

УДК 57.085.23

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ СОВМЕСТИМОСТИ БИОПЛАСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА «ГИАМАТРИКС» НА КУЛЬТУРЕ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ

© 2015 И.Р. Гильмутдинова¹, В.В. Россинская², В.В. Болтовская², Л.Н. Кулагина²

¹ Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна

² Самарский государственный медицинский университет

Поступила в редакцию 20.03.2015

В данной статье представлены результаты исследования биосовместимости биопластического материала «Гиаматрикс» in vitro на культуре дермальных фибробластов человека.

Ключевые слова: эксперименты in vitro, культура клеток

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время имеется целый ряд искусственных и биогенной природы материалов, применяемых в современной комбустологии для лечения поверхностных ран и ожогов [1]. Ведутся разработки по созданию биodeградируемых матриксов для решения задач тканевой скаффолд-инженерии, в частности, для создания протезов кожи для лечения поверхностных ожогов и ран [2; 3]. Наиболее перспективным направлением считается использование для лечения ожоговых ран таких биополимеров как коллаген, желатин, гиалуроновая кислота и др. [4].

В последние годы уделяется большое внимание именно гиалуроновой кислоте (ГК), которая представляет собой естественный компонент межклеточного вещества различных тканей.

Матрикс для использования в регенеративной медицине и создания биоискусственных тканей должны характеризоваться:

- многофункциональностью (одновременно выполнять роль каркаса, подложки и питательной среды для клеточных культур);
- механической прочностью и эластичностью, достаточной для хирургических манипуляций;
- биосовместимостью на белковом и клеточном уровнях;
- способностью стимулировать пролиферацию и дифференциацию клеток;
- пористостью, обеспечивая процессы неоваскуляризации;
- возможностью стерилизации стандартными

способами без изменения медико-технических свойств [5].

Целью нашего исследования явилась оценка цитотоксичности биопластического материала «Гиаматрикс» и его влияния на функциональную и пролиферативную активность дермальных фибробластов человека. Фибробласты играют одну из главных ролей в регенерации кожи. Они представляют собой наиболее многочисленную популяцию клеток дермы, функция которых состоит в построении межклеточного вещества соединительной ткани.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для тестирования на биосовместимость были представлены стерильные образцы биопластического материала «Гиаматрикс», полученного с помощью метода фотохимического наноструктурирования гидроколлоида ГК (патент РФ № 2367476 от 21.03.2008) в виде пленок толщиной 1 мм. В качестве тест-системы была использована культура дермальных фибробластов человека 7 пассажа, выращенных из кожи доноров.

Исследование осуществляли методом прямого контакта в культуральных чашках Петри диаметром 3,5 см («Orange Scientific», Бельгия) в условиях CO₂-инкубатора (Sanyo MCO-18AC, Япония) при t 37°C, содержании CO₂ 5% и постоянной влажности в полной ростовой среде (среда 199 с 10% эмбриональной телячьей сыворотки). В работе использованы реактивы ООО «Биолот», Россия. Все манипуляции с культурой проводили в ламинарном боксе БАВп-01 «Ламинар С» (ЗАО «Ламинарные системы», Миасс, РФ).

Для оценки цитотоксичности материала (1 серия) применяли ЛДГ-тест. Фибробласты снимали со дна культурального флакона стандартным способом (при помощи 0,25% раствора трипсина и 0,02% раствора Версена) и пересевали в культуральный 24-луночный планшет в дозе 30 тыс. клеток на лунку. Через 24 часа на сформированный монослой помещали образцы материала

Гильмутдинова Ильмира Ринатовна, врач-трансфузиолог. E-mail: gilm.ilmira@mail.ru

Россинская Виктория Викторовна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник ИЭМБ.

E-mail: rossinskaya_v_v@mail.ru

Болтовская Виолетта Викторовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник ИЭМБ.

E-mail: violetta.boltovskaya@yandex.ru

Кулагина Лариса Николаевна, инженер ИЭМБ.

