

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ КАК БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТРИЦ ДЛЯ КЛЕТОК IN VITRO

Булкина Н.В.¹, Зюлькина Л.А.², Иванов П.В.², Ведяева А.П.¹, Шастин Е.Н.³,
Кавтаева Г.Г.²

¹ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России, Саратов, e-mail: stomat@sgmu.ru;

²ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет», Пенза, e-mail: sto-kafedra@yandex.ru;

³ООО «БАЛЬДАР», стоматологическая клиника «Дентик Люкс», Краснодар, e-mail: shastin@dentiklux.ru

В статье отражены результаты исследования отечественных материалов «Bio-Ost CUBE Collagen», «Bio-Ost MUCO Plast», «Bio-Ost Corticalmembrane» компании ООО «Кардиоплант» (г. Пенза, Россия) для реконструктивных стоматологических вмешательств. В исследовании доказано отсутствие цитотоксического действия предложенных материалов на мезенхимальные стромальные клетки костного мозга человека. Продемонстрировано, что используемые образцы не препятствуют адгезии и пролиферации мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека, что, в свою очередь, подтверждает доступность изучаемых отечественных материалов в качестве матрикса для репопуляции клетками мезенхимального происхождения. Проведенное исследование доказывает, что представленные материалы «Bio-Ost» компании ООО «Кардиоплант» (г. Пенза, Россия) соответствуют существующим критериям биологической безопасности, что позволяет рекомендовать их для использования при реконструктивных стоматологических вмешательствах.

Ключевые слова: остеопластические материалы, биоматериалы, реконструктивное стоматологическое вмешательство.

A RESEARCH OF THE EXPERIMENTAL BIOMATERIALS AS THE BIOLOGICAL CONCAVITIES OF AN INTERFERENCE FIXATION FOR CELLS IN VITRO

Bulkina N.V.¹, Ziulkina L.A.², Ivanov P.V.², Vedyayeva A.P.¹, Shastin E.N.³,
Kavtaeva G.G.²

¹ Saratov State Medical University. a. V.I. Razumovsky, Saratov, e-mail: stomat@sgmu.ru;

² Penza State University, Penza, e-mail: sto-kafedra@yandex.ru;

³ BALDAR, Dental clinic «DentikLyuks», Krasnodar, e-mail: shastin@dentiklux.ru

The article reflects the research results of national biomaterials «Bio-Ost CUBE Collagen», «Bio-Ost MUCO Plast», «Bio-Ost Cortical membrane» manufactured by company "Kardioplant" (Penza, Russia) for reconstructive dental surgery. The absence of cytotoxic effect of the proposed biomaterials for mesenchymal stromal cells of human bone marrow is proved in the research. It is demonstrated that the biomaterials which are used do not prevent the adhesion and proliferation of mesenchymal stromal cells of human bone marrow that, in turn, confirms the availability of the research national biomaterials as a concavity of an interference fixation for repopulation by cells of mesenchymal nature. This research demonstrates that these biomaterials "Bio-Ost" manufactured by company "Kardioplant" (Penza, Russia) meet the existing criteria of biological safety, which allows to recommend them for use in reconstructive dental surgery.

Keywords: osteoplastic materials, biomaterials, reconstructive dental surgery.

На современном этапе развития стоматологии сохраняет актуальность вопрос поиска бюджетных материалов для биоинженерии при проведении реконструктивных стоматологических операций, так как возросшие эстетические требования пациентов актуализируют концепцию прогнозируемой остеорегенерации в сочетании с гармоничной интеграцией мягких тканей [1-3].

В современной стоматологической практике широкое распространение получил метод направленной регенерации костной ткани [4-6]. Для проведения данного метода используют

различные остеопластические материалы и мембраны [7-9]. Мембраны обеспечивают барьерную функцию, способствуют стабилизации кровяного сгустка и костных материалов в пространстве дефекта, замедляет поверхностную резорбцию трансплантата, препятствуя проникновению предшественников остеокластов гематогенного происхождения, до достижения реваскуляризации сначала со стороны стенок дефекта, кроме того, мягкая мембрана способна защищать лоскут от повреждения острыми краями костных блоков и частиц костного материала [7]. Однако считают, что показатели функциональной долговечности и биосовместимости мембран довольно противоречивы. Жесткие мембраны чаще провоцируют расхождение краев раны и инфицируются. В свою очередь, коллагеновые мембраны отличаются высокой биосовместимостью, но быстро резорбируются в результате непрерывной деятельности протеолитических ферментов [7].

