

Сравнительный анализ биодинамических характеристик резорбируемых коллагеновых мембран на клеточных культурах

А.А. ДОЛГАЛЕВ*, д.м.н.

В.А. ЗЕЛЕНСКИЙ*, д.м.н., проф., зав. кафедрой

И.А. БАЗИКОВ**, д.м.н., проф., зав. кафедрой

Д.А. БРУСНИЦЫН***, врач стоматолог-хирург

Ю.А. ЮДИЧЕВА****, магистр

Р.А. ФАДЕЕВ*****, к.б.н.

*Кафедра стоматологии общей практики и детской стоматологии
ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава РФ

**Кафедра микробиологии

ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава РФ

***ООО «Дин», г. Казань

****Кафедра общей биологии и биохимии

ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»

*****ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН (ИТЭБ РАН), г. Пушкино

A comparative analysis of biodynamic characteristics of resorbable collagen membrans in cell cultures

A.A. DOLGALEV, V.A. ZELENSKY, I.A. BAZIKOV, D.A. BRUSNITSIN, Yu.A. YUDICHEVA, R.A. FADEEV

Резюме

Авторами данной работы приведены результаты сравнительного анализа исследования на клеточных культурах коллагеновой мембраны российского производства с резорбируемыми коллагеновыми мембранами зарубежного производства, активно используемыми для направленной тканевой регенерации на территории России. В исследовании сравнивались такие свойства мембран как цитотоксичность, пролиферативная активность, исследовалась динамика клеточных популяций культивируемых фибробластов на биотканевой поверхности.

Ключевые слова: костная аугментация, мембраны, грануляционная ткань, воспаление, остеогенез, направленная костная регенерация, фибробласты, пролиферативная активность.

Abstract

The authors of this paper present the results of a comparative study on the analysis of cell cultures using collagen membranes made in Russia with resorbable collagen membranes made abroad. The study compared the properties of membranes such as cytotoxicity and proliferative activity, and investigated the dynamics of cell populations cultured on a fibroblastic biotissue surface.

Key words: bone augmentation, membrane, granulation tissue, inflammation, osteogenesis, guided bone regeneration, fibroblasts, proliferative activity.

Актуальность исследования

Одним из направлений развития современной стоматологии является внедрение в клиническую практику все более эффективных методов восстановления зубочелюстной системы. Для восстановления дефектов альвеолярного отростка, пародонта применяются методы направленной тканевой регенерации, которые начали разрабатываться в 50–60 годах прошлого века. Тем не менее, и современный этап развития имплантологии, восстановительной пародонтологии характеризуется интенсивными поисками но-

вых материалов, позволяющих расширить показания к данным методам лечения.

Восстановление дефектов пародонта, мягких и твердых тканей челюстно-лицевой области решают как с помощью разработок новых методик реконструктивных операций, так и с использованием новых материалов, восполняющих утраченный объем тканей. По происхождению эти материалы делятся на три большие группы: аутотрансплантаты, то есть материалы, которые берутся и используются у одной и той же особи; ксено- и аллотрансплантаты, материалы

биологического происхождения, сырьем для которых являются животные и трупные ткани, соответственно; имплантаты — материалы искусственного происхождения.

Несмотря на различный состав, все эти материалы должны соответствовать определенным требованиям: не вызывать токсических, аллергических и воспалительных реакций; не влиять на генный аппарат, хорошо интегрироваться с тканями организма и не вызывать их резорбции; быть простыми в приготовлении и универсальными в употреблении; быть относительно дешевыми в производстве.

Метод направленной костной регенерации (НКР), разработанный Buser D. [8], наиболее часто применяется клиницистами в связи с малоинвазивностью и несложным техническим исполнением. Наиболее задокументированы методики НКР для лечения локализованных костных дефектов челюстей [5]. Основой метода направленной костной регенерации является комбинация барьерной (изолирующей) мембраны и графта в виде материала, замещающего костную ткань. Основными показателями надежности таких материалов как мембраны являются время их резорбции: продолжительность ее барьерной функции (предотвращение врастания мягких тканей в структуру регенерата кости), отсутствие токсического/антигенного влияния на окружающие ткани, а также отсутствие отрицательного влияния мембраны на структуру слизисто-надкостничного люфта, например, его истончение, адаптация мембраны в тканях и возможность ее надежной стабилизации в ране [5–7]. На эти показатели изначально влияют как качество материала, из которого изготовлена мембрана, так и физико-механические свойства применяемых мембран.

