

УДК: 617.55-077.43:616-089.168.1

**АЛЬТЕРНАТИВНАЯ МОДЕЛЬ ОЦЕНКИ БИОСОВМЕСТИМОСТИ
СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИПРОПИЛЕНОВЫХ ЭНДОПРОТЕЗОВ ДЛЯ ГЕРНИОПЛАСТИКИ**

© 2015 Ю.В. Пономарева

Самарский государственный медицинский университет

Статья поступила в редакцию 28.10.2015

В статье рассматривается альтернативная с применением культур клеток модель оценки биосовместимости разрешенных к применению в клинике синтетических протезирующих герниопластических материалов с оценкой их влияния на морфо-функциональные параметры клеток.

Ключевые слова: культура фибробластов, биосовместимость, цитотоксичность, эндопротезы, герниопластика.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время свыше 60-ти мировых производителей для целей герниологии выпускают около 150 видов протезирующих материалов. Их химическую основу в большинстве случаев составляют 4 полимера, такие как: полипропилен, полиэтилентерефталат, поливинилиденфторид и политетрафторэтилен [1]. С каждым годом число протезирующих материалов возрастает, но в основном за счет изменения существующих.

Поиск новых материалов и усовершенствование имеющихся обусловлен их биосовместимостью, именно на ее улучшение направлены технологии по модификации структуры и поверхности. Любая имплантация сопровождается реакцией со стороны тканей в виде абсорбции белков на волокна, активации клеток воспаления и/или регенерации. Эндопротезирование большинством полимеров инициирует в тканях хроническое асептическое воспаление с последующей фиброзной трансформацией тканей в месте имплантации [2]. С этих позиций тестирование новых или модифицированных синтетических имплантатов с применением культур клеток может служить хорошей альтернативной моделью для скрининга их биосовместимости.

Цель исследования: провести оценку биосовместимости синтетических материалов на основе полипропилена *in vitro*.

Материалы и методы. Для тестирования на биосовместимость были использованы образцы сетчатых синтетических имплантатов на основе полипропилена как стандартные монофиламентные – Optomesh (ОАО «Трикомед», Польша), Эсфил (ОАО «Линтекс», Россия), так и комбинированные Proceed («Этикон», Бельгия), Ultrapro («Этикон», Бельгия).

Из образцов дермы человека были получены культуры фибробластов методом первичных эксплантатов. Клетки культивировали в стандартных условиях в пластиковых культуральных флаконах в термостате Sanyo-Incubator MIR-262 при температуре 37°С в среде Игла MEM +199 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Для исследования использовали 4 пассаж дермальных фибробластов.

Тестирование проведено в чашках Петри диаметром 3 см. В них были помещены образцы эндопротезов 5x5 см и культуры фибробластов в посевной дозе 20 тысяч клеток/см². В качестве контроля служили чашки Петри с полной ростовой средой и образцами исследуемого материала, в которые не высевали фибробласты, а также чашки Петри с культурой фибробластов, которые пассировали одновременно с экспериментальными. Все работы проведены в ламинарном боксе. Длительность эксперимента 7 суток.

На 2-е, 4-е и 7-е сутки в нативных препаратах при помощи инвертированного микроскопа были оценены адгезия клеток к волокнам эндопротеза, их морфология: целостность монослоя, форма и размер клеток, состояние цитолеммы, состояние цитоплазмы, структура ядра и ядрышек. Оценен цитотоксический эффект по плотности монослоя клеток на единицу площади (кл/мм²); количество поврежденных клеток (%); количество слущенных клеток в культуральной жидкости (кл/мл); соотношение живых и мертвых клеток (%) путем окрашивания трипановым синим с последующей визуализацией; время удвоения культуры (ч). На 7-е сутки клетки фиксировали 96% спиртом и окрашивали гематоксилином и эозином.

На 7-е сутки проведены биохимические исследования: в культуральной среде определена активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) [3]; фибронектин как в клетках, так и в культуральной среде методом ИФА с использованием стандартных наборов.

Статистическая обработка полученных данных по пролиферативной активности клеток проведена с использованием пакета прикладных

*Пonomareva Юлия Вячеславовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник Института экспериментальной медицины и биотехнологий.
E-mail: jvponomareva@mail.ru*

программ Statistica 8.0 и Microsoft Office Excel 2008. Определено среднее арифметическое, среднеквадратическое отклонение. Сравнение групп проведено с использованием t-критерия Стьюдента.

Для проверки гипотезы о равенстве законов распределений в ходе биохимических исследований использовали критерий Манна-Уитни. Для описания признаков указывали медиану и межквартильный размах – 25-й и 75-й процентиля. Для проверки равенства медиан нескольких выборок применяли критерий Краскела-Уоллиса. Во всех случаях различия считали достоверными при вероятности ошибки менее 5% ($p < 0,05$).

