

Сравнительное изучение биологического действия биорезорбируемых коллагеновых мембран на модели гетеротопической имплантации в подкожную жировую клетчатку лабораторным животным

А.А. ВЕНЕДИКТОВ*, к. б. н.

А.А. ДОЛГАЛЕВ**, д. м. н.

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

А.Д. КРУЧИНИНА***, к. б. н., доцент

Ю.А. ЮДИЧЕВА***, магистр

А.А. АЙРАПЕТЯН****, врач-стоматолог

*Научно-производственная компания ООО «Кардиоплант», г. Пенза

**Кафедра стоматологии общей практики и детской стоматологии

ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава РФ

***Кафедра общей биологии и биохимии

ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет» Минздрава РФ

****ООО «Зубная фея», г. Ставрополь

The comparative study of the biological action of bioresorbable collagen membranes on the heterotopic implantation model in a subcutaneous fatty tissue by laboratory animals

A.A. VENEDIKTOV, A.A. DOLGALEV, V.A. ZELENSKIY, A.D. KRUCHININA, Yu.A. YUDICHEVA, A.A. AIRAPETIAN

Резюме

Авторами данной работы представлены результаты эксперимента по свободной гетеротрансплантации коллагеновых резорбируемых мембран, используемых для направленной тканевой регенерации. На основании результатов проведенных исследований исследуемую мембрану можно рекомендовать для дальнейшего изучения в эксперименте на крупных животных в условиях ортотопической имплантации.

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

Abstract

The paper presents the results of experiments on the free transplantation of xenogeneic membrane for guided bone regeneration. Based on the results of the research these membranes can be recommended for further study in experiments on large animals in orthotopic implantation.

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

Работа является трудом многолетнего плодотворного сотрудничества инженеров в области биомедицины и ведущих практикующих врачей-стоматологов.

Разработкой и исследованием свойств материалов для восстановления и замещения поврежденных тканей занимаются многие исследователи по всему миру [1, 7, 10]. По-прежнему является актуальной тема создания биологических материалов с заданными свойствами, а поиск идеального материала для выполнения пластических операций продолжается. Последние достижения регенеративной медицины доказывают преимущества

использования комбинированных тканеинженерных конструкций с биологически активными агентами перед простыми инертными матрицами. Вместе с тем наблюдается рост популярности имплантируемых медицинских изделий на основе использования внеклеточного коллагенового матрикса (ВКМ) [5]. Последний имеет отличительные особенности в поведении и может выступать как в роли скаффолда для роста клеточных культур, так и самостоятельной матрицей для трансформации в здоровые ткани реципиента. Это происходит благодаря природному содержанию биологически активных компонентов (фибронектины,

гликозаминогликаны, цитокины, факторы роста), которые после необходимого режима обработки остаются в имплантате и за счет своего фонового содержания провоцируют клеточную адгезию, пролиферацию и миграцию клеток [2, 8, 9]. В результате имплантат на основе ВКМ не образует рубцов и спаек и после имплантации «заселяется клетками» реципиента. На основе внеклеточного коллагенового матрикса созданы десятки медицинских изделий в самых разных областях медицины, что доказывает перспективность его использования в зоне регенерации [6].



Рис. 1. Внешний вид лиофилизированного внеклеточного коллагенового матрикса

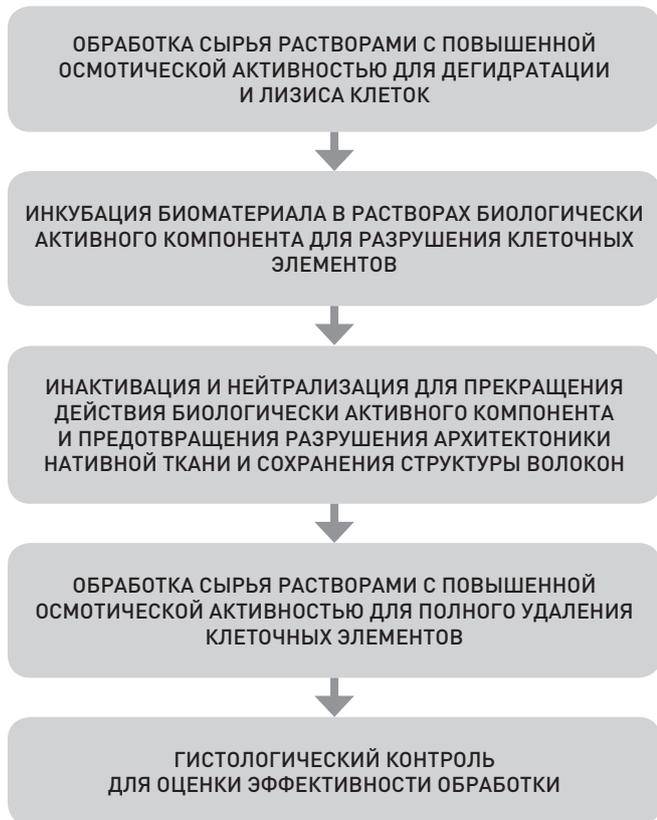


Рис. 2. Схематичное изображение этапа химико-биологической обработки внеклеточного коллагенового матрикса