E-mail: lnkulagina07@mail.ru

размером 3x3 мм. Фибробласты в присутствии материала культивировали 48 часов. Активность ЛДГ определяли в культуральной среде и в клетках монослоя по убыли NADH в ходе реакции превращения пирувата в лактат.

Количество поврежденных клеток выражали как процентное отношение активности ЛДГ в среде к суммарной активности ЛДГ в лизате и в ростовой среде.

Для оценки пролиферативной активности фибробластов в присутствии биоматериала «Гиаматрикс» (2 серия) клетки высевали в культуральные чашки Петри диаметром 3,5 см («Orange Scientific», Бельгия). Посевная доза составляла 5 тыс. клеток/см² (1x10⁴). Через 24 ч на образовавшийся монослой фибробластов помещали образцы материала размером 5x5 мм.

С целью выяснения влияния биоматериала «Гиаматрикс» на адгезивную способность дермальных фибробластов (3 серия), на дно чашек сначала помещали образцы материала, а затем высевали клетки. Посевная доза составляла 10 тыс. клеток/см² (1x10⁴).

Контролем во всех сериях служили чашки или лунки с культурой фибробластов без образцов материала, которые пассировали и наблюдали одновременно с экспериментальными. Продолжительность наблюдения во 2 и 3 сериях – 7 суток.

Нативные культуры изучали, фотографировали и морфометрировали с помощью инвертированного микроскопа «Биолам-П2-1» при увеличении 63 и 100 (окуляры – 6,3 и 10, объектив – 10). Оценивали целостность монослоя, наличие слущенных клеток в культуральной жидкости, форму и размеры клеток, структуру клеток. Плотность клеток монослоя на единицу площади определяли с помощью окулярной сетки Автандилова, а количество слущенных клеток в культуральной жидкости и соотношение живых и мертвых клеток (при пересеве) – с помощью камеры Горяева. На основании данных о плотности монослоя рассчитывали индекс адгезии, время удвоения культур, индекс пролиферации по формулам:

Время удвоения культуры

$$TD = t \lg 2 / \lg(N_t / N_0),$$

где t – время инкубации (ч);

N₀ – начальная доза клеток на пластике;

N_t – количество клеток выросших за время t;

Количество удвоений

$$\text{Кол-во удвоений} = (\lg N_t - \lg N_0) / \lg 2$$

где N_t – количество клеток, выросших за время t;

N₀ – начальная доза клеток на пластике;

Индекс адгезии

Считают через 24 ч после посадки клеток

$$ИА = N_2 \cdot 100 / N_1,$$

где N₁ – посевная доза;

N₂ – кол-во клеток на пластике через 24 ч после посева.

По окончании каждого срока эксперимента готовили гистологические препараты клеточных культур. Препараты, окрашенные по Романовскому, гематоксилином Майера, трипановым синим изучали и фотографировали с помощью автоматизированной аналитической системы, включающей микроскоп «Olympus BX 41», цифровую фотокамеру Prog RCF системный блок на базе процессора Intel Pentium 4. Для анализа изображений использовали программу «Видеотест Морфология 5.2». В окрашенных препаратах также считали количество клеток на единицу площади. Всего изучено 64 препарата.

Статистическая обработка данных выполнена с помощью пакета прикладных программ Statistica 10.0 с учетом современных требований к предъявлению результатов статистического анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение пролиферативной активности дермальных фибробластов при культивировании их в присутствии биоматериала «Гиаматрикс»

Через 1 сутки после помещения на монослой образца материала каких-либо изменений пролиферативной активности дермальных фибробластов по сравнению с контролем не наблюдалось. Клетки располагались по дну культурального пластика неравномерно. Большинство клеток имело характерную веретенообразную форму. Вместе с тем дермальные фибробласты четко контурировались, крупные ядра были расположены ближе к периферии, имели овальную форму и ровные границы оболочки (рис. 1).