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Реакция дермальных фибробластов в культуре на образцы стандартных монофиламентных полипропиленовых эндопротезов была практически идентичной.

Синтетический материал «Optomesh» не способствовал адгезии клеток к его волокнам, не изменял нормальной морфологии клеток, несколько замедлял рост клеток в культуре по данным морфометрии, не оказывал повреждающего действия на них (рис. 1).

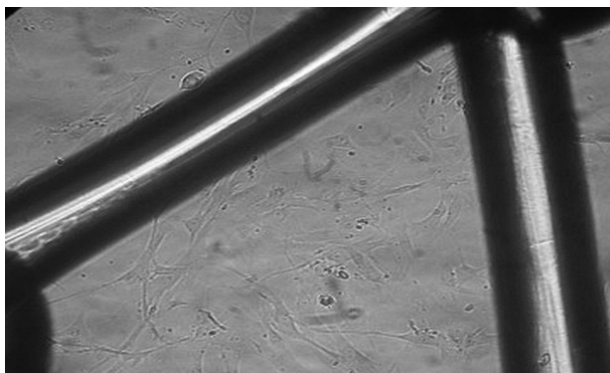


Рис. 1. Нативная культура дермальных фибробластов человека. Исследуемый материал «Optomesh». 4 сутки культивирования.

Инвертированный микроскоп. Увеличение 100

Плотность монослоя в присутствии тестируемого образца ко 2-м суткам составила $604,79 \pm 42,9$ ($1400,01 \pm 58,6$), к 4-м – $1431,79 \pm 39,3$ ($1864,45 \pm 42,4$); время удвоения культуры – $28 \pm 2,0$ ($23,5 \pm 1,5$); количество слущенных клеток – $137 \pm 31,6$ ($613 \pm 38,1$); соотношение живых и мертвых 80:20 (81:19); количество поврежденных – $3,63 \pm 0,8$ ($2,95 \pm 0,6$).

Общая активность ЛДГ культуры с материалом – $706,8$ (597,0), $p < 0,05$. Процент активности ЛДГ в культуральной среде с образцом от общей активности – $12,5$ (12,8), $p > 0,05$. Синтетическая активность культуры по фибронектину в присутствии материала – $0,68$ (0,4), $p < 0,05$.

При тестировании образцов эндопротеза «Эсфил» на 2-е сутки плотность монослоя достигла – $574,73 \pm 21,3$ ($1284 \pm 46,6$) при сохранении нормальной морфологии клеток, при этом адгезии клеток к его волокнам практически не было (рис. 2).

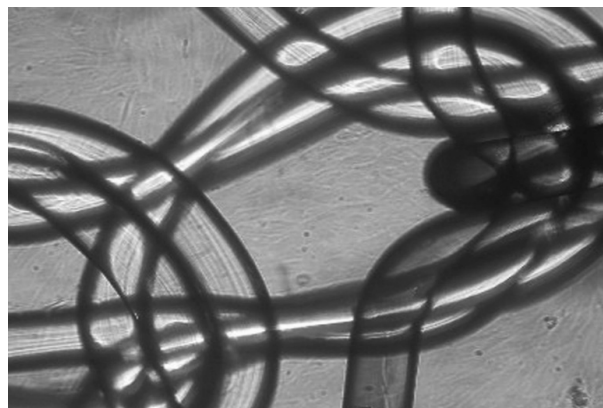


Рис. 2. Нативная культура дермальных фибробластов человека. Исследуемый материал «Эсфил».

4 сутки культивирования.

Инвертированный микроскоп. Увеличение 100

К 4-м суткам плотность монослоя нарастала, достигая $1025,93 \pm 44,2$ ($1740,28 \pm 39,9$); время удвоения культуры в экспериментальных образцах – $25,5 \pm 1,5$ ($23 \pm 2,0$); количество слущенных клеток к концу эксперимента в присутствии материала – $777 \pm 44,1$ ($546 \pm 40,9$); соотношение живых и мертвых 82:18 (84:16); количество поврежденных – $5,71 \pm 0,9$ ($3,19 \pm 0,9$).

Общая активность ЛДГ культуры с образцом составила $1113,8$ (597,0) $p < 0,05$. Процент активности ЛДГ в культуральной среде с материалом от общей активности – $16,7$ (14,6), $p > 0,05$. Синтетическая активность культуры по фибронектину в присутствии образца – $0,55$ (0,38), $p < 0,05$.

