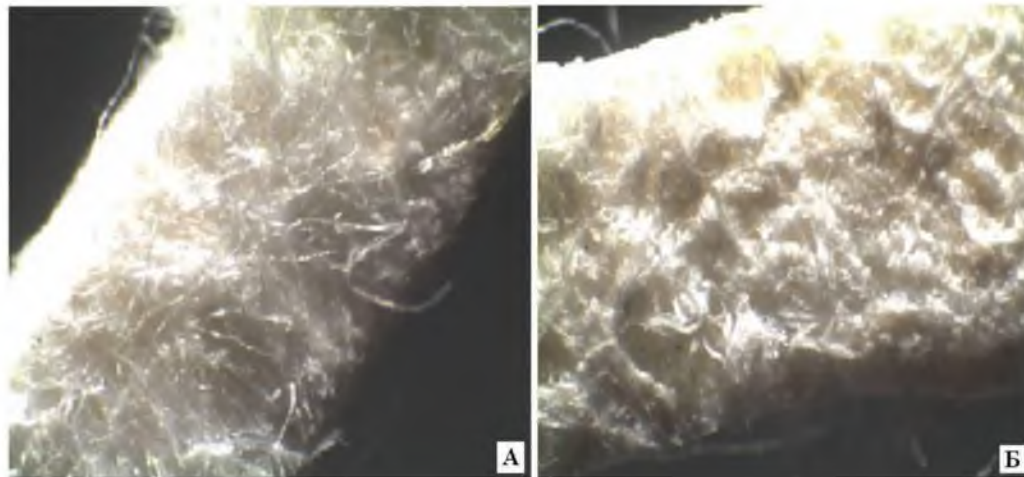


Рис. 1. Резорбируемая мембрана с различной топографией поверхности сторон (А – внутренняя сторона, Б – внешняя сторона)

Работа выполнена в двух сериях с использованием лабораторных белых крыс самцов линии Вистар (Питомник лабораторных животных «Столбовая» РАМН).

В первой серии – опыты *in vitro* для оценки биоактивности образцов – использовали клетки красного костного мозга, которые выделяли непосредственно перед проведением теста на цитотоксичность. На данном этапе работы исследования проводили согласно ГОСТ Р ИСО 10993-6-2009 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*, методом прямого контакта. Использовали флуоресцентный метод анализа жизнеспособности клеток с двойным окрашиванием – этидиум бромидом (Helicon) и ацетооксиметилловым эфиром кальцеина (Fluka) [10]. В этой серии использовано три крысы, которых умерщвляли передозировкой парами эфира с последующим удалением большеберцовых костей. Выделенные кости очищали от мягких тканей, отсекали эпифизы и вымывали красный костный мозг физиологическим раствором с помощью шприца в чашку Петри с питательной средой 199 [7, 8]. Полученную суспензию клеток делили на две части: первая использовалась для контроля – инкубации клеток в чашке Петри на стекле (три повтора), вторая – опытная для инкубации клеток на поверхности мембраны (три повтора). Образцы мембраны в виде тонкого лоскута помещали в стерильные чашки Петри и наносили на их поверхность 30 мкл суспензии клеток красного костного мозга, столько же суспензии наносили на поверхность покровного стекла (контроль). По истечении 2 минут в чашки Петри доливали 3 мл питательной среды 199 (ПанЭко, Москва). Все пробы инкубировали в термостате при +37°C в присутствии 5% двуокиси углерода в течение 3 часов. Затем во всех чашках Петри сливали несвежую питательную среду и приливали 300 мкл свежей с добавлением 150 мкл флуоресцентного красителя. Пробы с флуоресцентным красителем инкубировали 5 мин в термостате при +37 °С в присутствии двуокиси углерода. После истечения времени образцы в виде мембраны вынимали из чашек Петри и помещали на покровные стекла (опытная проба). На покровные стекла опытной (с мембраной) и контрольной проб (только клетки) добавляли 150 мкл питательной среды 199.