В работе представлены результаты разработки технологии получения внеклеточного коллагенового матрикса, исследование его физико-механических свойств, биологических и поведенческих свойств, а также результаты оценки функциональных свойств внеклеточной коллагеновой мембраны, разработанной специально для применения в пародонтологии для аугментации мягких тканей, закрытия рецессии и увеличения площади кератинизированной слизистой полости рта. Результаты исследования упруго-деформативных характеристик ВКМ показали возможность изготавливать имплантаты с заданными параметрами толщины, растяжимости и прочности. Оценка биологического действия ВКМ на культурах клеток показали прекрасные биосовместимые свойства биоматериала, отсутствие цитотоксичности, способность к усилению миграции, пролиферации и адгезии, увеличению митотической активности и приросту клеточных культур. Результаты сравнительного исследования поведения разработанных ВКМ мембран на моделях гетеротопической имплантации лабораторных животным показали отсутствие воспаления в зоне имплантации, активную биологическую интеграцию окружающих тканей в матрикс, замещение имплантата на здоровые васкуляризированные ткани без образования рубцов в течение короткого промежутка времени. Наконец, в работе представлены результаты оценки клинической эффективности разработанной на основе ВКМ мембраны при аугментации мягких тканей в полости рта. Результаты свидетельствуют о возможности широкого клинического применения разработанного изделия.

ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО КОЛЛАГЕНОВОГО МАТРИКСА

ВКМ представляет собой ацеллюлярный лиофилизированный однослойный или многослойный тканевый конструктор на основе подслизистой тонкой кишки свиньи (производитель ООО «Кардиоплант») (рис. 1).

Данный биоматериал получен путем химико-биологической обработки ткани ксеногенного происхождения (рис. 2), обладает прекрасной биосовместимостью, высокой скоростью биоинтеграции и способностью замещаться на собственные здоровые ткани без образования рубцов, а также механической прочностью. Установлена хорошая адгезия и высокий уровень роста клеточных культур на нем.

Ключевые этапы процесса изготовления внеклеточного коллагенового матрикса и их краткая характеристика представлены в таблице 1.

Химико-биологическая обработка обеспечивает сохранение целостности волокон нативной соединительной ткани, отвечающих за прочностные характеристики биоматериала и за счет удаления клеточных элементов способствует уменьшению выраженности воспалительной реакции, возникающей в ответ на имплантацию материала в организм реципиента (рис. 3).

Модели гетеротопической имплантации широко применяются для оценки биосовместимых свойств медицинских изделий, скоростей биоинтеграции и биodeградации материалов, изучения тканевой реакции на имплантат [3].

Исследования проводились на базе ООО «Центр доклинических исследований», г. Пенза. В эксперименте

Таблица 1. Технологическая схема производства внеклеточного коллагенового матрикса

Этап процесса	Основная задача этапа
Механическая чистка	Предварительная очистка сырья ксеногенного происхождения
Химико-биологическая обработка	Этап необходим для повышения биосовместимости материала за счет снижения его видоспецифичности. Происходит разрушение и удаление клеток и их компонентов — основных факторов иммуногенности
Обработка сшивающим агентом	Придание готовому биоматериалу необходимых физико-механических и прочностных характеристик, а также создание конструкторов необходимой толщины
Лиофильная сушка	Консервация биоматериала

участвовали 20 самцов белых беспородных крыс в возрасте 4–5 месяцев массой 200–250 г.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнительное изучение биологического действия широко применяемой стоматологической биорезорбируемой коллагеновой мембраны bioPLATE MEMBRANE Barrier (производитель ООО «Кардиоплант») и мембраны на основе внеклеточного коллагенового матрикса (производитель ООО «Кардиоплант»). Перед имплантацией все исследуемые образцы размером 1x1 см упаковывали в газопроницаемые пакеты и стерилизовали окисью этилена.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Провести подкожную имплантацию образцов белым беспородным крысам.
2. Провести гистологические исследования извлеченных из животных опытных образцов.
3. Провести сравнительный анализ степени биоинтеграции и биодegradации образцов.
4. Провести сравнительную оценку тканевой реакции на имплантат.