Известно, что стандартные полипропиленовые синтетические сетчатые имплантаты «Optomesh» и «Эсфил» обладают гидрофобными свойствами, что в эксперименте препятствовало адгезии фибробластов в культуре. Даже при длительных сроках совместного культивирования адгезии фибробластов к волокнам тестируемых эндопротезов практически невозможна [4]. С этих позиций эндопротезы с гидрофобной поверхностью можно рассматривать как эффективные относительно профилактики бактериальных инфекций в зоне имплантации, но не способствующие процессам эффективной регенерации в тканях.

К концу эксперимента на поверхности обоих эндопротезов удалось выявить лишь незначительное число клеток. Наличие их возможно объяснить произошедшей за эти сроки абсорбцией белков культуральной среды на волокна материалов с последующей адгезией клеток.

Присутствие стандартных полипропиленовых имплантатов в тест-системе изначально достоверно снижало плотность монослоя. Нарастание плотности монослоя в тест-системах с образцами «Optomesh» происходило медленнее ($p < 0,05$), а с образцами «Эсфил» быстрее, при этом число слущенных и поврежденных клеток к окончанию эксперимента в них было выше ($p < 0,05$). Однако по параметру соотношения живые и мертвые полученные значения не имеют достоверных отличий.

По данным ЛДГ-теста, ни один из двух материалов не обладал прямым цитотоксическим действием на культуры клеток. В присутствии обоих материалов достоверно выявлено повышение синтетической активности клеток по фибронектину.

Образцы эндопротеза «Ultrapro» обладали выраженными антиадгезивными свойствами. Ко 2-м суткам тестирования материалов плотность монослоя составила $411,0 \pm 36,4$ ($1256 \pm 40,4$). К 4-м суткам плотность монослоя достигла $609 \pm 50,1$ ($1701 \pm 48,8$); время удвоения культуры в экспериментальных образцах – $27 \pm 1,5$ ($23,5 \pm 1,2$); количество слущенных клеток к концу эксперимента – $810,7 \pm 30,9$ ($420,3 \pm 26,8$); соотношение живых и мертвых $79:21$ ($84:16$); количество поврежденных клеток – $11,46 \pm 2,8$ ($4,1 \pm 2,1$) (рис. 3).

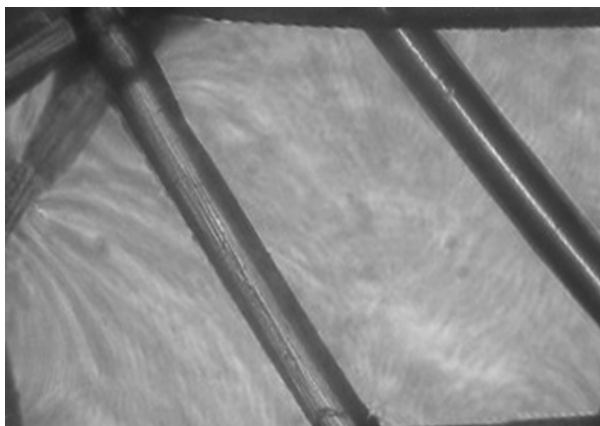


Рис. 3. Нативная культура дермальных фибробластов человека. Исследуемый материал «Ultrapro». 4 сутки культивирования.

Инвертированный микроскоп. Увеличение 100

Общая активность ЛДГ культуры с материалом составила $1708,4$ ($692,3$). Процент активности ЛДГ в культуральной среде с материалом от общей активности – $28,5$ ($29,6$), $p > 0,05$. Синтетическая активность культуры по фибронектину в присутствии материала – $0,52$ ($0,59$), $p < 0,05$.

Несмотря на то, что эндопротез «Ultrapro» является композитным со сниженной долей полипропилена и с введенным в его структуру полиглекапрона, тестирование его на культурах клеток показало увеличение числа поврежденных

и слущенных клеток ($p < 0,05$) и меньшую скорость пролиферации и синтетической активности. Результаты сопоставимы с имеющимися данными об идентичной реакции культуры клеток как на легкие, так и на стандартные имплантаты, и снижение материалоемкости изделия не улучшает его биосовместимости [5].

Образцы эндопротеза «Proceed» не способствовали адгезии фибробластов на волокна и изменению морфологии клеток, но оказывали стимулирующее действие на рост культуры (рис. 4).

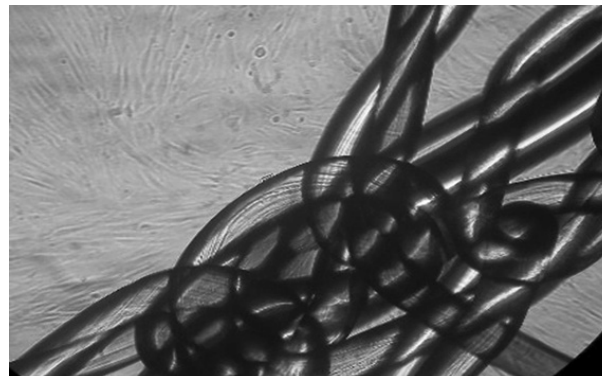


Рис. 4. Нативная культура дермальных фибробластов человека.