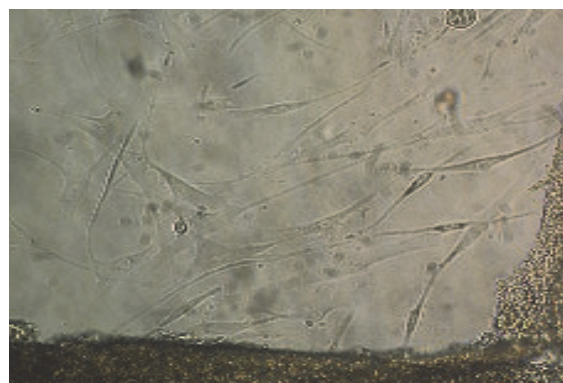


Рис 1. Опыт. Культура фибробластов человека в присутствии материала «Гиаматрикс».

1 сутки эксперимента.

Клетки в непосредственной близости от образца.

Нативный препарат.

Инвертированный микроскоп.

Увеличение 100

В течение 2 и 3 суток эксперимента наблюдалось увеличение количества клеток,

локализуемых вокруг образца. Фибробласты располагались плотно друг к другу, формируя тяжи. Отмечалось большое количество делящихся клеток. Однако, по сравнению с контролем их пролиферативная способность была снижена, о чем свидетельствовала меньшая площадь монослоя в присутствии биоматериала. Морфологически клетки не отличались от контрольной группы. Каждая клетка имела по два-четыре отростка разной длины, с помощью которых соседние клетки соединялись между собой, в результате чего формировался равномерный монослой. На периферии отмечались единичные клетки с пикнотичными ядрами и вакуолизированной цитоплазмой. Однако в последующие сроки активная пролиферация фибробластов как вблизи образца, так и в отдаленных от него зонах восстанавливалась, за счет чего через 5 суток индекс пролиферации был выше, а время удвоения – короче, чем в контроле. Такое же соотношение этих показателей отмечалось по окончании эксперимента, в результате чего плотность монослоя через 7 суток в контроле и опыте была практически одинаковой (рис. 2, 3).

Количество поврежденных фибробластов в монослое в течение первых трех суток эксперимента было несколько больше в опытной серии, что можно связать с незначительным повреждающим действием образца на прикрепленные к пластику клетки.

Морфофункциональные характеристики культуры фибробластов при культивировании в присутствии биоматериала «Гиаматрикс» представлены в табл. 1.

Результаты ЛДГ-теста показали, что доля поврежденных клеток в присутствии материала не отличается от таковой в контрольной культуре (7,22% и 7,47%), что говорит об отсутствии цитотоксичности «Гиаматрикса».

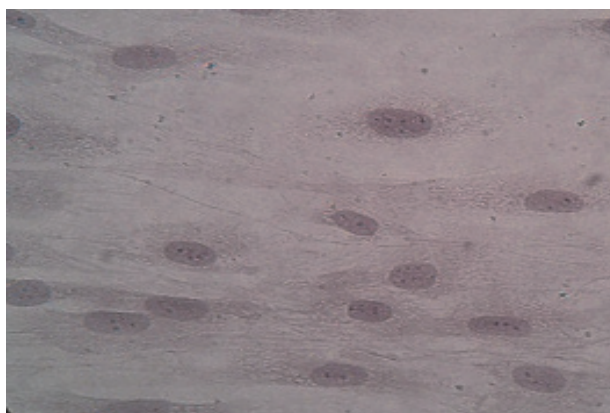


Рис. 2. Контроль. Культура фибробластов человека. 7 суток эксперимента.
Клетки веретенообразной формы с отростками разной длины.
Окраска гематоксилином и суданом IV.
Увеличение 200

БИОСОВМЕСТИМОСТЬ МАТЕРИАЛА «ГИАМАТРИКС» ПРИ ОДНОВРЕМЕННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ФИБРОБЛАСТОВ

Через сутки после постановки эксперимента фибробласты как в контроле, так и в опыте равномерно были распределены по дну культуральных чашек. Индекс пролиферации (90% и 90%) и соотношение живых и поврежденных клеток также были одинаковы. Клетки имели типичную для фибробластов вытянутую веретенообразную, продолговатую и звездчатую форму с гомогенной цитоплазмой и ядром овальной формы. В ядре хроматин распределялся диффузно. Данная морфология характерна для молодых активных фибробластов. Все это свидетельствует об отсутствии изменений адгезивной способности дермальных фибробластов в присутствии биоматериала «Гиаматрикс».