Сканирование проб и последующий анализ проводили на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Nikon DIGITAL ECLIPSE C1 plus с использованием лазера 488 нм и режима Z-Stack (сканирование образца по осям X, Y, Z). В пробах на каждые 100



клеток подсчитывали количество живых (зеленая флуоресценция в цитоплазме) и мертвых клеток (красная флуоресценция в ядре), рассчитав их жизнеспособность (%) [9].

Изучение морфологии клеток костного мозга опытных и контрольных проб проводили на растровом электронном микроскопе (РЭМ) «Quanta 200 3D» (FEI Company, США) в режиме низкого вакуума (оборудование Центра коллективного пользования научным оборудованием НИУ «БелГУ» «Диагностика структуры и свойств наноматериалов»).

Во второй серии в опытах *in vivo* для оценки биосовместимости материала был применен метод «Подкожной инокуляции» согласно требованиям ГОСТ Р ИСО 10993-6-2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследования местного действия после имплантации». Использовано 12 животных по 6 штук в опытной и контрольной (ложно оперированные) группах. Все экспериментальные исследования с использованием животных проводили в соответствии с международными требованиями [11] и согласно ГОСТ Р ИСО 10993-6-2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными».

Опытной группе инокулировали мембрану в прослойку соединительной ткани под кожу, расположенную на спине подопытного животного. После проведения анестезии и обработки участка кожи антисептическим раствором разрежали кожу животного, тупым рассечением делали один карман шириной 2 мм и глубиной 4 мм. В карман помещали один образец исследуемого материала, рану обрабатывали спиртовым раствором специальной синтетической фенолформальдегидной смолы, поливинилбутирола и канифоли с добавлением пластификатора. В группе контроля (ложно оперированные животные) все манипуляции осуществляли по схеме, примененной на крысах опытной группы. Оценка биологического действия материалов проводили через 7 дней после операции, макро- и микроскопически исследовали реакцию соединительных тканей в зоне дефекта. Степень реакции определяли измерением расстояния от поверхности соприкосновения имплантата с тканью до участков, имеющих характеристики интактной ткани с нормальным кровообращением. После макроскопического исследования проводили резекцию соединительной ткани.

Гистологические препараты из тканей зоны дефекта готовили общепринятыми методами. Оценивали следующие параметры: степень фиброза и воспаления; дегенерацию окружающих тканей; наличие некроза; степень интеграции материала имплантата с соединительной тканью инокуляционной зоны. Объем регенераторного процесса (в %) определяли при помощи сетки со 100 точками (81 квадрат = 100%), вставленной в окуляр стереомикроскопа *Leica EZ4D* [1]. Гистологические препараты, окрашенные гематоксилин-эозином, изучали при помощи аппаратно-программного комплекса Видео-Тест-Размер (микроскоп *Axioplan plus* фирмы *Zeiss*).

Результаты исследования и их обсуждение.

В эксперименте *in vitro* при помощи конфокальной лазерной сканирующей микроскопии была зарегистрирована флуоресценция живых и мертвых клеток, инкубированных на стекле (контрольная проба) и на резорбируемой мембране (опытная проба). При сканировании каждой мембраны послойно (по оси Z) выявлены клетки красного костного мозга, располагающиеся во всей толще материала (рис. 2).

Анализ флуоресцентных изображений слоев мембраны (опыт) и поверхности покровного стекла (контроль) показал, что жизнеспособность клеток красного костного мозга, взаимодействующих с волокнами мембраны, составляет 80% и не отличается от клеток, контактирующих со стеклом. В ходе изучения электронограмм было установлено, что на резорбируемых мембранах клетки красного костного мозга сохраняют свои морфологические особенности. Поверхность клеток имеет развитую складчатость с выростами в виде коротких микроворсинок и ламеллоподий. Часть клеток, прикрепившись к субстрату, сохраняет сферическую форму, другие клетки распластаны по субстрату и имеют вид полусферы (рис. 3).