Для эффективного использования различных видов имплантационных материалов необходимо иметь четкое представление о механизмах ответа организма на их имплантацию и об их роли в репаративных процессах. Эффективным методом исследования такого типа проблем является эксперимент на живых объектах. При разработке новых материалов первым этапом исследования на живых объектах является исследование *in vitro* на культурах клеток.

Культуры клеток представляют собой гомогенную популяцию генетически однородных клеток, растущих в постоянных условиях. Исследователь может изменять эти условия в определенных пределах. Кроме того, клетки в культуре легко доступны для различных манипуляций. Может быть достигнут непосредственный контакт тестируемого фактора или объекта с культивируемыми клетками, причем в течение заданного периода времени. Проверенным методом оценки морфофункционального состояния коллагенсинтезирующих культур клеток в условиях имплантации различных биопластических материалов является тестирование материалов на первичных культурах фибробластов человека [1–4].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка таких биодинамических характеристик биорезорбируемых мембран как цитотоксичность и пролиферативная активность. Кроме того, на биотканевой поверхности исследовалась динамика клеточных популяций культивируемых фибробластов.

Объектами исследования явились следующие материалы для замещения дефектов костных тканей:

- мембрана Geistlich Bio-Gide, далее мембрана Bio-Gide (производитель Geistlich Pharma AG);

- стоматологическая коллагеновая мембрана BioPlate Membrane Barrier далее мембрана BioPlate Barrier (производитель «Кардиоплант») — барьерная двухслойная коллагеновая мембрана на основе ксеноперикарда;

- стоматологическая коллагеновая мембрана BioPlate Membrane Matrix, далее мембрана BioPlate Matrix (производитель «Кардиоплант») — однослойная коллагеновая мембрана на основе внеклеточного матрикса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали диплоидные фибробласты человека. Культуру диплоидных фибробластов человека получали из участков кожи внутренней поверхности предплечья методом эксплантов. Эксплантат кожи размером 5 x 5 мм промывали в течение нескольких минут в фосфатном буфере, содержащем 400 мкг/мл сульфата гентамицина. Ткань механически измельчали на фрагменты размером 1–2 мм², далее фрагменты прикрепляли к поверхности культуральной посуды, подсушивали на воздухе в течение 5–7 мин., затем покрывали средой alpha MEM (Sigma-Aldrich, США) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США) и инкубировали при 37°C, в условиях 5% содержания CO₂ в воздухе. Смену среды около фрагментов осуществляли каждые 3–4 дня. После выхода клеток из фрагментов клетки открепляли от поверхности культурального пластика и определяли количество клеток. В экспериментах использовали клетки 1–4 пассажей, которые культивировали в среде alpha MEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 40 мкг/мл сульфата гентамицина (Sigma-Aldrich, США), при 37°C, 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 мин. 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 телячьей сыворотки, содержащей 1 мкг/мл кальцеина AM и 2 мкг/мл йодидом пропидия, в течение 25 мин. при 37°C. Анализ живых и погибших клеток осуществляли с ис-

пользованием проточного цитометра EPICS XL (Beckman Coulter, США). Результаты опытов представляли в виде среднего \pm стандартная ошибка ($M \pm SEM$). Опыты проводили не менее чем в трех повторах ($n \geq 3$). Статистическую значимость отличия определяли с использованием критерия Манна-Уитни. В эксперименте использованы три группы образцов биорезорбируемых коллагеновых мембран. В качестве контроля служили образцы коллагеновой мембраны Bio-Gide (производитель Geistlich Pharma AG), так как свойства этой мембраны подробно описаны в литературе [8]. Из каждой группы материалов брали

образцы размером 15 x 20 мм по 8 шт. Сравнительное описание внешних параметров и характеристик экспериментальных образцов проводилось при визуализации изделия, упаковки, инструкции по применению. Результаты сравнительного описания исследуемых мембран приведены в табл. 1.