К 3 суткам при наблюдении в инвертируемый микроскоп количество клеток увеличивалось, однако плотность монослоя была меньше, чем в контроле. На поверхности материала было заметно незначительное количество прикрепленных к нему клеток. В непосредственной близости от Гиаматрикса отмечалось наличие делящихся фибробластов. Основное количество фибробластов локализовалось ближе к материалу. По периферии плотность клеток была меньше, наблюдались единичные клетки с нарушением структурной организации (цитоплазматические включения в виде вакуолей, пикноз ядра).

В более поздние сроки рост культуры фибробластов в присутствии биоматериала «Гиаматрикс» подчинялся той же закономерности, что и при помещении материала на монослой.

Морфометрические показатели морфофункциональной активности дермальных фибробластов представлены в табл. 2.

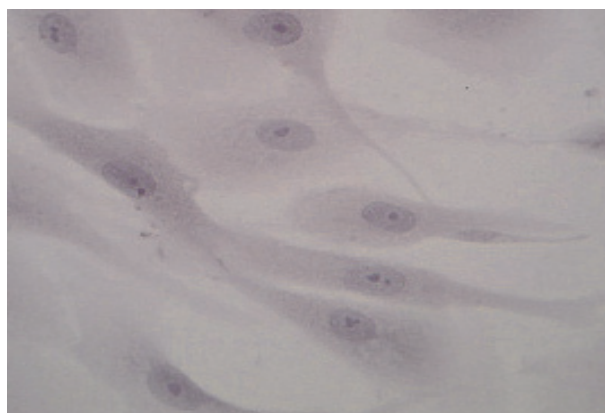


Рис. 3. Опыт. Культура фибробластов человека в присутствии материала «Гиаматрикс». 7 суток эксперимента.
Клетки сохраняют обычную структуру.
Окраска гематоксилином и суданом IV.
Увеличение 400

Таблица 1. Характеристики культур фибробластов при помещении. Гиаматрикса на монослой

Показатели	Исходные данные		1 сут		3 сут		5 сут		7 сут	
	M±m		M±m		M±m		M±m		M±m	
	Конт-роль	Опыт	Конт-роль	Опыт	Конт-роль	Опыт	Конт-роль	Опыт	Конт-роль	Опыт
Плотность монослоя, кл/0,1 мм ²	4,7±0,4	4,7±0,4	9,1±1,5	9,2±2,0	36,5±6,1	29,8±4,5**	151,7±19,6	136,6±7,4**	352±6,5	387,8±6,2
Индекс пролиферации, отн. ед.	-	-	1,8±0,15	1,76±0,2	2,1±0,3	1,6±0,5*	2,1±0,2	2,3±0,2*	1,1±0,1	2,9±0,1**
Время удвоения, ч	-	-	29,72±4,6	29,24±4,7	22,1±4,5	28,6±2,6***	23,4±1,6	21,8±1,5**	35,1±0,2	28,8±2,6***
Живые // поврежденные клетки, %	-	-	91,4±0,5 // 8,6±0,5	81,6±1,0 // 18,4±1,2	95,0±0,8 // 5,0±0,8	89,0±0,8 // 11,0±0,8	94,6±0,8 // 5,4±0,8	92,2±1,4 // 7,8±1,4	91,9±0,8 // 8,1±0,9	89,9±1,0 // 10,1±1,0

Примечание: различия достоверны по сравнению с соответствующими значениями в контрольной группе при: * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001