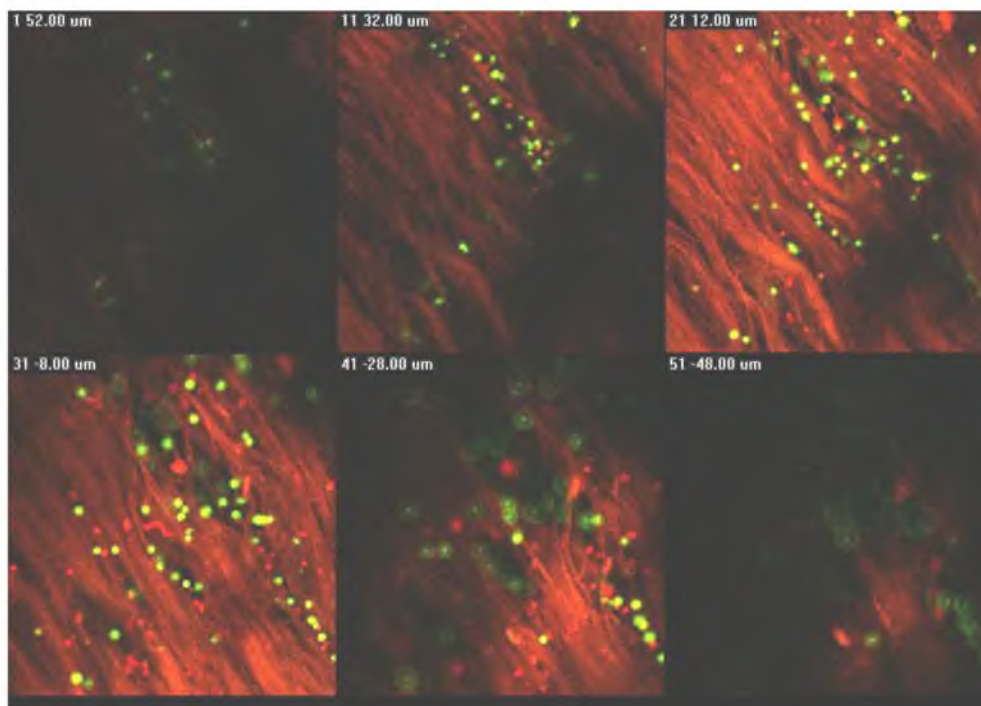


Рис. 2. Серии оптических срезов: №1, 11, 21, 31, 41, 51 (слева направо) с флуоресценцией волокон резорбируемой мембраны (красный цвет) и живых (зеленая флуоресценция) и мертвых (красная флуоресценция) клеток красного костного мозга. Увел. X 40

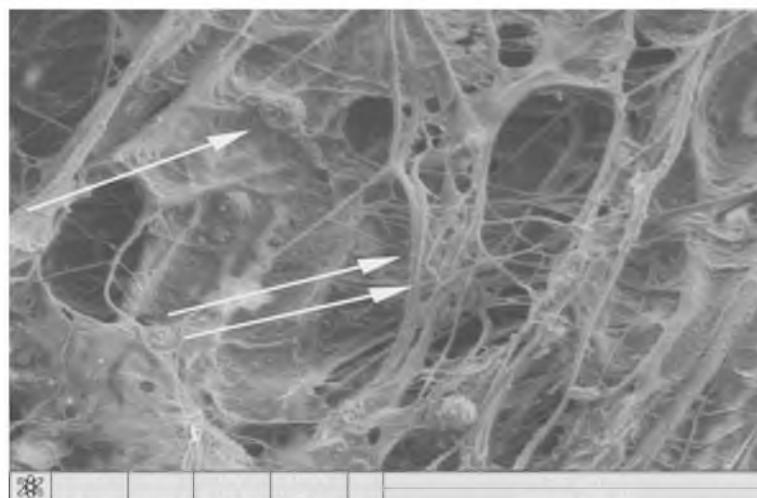


Рис. 3. Электронограмма. Клетки костного мозга (одинарная стрелка) на поверхности резорбируемой мембраны (волокна ксеноколлагена – двойная стрелка)

Таким образом, компоненты резорбируемой мембраны не обладают цитоцидным и цитостатическим эффектами, а структура и топография поверхности мембраны не препятствует миграции клеток в толщу материала.