Известно, что большинство костных материалов механически препятствуют образованию новых кровеносных сосудов и регенерации костной ткани. Для предупреждения подобной проблемы такие материалы необходимо вносить в дефект неплотно. При использовании аутогенной костной стружки данное условие соблюдается благодаря тому, что между отдельными костными фрагментами всегда остаются небольшие пространства. Следовательно, предпочтительно использовать пористые костные материалы. Остеопластические материалы часто используются в качестве нейтрального наполнителя дефекта для поддержания мембраны и создания необходимого контура в зоне операции. При этом важно учитывать, что каждый неаутогенный материал является для организма инородным телом, способным вызвать иммунный ответ. В ряде случаев применение подобных остеопластических материалов вызывает асептическую воспалительную реакцию. В качестве материала выбора для реконструктивных вмешательств используются аллогенные костные материалы, содержащие в своем составе костные морфогенетические протеины, остаточная биологическая активность которых зависит от ряда условий (способа стерилизации продукта, например с помощью лиофилизации, химической обработки и дозировки гамма-излучения). Данные материалы могут быть контаминированы спорообразующими бактериями, устойчивыми к обработке [6].

Таким образом, анализ существующих на рынке материалов для направленной тканевой регенерации и мукогингивальной хирургии демонстрирует большой выбор материалов, прошедших тщательную клиническую апробацию [10-12], однако их использование нередко ограничено бюджетом пациента и зависимостью от иностранных производителей. В связи с вышеизложенным, нами предложены отечественные материалы линейки «Bio-Ost» (ООО «Кардиоплант», г. Пенза, Россия), позволяющие добиться стойких клинических результатов лечения.

Основой выбора любого материала для оперативного вмешательства является его биологическая безопасность, в связи с чем нами проведено изучение цитотоксичности применяемых биоматериалов «Bio-Ost» (ООО «Кардиоплант», г. Пенза, Россия) *in vitro*. Подтвержденная биологическая безопасность представленных материалов позволяет рекомендовать их в качестве достойной альтернативы зарубежным аналогам.

Целью исследования явилось изучение цитотоксичности биоматериалов *in vitro* и изучение пролиферативной активности клеток и динамики численности клеточных популяций, культивируемых на биоматериалах «Bio-Ost» (ООО «Кардиоплант», г. Пенза, Россия) *in vitro*.

Материалы и методы

Коллагеновая губка «Bio-Ost MUCO Plast» (производство ООО «Кардиоплант», г. Пенза, регистрационное удостоверение на медицинское изделие № РЗН 2015/3086 от 16.09.2015 г.) представляет собой объемный коллагеновый матрикс на основе губчатого вещества для регенерации мягких тканей. Коллагеновый матрикс «Bio-Ost MUCO Plast» состоит из губчатого слоя, который быстро замещается плотной соединительной тканью, что позволяет создать дополнительный объем слизистой. Изготавливается из спонгиозного слоя костной ткани ксеногенного происхождения. После вымачивания в гидратирующих растворах обладает пластичностью – легко изменяет форму и моделируется. Наличие в материале 15 % минерального компонента предупреждает быструю резорбцию материала после проведенной операции и обеспечивает достаточную прочность имплантата для формирования требуемого размера и формы.

Губчатые костные блоки «Bio-Ost CUBE Collagen» (производство ООО «Кардиоплант», г. Пенза, регистрационное удостоверение на медицинское изделие № РЗН 2015/3086 от 16.09. 2015 г.) – биоматериал для замещения костных дефектов, заполнения лунок удаленных зубов, пластики пародонтальных дефектов. Высокоочищенный губчатый слой костной ткани фрагментируется в виде блоков различного размера и частично деминерализуется. В процессе обработки остаются сохранными коллагеновые и минеральные компоненты, а также природная бимодальная пористая структура. Уникальная технология обработки сырья позволяет сделать доступной всю внутреннюю поверхность имплантата. Материал сочетает в себе остеоиндуктивные и остеокондуктивные свойства, служит каркасом для остеогенеза, при смачивании легко моделируется, что позволяет придать необходимую форму для максимального контакта с костью пациента в зоне регенерации.

Кортикальная мембрана «Bio-Ost Corticalmembrane» (производство ООО «Кардиоплант», г. Пенза, регистрационное удостоверение на медицинское изделие №

РЗН 2015/3086 от 16.09.2015 г.) – плотная мембрана, обладающая повышенной прочностью и достаточно длительными сроками резорбции. Используется для направленной регенерации костной ткани, пластики значительных дефектов передней стенки пазухи при синуслифтинге и для вертикальной аугментации кости в сложных клинических ситуациях, изготовлена из кортикальной костной ткани.