1.1. Изучение цитотоксичности биоматериалов в эксперименте

Изучение цитотоксичности проводили через 24 часа и 96 часов после начала культивирования клеток на экс-

Таблица 1. Сравнительное описание образцов коллагеновых мембран

Сравниваемый признак	Группа 1 (контроль) Bio-Gide	Группа 2 (опыт 1) BioPlate Barrier	Группа 3 (опыт 2) Bio-Plate Matrix
Показания к применению	Регенерация костной ткани, восстановление мягких тканей	Регенерация костной ткани, восстановление мягких тканей	Регенерация костной ткани, восстановление мягких тканей
Происхождение	Изготовлена из мягкой соединительной ткани домашних животных	Изготовлена из мягкой соединительной ткани домашних животных	Изготовлена из мягкой соединительной ткани домашних животных
Состав, источник сырья	Состоит из нативного, высокоочищенного коллагена свиньи	Состоит из нативного, высокоочищенного коллагена крупного рогатого скота	Состоит из нативного, высокоочищенного коллагена свиньи
Обработка сшивающим агентом	Не содержит химических сшивающих агентов	Не содержит химических сшивающих агентов	Не содержит химических сшивающих агентов
двухслойной структуры	+	+	-
Физические характеристики поверхности	Мембрана имеет 2 разнородные поверхности. Одна сторона гладкая и плотная, другая сторона пористая (ворсистая)	Мембрана имеет 2 разнородные поверхности. Одна сторона гладкая и плотная, другая сторона пористая (ворсистая)	Мембрана однородная (шероховатые пористые поверхности)
Степень гидрофильности (время пропитывания физраствором)	20 сек.	60 сек.	40 сек.
Сохранение формы во влажном состоянии (время пропитывания физраствором) (Max +++++)	++	++	+
Размеры, мм	25 x 25 мм; 30 x 40 мм	15 x 20 мм; 25 x 25 мм; 30 x 40 мм	15 x 20 мм; 25 x 25 мм; 30 x 40 мм
Вид упаковки	Двойной блистер	Двойной блистер	Двойной блистер
Метод стерилизации	Стерилизация γ -излучением	Стерилизация оксидом этилена	Стерилизация оксидом этилена

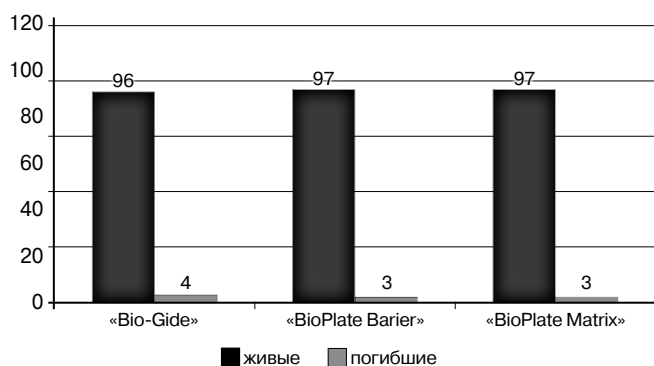


Рис. 1.1.1. Цитотоксическое действие экспериментальных биоматериалов через 24 часа культивирования на их поверхности диплоидных фибробластов человека

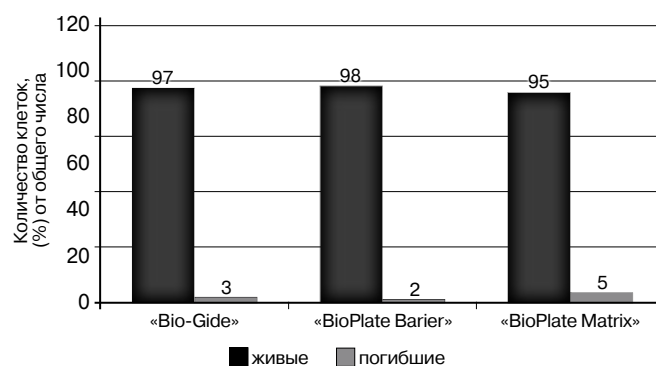


Рис. 1.1.2. Цитотоксическое действие экспериментальных биоматериалов через 96 часов культивирования на их поверхности диплоидных фибробластов человека

периментальных материалах. Представленные на рисунках 1.1.1. и 1.1.2. результаты показывают, что данные экспериментальные образцы биоматериалов не обладали цитотоксичностью как через 24 часа, так и через 96 часов культивирования на них диплоидных фибробластов человека. Количество погибших клеток при культивировании на данных образцах достоверно не отличалось от количества погибших клеток при культивировании на культуральной посуде (спонтанная клеточная гибель) и находилось в пределах $3 \pm 2\%$ от общего числа клеток.