Таблица 2. Характеристики культур фибробластов при одновременном культивировании

Показатели	1 сут		3 сут		5 сут		7 сут	
	M±m		M±m		M±m		M±m	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Плотность монослоя, кл/0,1 мм ²	9,0 ± 1,5	9,1 ± 1,35	38,0 ± 0,4	26,8 ± 0,8***	150 ± 0,4	126,6 ± 1,0***	352 ± 6,5	344,6 ± 4,6***
Индекс пролиферации, отн. ед.	-	-	2,1 ± 0,3	1,5 ± 0,1** *	2,1 ± 0,2	2,4 ± 0,1***	1,13 ± 0,1	1,4 ± 0,05***
Время удвоения, ч	-	-	22,1 ± 4,5	28,6 ± 1,4***	23,4 ± 1,6	21,2 ± 0,4***	35,1 ± 0,2	33,3 ± 0,4***
Живые // поврежденные клетки, %	91,4 ± 0,5 // 8,6 ± 0,5	90,6 ± 0,5 // 9,4 ± 0,5	95,0 ± 0,8 // 5,0 ± 0,8	89,6 ± 0,5 // 10,4 ± 0,5	94,6 ± 0,8 // 5,4 ± 0,8	92,9 ± 0,7 // 7,1 ± 0,7	91,9 ± 0,8 // 8,1 ± 0,9	86,5 ± 0,5 // 13,5 ± 0,5

Примечание: *** – различия достоверны (при p<0,001) относительно соответствующего значения в контрольной группе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного нами с помощью морфологических и биохимических методов исследования биосовместимости биопластического материала «Гиаматрикс» in vitro показали, что данный материал не оказывает цитотоксического действия на культуру дермальных фибробластов человека и не влияет на адгезивную способность этих клеток. Вместе с тем при культивировании дермальных фибробластов в присутствии образ-

цов «Гиаматрикса» происходит волнообразное изменение пролиферативной активности клеток тест-системы, которое выражается в уменьшении этого показателя в ранние сроки эксперимента (до конца третьих суток) и в последующем нарастании его вплоть до окончания исследования. Все это свидетельствует о биосовместимости данного материала и является предпосылкой к использованию его для лечения ожогов и впоследствии – к разработке тканеинженерных конструкций на его основе для использования в клинической практике.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Азанина Е.Н., Ведерникова О.Л. Новые технологии местного лечения ожоговых ран у детей // Вопросы травматологии и ортопедии. 2012. № 2 (3). С.28–41.
2. Бодун Р.Д., Островский Н.В., Шиповская А.Б., Чернова Р.К., Белянина И.Б., Моисеенко Д.С. На пути к созданию живого дермального эквивалента // Бюллетень Волгоградского научного центра РАМН. 2008. № 1. С.37–38.
3. Адельшин А.И. Нативные матриксы для создания живого эквивалента кожи // Морфологические ведомости. 2003. № 3. С. 4–8.
4. Севастьянов В.И. Биоматериалы, системы доставки лекарственных веществ и биоинженерия // Вестник травматологии и искусственных органов. 2009. Т IX. № 3. С. 14–24.
5. Рахматуллин Р.Р. Биопластический материал на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты и пептидного комплекса для восстановительной и реконструктивной хирургии: дисс. ... докт. биол. наук. М., 2014.

RESEARCH OF BIOLOGICAL COMPATIBILITY OF BIOPLASTIC MATERIAL «HYAMATRIX» IN DERMAL FIBROBLAST CULTURE

© 2015 I.R. Gilmutdinova¹, V.V. Rossinskaya², V.V. Boltovskaya², L.N. Kulagina²

¹Federal Medical Biophysical Center named after A.I. Burnazyan

²Samara State Medical University

In this article we described the results of the research of biological compatibility of bioplastic material Hyamatrix in vitro in human dermal fibroblast culture.

Key words: experiments in vitro, cell culture.

Ilmira Gilmutdinova, Transfusiologist.

E-mail: gilm.ilmira@mail.ru

Victoria Rossinskaya, Candidate of Medicine, Leading Staff Scientist of IEMB SSMU. E-mail: rossinskaya_v_v@mail.ru

Victoria Boltovskaya, Candidate of Medicine, Senior Staff Scientist of IEMB SSMU.

E-mail: violetta.boltovskaya@yandex.ru

Larisa Kulagina, Engineer of IEMB SSMU.

E-mail: lnkulagina07@mail.ru