Исследуемый материал «Proceed».

4 сутки культивирования.

Инвертированный микроскоп. Увеличение 100

Так, плотность монослоя на 2-е сутки составила $811,2 \pm 65,6$ ($1348,2 \pm 64,9$). К 4-м суткам достигла $2036,91 \pm 55,3$ ($1821,45 \pm 41,6$); время удвоения культуры в экспериментальных образцах достигало – $20 \pm 1,5$ ($23 \pm 1,5$); количество слущенных клеток к концу эксперимента – $679 \pm 41,7$ ($581 \pm 39,9$); соотношение живых и мертвых $81:19$ ($83:17$); количество поврежденных клеток – $4,3 \pm 1,1$ ($3,3 \pm 1,0$).

Общая активность ЛДГ культуры с материалом составила $812,8$ ($691,4$). Процент активности ЛДГ в культуральной среде с образцами эндопротеза от общей активности – $33,2$ ($29,9$), $p > 0,05$. Синтетическая активность культуры по фибронектину в присутствии материала – $0,95$ ($0,62$), $p < 0,05$.

По данным морфометрии выявлено стимулирующее действие образцов материала «Proceed» на пролиферативную активность культуры ($p < 0,05$), что подтверждено нарастанием плотности монослоя, укорочением времени удвоения. Полученные результаты можно интерпретировать с позиции комбинированного «строения» имплантата с наличием в его структуре окисленной регенерированной целлюлозы, введенной в его состав в качестве антиадгезионного слоя. Введение в состав материала большинства известных биодеградирующих компонентов способствует увеличению синтетического потенциала культуры [6]. Однако по некоторым данным в дальнейшем это способствует развитию дегенеративных изменений клеток [7].

Таким образом, оценка применяемых в клинике, модифицированных и новых протезирующих материалов для герниопластики с применением культур клеток позволяет провести комплексную оценку: от цитотоксичности до необходимых в конкретной ситуации морфофункциональных характеристик клеток. Проведенный анализ показал отсутствие цитотоксичности у исследуемых образцов, при этом реакция культуры дермальных фибробластов варьировала в зависимости от химической структуры и свойств поверхности тестируемого материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bhaskaran A., Ambikavathy M.* Incisional Hernia: A Review of Etiopathogenesis, Clinical Presentation, Complications and Management // *J Clin Biomed Sci.* – 2013. Vol. 3 (1). P. 3-11.
2. *Peniston S.J., L Burg K.J., Shalaby S.W.* Effect of mesh construction on the physicomaterial properties of bicomponent knit mesh using yarns derived from degradable copolyesters. // *J Biomed Mater Res B Appl. Biomater.* 2012. Vol. 100. P.1922 – 1934.
3. *López E., Figueroa S., Oset-Gasque M.J., González M.P.* Apoptosis and necrosis: two distinct events induced by cadmium in cortical neurons in culture. // *Br J Pharmacol.* 2003. Vol. 138(5). P. 901–911.
4. *Canuto R.A., Saracino S., Oraldi M.* Colonization by human fibroblasts of polypropylene prosthesis in a composite form for hernia repair // *Hernia.* – 2013. Vol. 17(2). P. 241-249.
5. *Weyhe D., Hoffmann P., Belyaev O.* The role of TGF-beta1 as a determinant of foreign body reaction to alloplastic materials in rat fibroblast cultures: comparison of different commercially available polypropylene meshes for hernia repair // *Regul Pept.* – 2007. Vol. 138 (1). P. 4-10.
6. *Weyhe D., Belyaev O., Buettner G.* In vitro comparison of three different mesh constructions // *ANZ J Surg.* 2008. Vol. 78(1-2). P.55-60.
7. *Langer C., Schwartz P, Krause P.* // In-vitro study of the cellular response of human fibroblasts cultured on alloplastic hernia meshes. Influence of mesh material and structure. *Chirurg.* – 2005. Vol. 76 (9). P.876-885.

ALTERNATIVE MODEL FOR EVALUATION OF BIOCOMPATIBILITY OF SYNTHETIC POLYPROPYLENE MESHES FOR HERNIA REPAIR

© 2015 J.V. Ponomareva

Samara State Medical University

The article deals with the use of alternative cell culture model for evaluation of biocompatibility approved for use in the clinic hernioplasties synthetic prosthetic materials in order to assess their influence on morphofunctional parameters of the cells.

Keywords: culture of fibroblasts, biocompatibility, cytotoxicity, stents, hernia repair.