Перед операцией животные в течение не менее семи дней находились в условиях вивария. Содержание животных и условия проведения экспериментов *in vivo* соответствовали ГОСТ Р ИСО 10993–2–2011 «Требования к обращению с животными» [3], положениям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

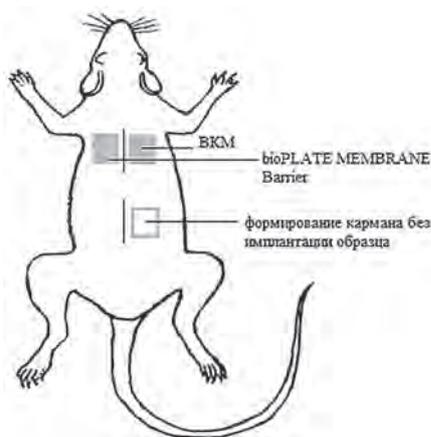


Рис. 4. Схема имплантации экспериментальных образцов

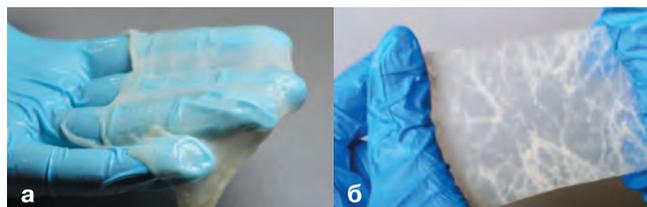


Рис. 3. Внешний вид сырья для получения внеклеточного коллагенового матрикса до (а) и после (б) обработки

При проведении операции животных наркотизировали растворами золетила (6 мг/кг, Zoletil 100, Italia) и рометара (0,5 мл/кг, Rometar, Spofa, Praha). Оперативное вмешательство проводилось в стерильных условиях. С операционного поля удаляли шерсть, участок кожи в месте разреза обрабатывали антисептиком 0,05% раствором хлоргексидина, излишки антисептика удаляли стерильными салфетками. Имплантацию образцов экспериментальным животным осуществляли под кожу в карманы, сформированные в области межлопаточного пространства (рис. 4). Такая область характеризуется малой подвижностью и доступностью для самого животного, что сводит к минимуму вероятность его вмешательства в экспериментальный процесс. В контрольной группе сформированный подкожный карман ушивали без имплантации материала. Животные выводились из эксперимента путем передозировки золетила на 7, 14, 30, 60, 90 сутки. Область имплантации иссекали, полученные ткани фиксировали в 10% нейтральном формалине и заливали в парафин. Для рутинного гистологического исследования готовили микротомные срезы толщиной 4–5 мкм, окрашивали их гематоксилином и эозином, пирюфуксином по Ван-Гизону и фукселином на эластические волокна, полученные препараты изучали с помощью светового микроскопа [13].

В качестве маркеров успешного приживления или, напротив, биодеструкции трансплантата использовали следующие морфологические показатели: изменение структуры, интенсивность и продолжительность воспалительной реакции со стороны тканей реципиента, время образования капсулы и степень ее зрелости, скорость восстановления первоначальной структуры тканей ложа реципиента. Очень важно, сохраняет ли трансплантат структурную целостность или подвергается фрагментации и резорбции. Эти факторы определяют, насколько быстрыми будут васкуляризация и смена клеточных ассоциаций

Таблица 2. Результаты гистологического исследования на разных сроках после имплантации биорезорбируемых коллагеновых мембран

Признак сравнения	Группа 1 коллагеновая мембрана bioPLATE MEMBRANE Barrier (производитель ООО «Кардиоплант»)	Группа 2 мембрана на основе внеклеточного коллагенового матрикса (производитель «Кардиоплант»)
Срок имплантации — 7 дней		
Воспалительная реакция	выраженная лимфогистоцитарная инфильтрация по краю образца	выраженная лимфогистоцитарная инфильтрация по краю образца
Биоинтеграция	формирование коллагеновых волокон вокруг образца	формирование коллагеновых волокон вокруг образца
Биодеградация	не выявлено	не выявлено
Васкуляризация	не выявлено	формирование одиночных кровеносных сосудов
Срок имплантации — 14 дней		
Воспалительная реакция	выраженная лимфогистоцитарная инфильтрация по краю образца	выраженная лимфогистоцитарная инфильтрация по всему образцу
Биоинтеграция	формирование соединительнотканной капсулы вокруг образца	формирование коллагеновых волокон вокруг образца и между его волокнами
Биодеградация	по краю образца	по всему образцу
Васкуляризация	формирование одиночных кровеносных сосудов	множественное формирование сосудов
Срок имплантации — 30 дней		
Воспалительная реакция	слабо выраженное, по всем полям зрения	замещение образца фиброзированной грануляционной тканью
Биоинтеграция	формирование коллагеновых волокон вокруг образца, между его волокнами	
Биодеградация	по всему образцу	
Васкуляризация	формирование новых кровеносных сосудов	
Срок имплантации — 60 дней		
	замещение образца фиброзированной грануляционной тканью	ткань реципиента по месту имплантации восстанавливает свою структуру