В работе использовали мезенхимальные стромальные клетки костного мозга человека. Клетки культивировали в среде alpha MEM (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 40 мкг/мл сульфата гентамицина (Sigma-Aldrich, США), при 37 °С, в условия 5 % содержания CO₂ в воздухе.

Выделение мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека проводили следующим образом: аспират костного мозга разводили 1:1 раствором Хенкса (Sigma-Aldrich, США), и проводили центрифугирование на градиенте Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, США), при 800 G, в течение 30 минут. Далее стерильной серологической пипеткой собирали клетки на границе раздела Histopaque-1077 – жидкость, растворяли в среде alpha MEM (1:4) и центрифугировали при 400 G, в течение 5 минут. Осадок, содержащий мононуклеарные клетки, ресуспендировали в среде alpha MEM с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и переносили в культуральную посуду. Далее клетки инкубировали в течении 48 часов при 37 °С, в условия 5 % содержания CO₂ в воздухе. После этого не прикрепившиеся к культуральной посуде клетки удаляли и продолжали культивирование прикрепившихся клеток. Смену питательной среды осуществляли каждые 2–3 дня. Клетки культивировали до достижения 70–80 % конfluence. В экспериментах использовали клетки 1–4 пассажей. Субкультивирование клеток проводили в среде alpha MEM с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 40 мкг/мл сульфата гентамицина, при 37 °С, в условия 5 % содержания CO₂ в воздухе.

Динамику численности клеток (кривые роста популяций) культивируемых на образцах оценивали по прямому подсчету числа клеток открепленных с поверхности образцов. Клетки открепляли от поверхности образцов с помощью коктейля Accutase (Sigma-Aldrich, США), ресуспендировали в питательной среде L-15 (Sigma-Aldrich, США) с 1 % эмбриональной телячьей сыворотки. Далее клетки окрашивали 0,4% раствором трипанового синего в течение 1 минуты. Подсчет количества клеток осуществляли с помощью автоматического счетчика клеток Countess (Invitrogen, США).

Число митотических клеток определяли с помощью флуоресцентной микроскопии, используя прижизненное окрашивание флуоресцентным ядерным красителем Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, США). Митотические клетки выявляли по распределению хроматина, характерному для профазы, метафазы, анафазы и телофазы с помощью флуоресцентного

микроскопа DM 6000 (Leica, Германия). Для анализа подсчитывали не менее 500 клеток. Митотический индекс (MI) вычисляли по формуле $MI = (P+M+A+T)/N * 100 \%$, где (P+M+A+T) – сумма клеток, находящихся на стадии профазы, метафазы, анафазы и телофазы, а N – общее число проанализированных клеток.

Определение количества живых и погибших клеток проводили с помощью окрашивания клеток флуоресцентными красителями кальцеином AM (Sigma-Aldrich, США) и йодидом пропидия (Sigma-Aldrich, США). Клетки открепляли от поверхности образцов с помощью коктейля Accutase. Клетки окрашивали в среде L-15 с 1 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, содержащей 1 мкг/мл кальцеина AM и 2 мкг/мл йодида пропидия, в течение 25 минут при 37 °С. Анализ живых и погибших клеток осуществляли с использованием проточного цитометра EPICS XL (Beckman Coulter, USA).

Результаты исследования

В ходе исследования установлено, что губчатые костные блоки «Bio-Ost CUBE Collagen» не обладали цитотоксическим действием (через 24 и 72 часа инкубации количество погибших клеток составляло $7 \pm 2 \%$ и $3 \pm 1 \%$ от общего количества клеток, соответственно). Коллагеновая губка «Bio-Ost MUCO Plast» также не обладала цитотоксическим эффектом (через 24 и 72 часа инкубации количество погибших клеток составляло $4 \pm 3 \%$ и $6 \pm 2 \%$ от общего количества клеток, соответственно). Количество погибших клеток при исследовании материала «Bio-Ost Corticalmembrane» через 24 и 72 часа инкубации составляло $7 \pm 2 \%$ и $4 \pm 2 \%$ от общего количества клеток, соответственно.

Изучение пролиферативной активности клеток и динамики численности клеточных популяций, культивируемых на кортикальной мембране «Corticalmembrane» *in vitro*, проводили через 48 часа и 72 часа после начала культивирования клеток на экспериментальных материалах. Митотический индекс для мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека, культивированных на кортикальной мембране «Corticalmembrane», составлял $4,4 \pm 0,7 \%$ через 48 часов инкубации и $2,6 \pm 0,5 \%$ через 72 часа инкубации, что свидетельствует об отсутствии цитостатического действия изучаемого биоматериала на мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека.