Таким образом, данные, полученные при изучении цитотоксичности экспериментальных биоматериалов, показывают, что образцы представленных групп нетоксичны для культивированных на их поверхности диплоидных фибробластов человека.

1.2. Изучение митотической (пролиферативной) активности клеток культивируемых на биотканевой поверхности в эксперименте (in vitro)

Изучение митотической (пролиферативной) активности проводили через 48 и 72 часа после начала культивирования клеток на экспериментальных материалах.

В основу анализа положено сравнение митотической активности клеток, культивированных на образцах групп мембраны BioPlate Barier и BioPlate Matrix с митотической активностью клеток, культивированных на образцах группы коммерческого аналога Bio-Gide.

Полученные результаты (рис. 1.2.2.) подтверждают, что митотическая активность диплоидных фибробластов, культивированных на образцах группы мембраны BioPlate Barier, была сопоставима с митотической активностью тех же клеток, культивированных на образцах группы Bio-Gide.

Наибольшая митотическая активность клеток была отмечена при культивировании на образцах группы BioPlate Matrix. Митотический индекс клеток обоих типов, культивированных на образцах группы BioPlate Matrix, был достоверно выше ($p < 0,05$), чем митотический индекс тех же клеток, культивированных на образцах группы Bio-Gide.

Таким образом, представленные данные показывают, что при культивировании диплоидных фибробластов человека митотическая активность клеток, культивированных на образцах группы мембраны BioPlate Barier, сопоставима с митотической активностью тех же типов клеток, культивируемых на образцах группы Bio-Gide. Митотическая активность

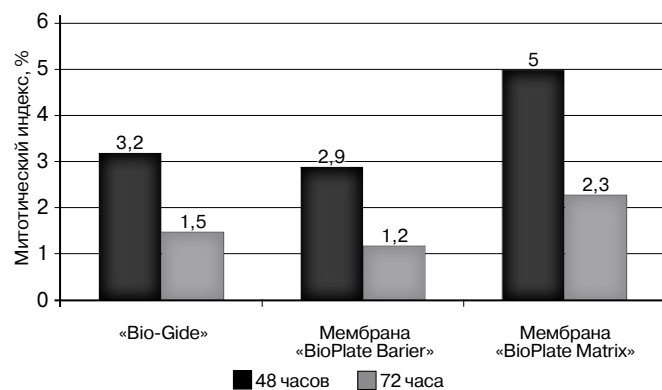


Рис. 1.2.1. Митотическая активность диплоидных фибробластов через 48 и 72 часов культивирования на биотканевой поверхности в эксперименте

клеток, культивированных на образцах группы BioPlate Matrix, существенно выше, чем митотическая активность тех же клеток, культивированных на образцах группы Bio-Gide.

1.3. Динамика клеточных популяций, культивируемых на биотканевой поверхности в эксперименте in vitro

Изучение численности клеточных популяций проводили путем регистрации количества клеток, выросших на биотканевой поверхности экспериментальных образцов каждые 24 часа в течение 7 суток культивирования.

Наибольший прирост количества клеток был показан при культивировании на образцах группы BioPlate Matrix и был достоверно выше ($p < 0,05$), чем прирост количества тех же клеток при культивировании на образцах групп BioPlate Barier и BioPlate Matrix (рис. 1.3.1).

Представленные данные показывают, что для клеток, культивированных на образцах группы мембраны Bio-Gide, прирост количества клеток был сопоставим с приростом количества тех же клеток, культивированных на образцах группы BioPlate Barier. Прирост количества клеток, культивированных на образцах группы BioPlate Matrix, был существенно выше, чем прирост тех же клеток, культивированных на образцах остальных групп.

Выводы:

1. Материал российского производителя, группы BioPlate Barier, не обладает цитотоксичностью, митотическая активность и прирост количества диплоидных фибробластов человека при культивировании на его поверхности сопоставимы с аналогичными показателями у клеток тех же типов, культивированных на поверхности образца сравнения Bio-Gide.

2. Материал российского производителя, группы BioPlate Matrix, не обладает цитотоксичностью, митотическая активность и прирост количества диплоидных фибробластов человека, при культивировании на его поверхности, существенно выше аналогичных показателей у клеток тех же типов, культивированных на биотканевой поверхности образца сравнения Bio-Gide.