В опытах *in vivo*, при макроскопическом изучении зон дефекта, на коже животных внешних признаков местной асептической воспалительной реакции не выявлено во всех экспериментальных группах. Так, в зоне дефекта у животных контрольной группы с внутренней стороны кожного лоскута отмечается умеренная васкуляризация тканей, что свидетельствует о завершении процессов регенерации. Нижележащие под кожей слои соединительной и мышечной тканей в зоне дефекта без признаков патологической дегенерации. В соединительно-тканном регенерате преобладают зрелые фибробласты над другими клеточными элементами; паренхима представлена волокнистыми структурами с продольной ориентацией. Степень реакции ткани на опера-



тивное вмешательство была слабой и составляла менее 0,5 мм. Объем регенераторного процесса составил 10% площади зоны дефекта.

Более интенсивное протекание регенераторного процесса в зоне дефекта отмечается в опытной группе. В данной группе вокруг резорбируемой мембраны сформировалась соединительно-тканная капсула. Извлеченная из капсулы резорбируемая мембрана имела меньшие геометрические параметры (1 мм x 1 мм x 0,5 мм) по сравнению с исходными. Капсула мягкой консистенции с тонкой стенкой, через которую просматривается резорбируемая мембрана. Паренхима капсулы имеет обильную васкуляризацию. Кровеносные капилляры полнокровны, образуют густую сеть по всей поверхности капсулы (рис. 4).

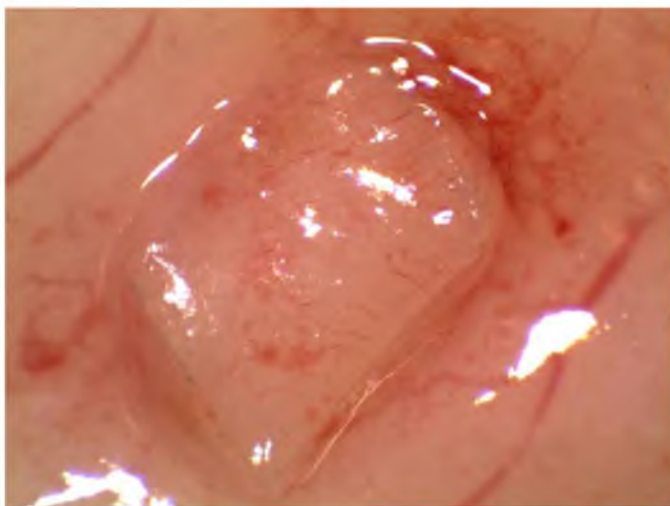


Рис. 4. Соединительно-тканная капсула с густой сетью кровеносных капилляров вокруг резорбируемой мембраны

Степень реакции ткани на инокуляцию данного материала была умеренной и составила 1,5 мм. Объем регенераторного процесса составил 70% площади зоны дефекта. В соединительно-тканном регенерате преобладает плотная волокнистая соединительная ткань, имеющая продольную ориентацию фибрилл. Повсеместно в паренхиме регенерата определяются как дифференцирующиеся, так и зрелые фибробласты. Резорбируемая биомембрана в силу своих физико-химических свойств способствует репаративной регенерации соединительных тканей и формированию густой сети микрокапилляров. В месте имплантации отмечается резорбция биомембраны с сохранением заданных свойств, что свидетельствует о слабой биорезистентности компонентов материала к воздействию сред организма.

Заключение.

В ходе исследования было установлено, что резорбируемая биомембрана не является цитотоксичной, продукты ее разрушения при контакте с клетками не оказывают отрицательного воздействия на процессы их жизнедеятельности. Инокулированная под кожу мембрана является биоактивной, биосовместимой, биорезорбируемой и может использоваться в качестве прототипа нового остеопластического материала для восстановления дефектов костных тканей.