Изучение динамики численности клеточных популяций, культивируемых на поверхности кортикальной мембраны «Corticalmembrane» *in vitro*, проводили путем регистрации количества клеток выросших на поверхности экспериментальных образцов биоматериалов каждые 24 часа в течение 5 суток культивирования. Результаты исследования свидетельствуют, что численность популяции мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека, культивированных на кортикальной мембране «Bio-Ost Corticalmembrane» (ООО «Кардиоплант») в течение 5 суток увеличивается до $5 * 10^4 \pm 0,25$

клеток/см² относительно количества клеток, высаженных в начале культивирования. Полученные данные показывают, что поверхность кортикальной мембраны «Bio-Ost Corticalmembrane» не препятствует адгезии и пролиферации мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека, что, в свою очередь, может говорить о доступности данного материала в качестве матрикса для репопуляции клетками мезенхимального происхождения.

Таким образом, проведенное исследование доказывает, что представленные материалы «Bio-Ost» (ООО «Кардиоплант», г. Пенза, Россия) соответствуют критериям биологической безопасности, что позволяет рекомендовать их для использования при реконструктивных стоматологических вмешательствах.

Список литературы

1. Акияши Ф. 4D имплантологическое лечение: эстетические аспекты работы с мягкими тканями / пер. с англ./ Ф. Акияши, И. Томохиро. – Львов: ГалДент, 2015. – 212 с.
2. Булкина Н.В., Ведяева А.П., Иванов П.В., Гаврюшова Л.В. Биологические реакции организма на биоимплантаты. Обзор /Н.В. Булкина [и др.] // Клиническая стоматология. – 2016. – Т.2, № 78. – С. 46–49.
3. Булкина Н.В. Реконструктивные методики в комплексном лечении пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом. Метод. рек. – 2016. – 85 с.
4. Ведяева А.П. Комбинированные биоимплантаты для регенерации костной ткани в реконструктивной хирургии полости рта / А.П. Ведяева, Н.В. Булкина, П.В. Иванов. – Саратов: Изд-во СГМУ, 2016. – 157 с.
5. Грудянов А.И. Значение искусственных мембран в решении проблемы направленной регенерации тканей пародонта (Обзор литературы) / А.И. Грудянов, О.А. Фролова, С.Б. Десятник // Новое в стоматологии. – 1996. – № 4. – С. 3–9.
6. Иванов П.В., Булкина Н.В., Ведяева А.П., Никишин Д.В. Эффективность применения биорезорбируемой коллагеновой мембраны в комбинации с хитозаном для восстановления костной ткани (экспериментальное исследование) / П.В. Иванов [и др.] // Известия высших учебных заведений: Поволжский регион. Сер.: мед. науки. – 2015. – № 3 (35). – С. 50–61.
7. Кордаро Л. Реконструкция альвеолярного гребня при имплантологическом лечении / Л. Кордаро, Х. Терхейден // Квинтэссенция. – Т. 7. – 2015. – 217 с.
8. Михайловский А.А. Сохранение объема костной ткани альвеолярного гребня в модели симметричной аугментации лунки удаленного зуба: клинико-морфологическое исследование / А.А. Михайловский, А.А. Кулаков, А.В. Волков // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2014. – № 1. – С. 25–29.

9. Тарасенко С.В., Шехтер А.Б., Ашурко И.П., Бокарева С.И., Макаревич А.А. Гистологические результаты использования коллагенового матрикса для увеличения ширины кератинизированной прикрепленной десны в области дентальных имплантатов /С.В. Тарасенко [и др.] // Российская стоматология. – 2015. – № 2. – С. 4-9.
10. Яременко А.И. Современные остеопластические и остеоиндуктивные материалы. Состояние проблемы. Перспективы применения в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии /А.И. Яременко, Д.В. Галецкий, В.О. Королев // Институт стоматологии. – 2011. – Т. 2, № 51. – С. 70–71.
11. Jensen S.S., Terheyden H. Bone augmentation procedures in localized defects in the alveolar ridge: Clinical results with different bone grafts and bone-substitute materials / Int. J. Oral Maxillofac. Implants. – 2009. – Vol. 24 (suppl.). – P. 218–236.
12. Maiorana C., Beretta M., Salina S. et al. Reduction of autogenous bone graft resorption by means of bio-oss coverage: a prospective study // Int. J. Parodontol. Restaur. Zahnheilk. – 2005. – Vol. 25 (1). – P. 19–25.