3. Представленные результаты дают нам основание рекомендовать данные мембраны для дальнейших испытаний на биологических объектах, в частности на животных.

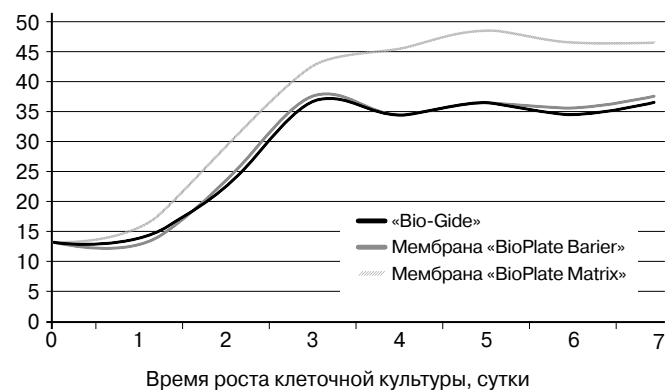


Рис. 1.3.1. Кривые роста диплоидных фибробластов человека, культивируемых на биотканевой поверхности в эксперименте

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков / пер. с англ. — М.: Мир, 1983. — 263 с.
Adams R. Metody kul'tury kletok dlja biohimikov / per. s angl. — M.: Mir, 1983. — 263 s.
2. Базиков И. А., Боташева В. С., Сумкина О. Б., Мухорамов Ф. С., Пенькова Н. И., Лукинова В. В., Чекрыгина Е. В., Доменюк Д. А. Результаты гистологического исследования пародонта при применении культивируемых аллогенных фибробластов в эксперименте // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2014. Т. 9. № 4. С. 336–340.
Bazikov I. A., Botasheva V. S., Sumkina O. B., Muhorarov F. S., Pen'kova N. I., Lukinova V. V., Chekrygina E. V., Domenjuk D. A. Rezul'taty gistologicheskogo issledovanija parodonta pri primenenii kul'tivirovannyh allogennyh fibroblastov v eksperimente // Medicinskij vestnik Severnogo Kavkaza. 2014. T. 9. № 4. S. 336–340.
3. Грудянов А. И., Ерохин А. И., Миронова Л. Л., Конюшко О. И. Лабораторное исследование активности фибробластов в сочетании с различными видами подсадочных материалов in vitro // Цитология. 2001. Т. 43. №9. 854 с.
Grudjanov A. I., Erohin A. I., Mironova L. L., Konjushko O. I. Laboratornoe issledovanie aktivnosti fibroblastov v sochetanii s razlichnymi vidami podsadocnyh materialov in vitro // Citologija. 2001. T. 43. №9. 854 s.
4. Долгалев А. А., Волова Л. Т., Школин А. С., Хубаев С.-С.З., Цогоев В. К. Результаты тестирования синтетического и аллогенного гидроксипатита на культурах клеток // Пародонтология. 2006. Т. №41. №4. С. 60–65.
Dolgalev A. A., Volova L. T., Shkolin A. S., Hubaev S.-S.Z., Cogoev V. K. Rezul'taty testirovanija sinteticheskogo i allogennogo gidroksiapatita na kul'turah kletok // Parodontologija. 2006. T. №41. №4. S. 60–65.
5. Долгалев А. А., Бойко Е. М., Соболев Д. А. Восстановление дефектов альвеолярного отростка с помощью аллогенных костных блоков // Российский вестник дентальной имплантологии. 2015. №1. С. 74–76.
Dolgalev A. A., Bojko E. M., Sobolev D. A. Vosstanovlenie defektov al'veoljarnogo otrostka s pomoshh'ju allogennyh kostnyh blokov // Rossijskij vestnik dental'noj implantologii. 2015. №1. S. 74–76.
6. Перова М. Д. Ткани пародонта: норма, патология, пути восстановления. — М.: Триада Лтд, 2005.
Perova M. D. Tkanj parodonta: norma, patologija, puti vosstanovlenija. — M.: Triada Ltd, 2005.
7. Рябов А. Ю., Фадеева И. С., Деев Р. В., Вежнина Н. О., Юрасова Ю. Б., Фесенко Н. И., Гурьев В. В., Склянчук Е. Д., Лекишвили М. В., Акатов В. С. Экспериментальное и морфологическое исследование биологических мембран ксеногенного происхождения // Гены и клетки. 2014. №4. С. 103–109.
Rjabov A. Ju., Fadeeva I. S., Deev R. V., Vezhnina N. O., Jurasova Ju. B., Fesenko N. I., Gur'ev V. V., Skljanchuk E. D., Lekishvili M. V., Akatov V. S. Eksperimental'noe i morfologicheskoe issledovanie biologicheskijh membran ksenogennogo proishozhdenija // Geny i kletki. 2014. №4. S. 103–109.
8. Buser D. 20 years of guided bone regeneration in implant dentistry — Quintessence Publishing Co, Inc., 2009. — P. 261.