Работа выполнена в рамках договора об условиях предоставления и использования субсидии на реализацию комплексного проекта по созданию высокотехнологичного производства, выполняемого с участием российского высшего учебного заведения № 13.G25.31.0006 от 07.09.2010 г. «Биосовместимые композиционные и кальцийсодержащие остеопластические и лечебно-профилактические материалы для медицины».

Литература

1. Автандилов, Г.Г. Медицинская морфометрия / Г.Г. Автандилов. — М. : Медицина, 1990. — 384 с.



2. Григорян, А.С. Проблемы интеграции имплантатов в костную ткань (теоретические аспекты) / А.С. Григорян. — М. : Техносфера, 2007. — 128 с.
3. Грудянов, А.И. Остеопластические материалы, используемые при хирургическом лечении заболеваний пародонта / А.И. Грудянов, А.И. Ерохин // Пародонтология. — 1998. — № 1. — С. 13-21.
4. Еропкина, М.Ю. Культуры клеток как модельная система исследования токсичности и скрининга цитопротекторных препаратов. / М.Ю. Еропкина, Е.М. Еропкин. — СПб. : МОРСАР АВ, 2003. — 239 с.
5. Корж, Н.А. Имплантационные материалы и остеогенез. Роль индукции и кондукции в остеогенезе / Н.А. Корж, В.А. Радченко, Л.А. Кладченко // Ортопедия, травматология и протезирование. — 2003. — № 2. — С. 150-157.
6. Островский, А. В. Остеопластические материалы в современной пародонтологии и имплантологии / А. В. Островский // Новое в стоматологии. — 1999. — № 6. — С. 39-52.
7. Петров, Р.В. Костномозговые иммунорегуляторы миелопептиды / Р.В. Петров, А.А. Михайлова, Л.А. Фомина // Российский химический журнал : Научно-теоретический журнал по химии и химической технологии. Журнал Российского общества им. Д.И. Менделеева. — 2005. — Т. 49, №1. — С. 55-63.
8. Пинаев, Г.П. Методы культивирования клеток / Г.П. Пинаев, М.С. Богданова. — СПб. : Изд-во Политехн. ун-та, 2008. — 278 с.
9. Andrew, L. Fluorescent Viability Stains Overestimate Chondrocyte Viability in Osteoarticular Allografts / L. Andrew, M. James, A. Annunziato // The American Journal of Sports Medicine. — 2007. — Vol. 35. — № 11. — P. 1817-1823.
10. Alderson, M. Fas Ligand Mediates Activation-induced Cell Death in Human T Lymphocytes / Mark g. Alderson. // J. Exp. Med. — 1995. — Vol. 181. — P. 71 - 77.
11. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. — URL: <http://www.aaalac.org/resources/theguide.cfm> (дата обращения 12.03.2012).

THE ESTIMATION OF BIOACTIVITY AND BIOCOMPATIBILITY OF OSTEOPLASTIC MATERIAL IN EXPERIENCES IN VITRO AND IN VIVO

M.Z. FEDOROVA¹
S.V. NADEZHDIR¹
V.F. TPOSOKHOVA²
V.V. CHUEV¹
V.A. SHATERNIKOVA¹

¹*Belgorod National Research University*

²*Joint-Stock Company SEZ VladMiVa*

e-mail: nadezhdin@bsu.edu.ru

The aim of the study is the estimation of the cytotoxicity and ability to support a histotypic differentiation of cells during the implantation of a new osteoplastic material used for restoration of defects of bone tissues. The research is performed in two stages and is based on the use of white laboratory rodents (Wistar). The resorbable biomembrane based on xenokollagen, which was made by Joint-Stock Company SEZ *VladMiVa* (Belgorord) is used as a research material. The study of samples was conducted with the transmitted light microscopy, confocal laser scanning microscopy and scanning electron microscopy. As it is established in the course of study the resorbable biomembrane based on xenokollagen as the data for research is not cytotoxic; cells incubated on it retain their viability and morphological features. The osteoplastic material inoculated under skin is biocompatible and bioactive; and its resorption and active progress of regenerative process of connective tissue is marked.

Key words: osteoplastic material, resorbable biomembrane, bioactivity, biocompatibility, bioresistance.