Поступила 11.08.2016

Координаты для связи с авторами:

355000, г. Ставрополь,

пр-т Октябрьской революции, д. 26–28

В журнале «Пародонтология» № 3 (80) 2016 на стр. 72 в резюме и ключевых словах к статье, редакцией были допущены ошибки, приносим извинения авторам и публикуем правильный вариант.

Эффективность метода Perio-Flow в комплексе поддерживающей пародонтальной терапии у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта при ортодонтическом лечении

Л.П. ГЕРАСИМОВА*, д.м.н., проф., зав. кафедрой; О.А. ГУЛЯЕВА**, к.м.н., доц.; Т.С. ЧЕМИКОСОВА*, к.м.н., доц.; Д.Н. ТУХВАТУЛЛИНА**, к.м.н., доц.; О.М. ДУБОВА**, к.м.н., доц.

*Кафедра терапевтической стоматологии с курсом ИДПО

**Кафедра стоматологии общей практики и челюстно-лицевой хирургии ИДПО
ГБОУ ВПО Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

Резюме: С целью оценки эффективности применения метода Perio-Flow в комплексе поддерживающей пародонтальной терапии (SPT) у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта (ВЗП), находящихся на ортодонтическом лечении несъемной техникой, нами проведено клиническое наблюдение 100 пациентов, которым в течение 1 года проводилась SPT в одинаковые сроки (через месяц после начала ортодонтического лечения, через 3 месяца, через 6 и 10 месяцев). В основной группе комплекс SPT дополнялся воздушно-абразивной над- и поддесневой обработкой порошком глицина размером частиц 25 мкм. Результаты исследования показали высокую клиническую эффективность изучаемого метода: отсутствие эпизодов обострения ВЗП, отмечены лучшие показатели гигиенических и пародонтальных индексов — редукция индекса Silness-Loe выше в 3,2 раза ($p < 0,01$), РВИ — на 24,61%, ($p < 0,01$) больше по сравнению с контролем. Полученные данные являются обоснованием необходимости и эффективности регулярных посещений в рамках SPT пациентов с ВЗП, проходящих лечение несъемной ортодонтической техникой, и позволяют рекомендовать включение в комплекс SPT терапию Perio-Flow.

Ключевые слова: воспалительные заболевания пародонта, ортодонтическое лечение, поддерживающая пародонтальная терапия, биопленка, воздушно-абразивный метод, глицин, Perio-Flow.

Abstract: For the purpose of evaluating the effectiveness of the method Perio-Flow in complex, supporting periodontal therapy (SPT) in patients with inflammatory periodontal diseases, undergoing orthodontic treatment with fixed appliances, we carry out but clinical observation of 100 patients within 1 year of SPT was carried out at the same time (a month after the beginning of orthodontic treatment, after 3 months, after 6 and 10 months). In the main group complex of SPT were supplemented by air-abrasive over — and subgingival treatment with glycine powder with a particle size of 25 μm. The results of the study showed a high clinical efficacy of the investigated methods: the absence of episodes exacerbation of opposite rotational flotations, marked the best performance of hygienic and periodontal indexes — reduction index Silness-Loe higher above 3.2 times ($p < 0,01$), PBI — 24,61 %, ($p < 0,01$) compared with the control. The obtained data are the rationale and effectiveness of the regular visits of the SPT to patients with inflammatory periodontal diseases treated by fixed orthodontic appliances, and would allow flexibility to recommend the inclusion in the complex SPT therapy Perio-Flow.

Key words: inflammatory periodontal diseases, orthodontic treatment, supportive periodontal therapy, biofilm, air-abrasive method, glycine, Perio-Flow.