с полиморфноклеточной на лимфо-макрофагальную, а затем и на фибробластическую. Тем самым определяется время и скорость формирования коллагеновых волокон капсулы, которая является барьером и связующим звеном между трансплантатом и тканями реципиента [1, 13].

На 7-е сутки наблюдалась тканевая реакция со стороны окружающих мембрану на основе ВКМ тканей, проявляющаяся в средне выраженной лимфогистоцитарной инфильтрации по краю среза образца. Отмечается формирование новых коллагеновых волокон вокруг образца. Схожая картина наблюдалась при имплантации коллагеновой мембраны bioPLATE MEMBRANE Barrier (рис. 5, 6).

На 14-е сутки в зоне имплантации мембраны на основе ВКМ обнаружена лимфогистоцитарная инфильтрация по всему образцу, фиброзирующая грануляционная ткань, содержащая фрагменты имплантированного материала, пронизанные фибробластами. Обнаружено наличие отдельных групп гигантских клеток, что свидетельствует об относительно слабой гигантоклеточной реакции при резорбции коллагена мембраны. Наблюдается множественное формирование кровеносных сосудов в грануляциях. По-видимому, резорбция образцов проходит за счет активности макрофагов и ферментативного лизиса. На 14-е сутки в зоне имплантации мембраны bioPLATE MEMBRANE Barrier обнаружена лимфогистоцитарная инфильтрация

по краю образца, наблюдается формирование соединительнотканной капсулы вокруг имплантата (рис. 7, 8).

На 30-е сутки образец мембраны на основе ВКМ замещался фиброзированной грануляционной тканью, результат свидетельствует о его активной биодеградации. В зоне имплантации мембраны bioPLATE MEMBRANE Barrier отмечалась активные биоинтеграция и биодеградация образца (рис. 9, 10).

На 60-е сутки следов образцов мембраны на основе ВКМ не оставалось, а ткань на месте имплантации восстанавливала свою структуру. На 60-е сутки образец мембраны bioPLATE MEMBRANE Barrier замещался фиброзированной грануляционной тканью (рис. 11, 12).

Результаты исследования показали отсутствие реакции отторжения в ответ на имплантацию мембраны на основе внеклеточного коллагенового матрикса и коллагеновой мембраны bioPLATE MEMBRANE Barrier. Установлено, что коллаген материалов подвергается макрофагальной резорбции и ферментативному лизису, замещаясь грануляционной, а затем фиброзной тканью с последующей ее инволюцией. Отмечена высокая скорость биоинтеграции образцов мембраны на основе ВКМ, что может быть связано с присутствием в составе материала гликопротеинов, протеогликанов, факторов роста. Дegradация материала приводит к высвобождению биоактивных молекул, что

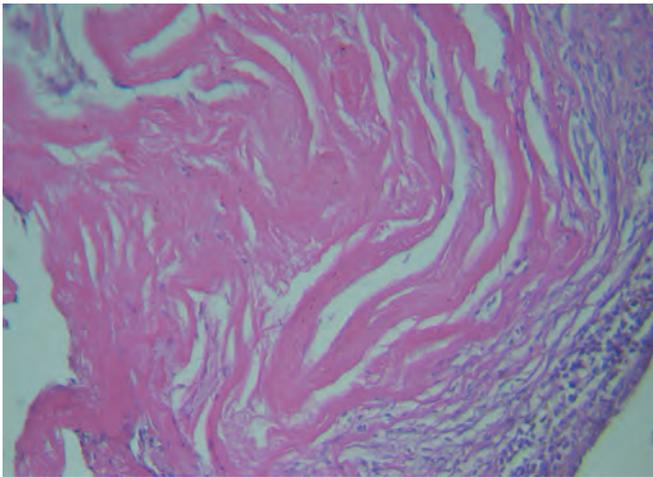


Рис. 5. Результаты гистологического исследования тканевой реакции на имплантацию мембраны на основе внеклеточного коллагенового матрикса. Срок имплантации 7 дней. Окраска гематоксилин-эозин, x200

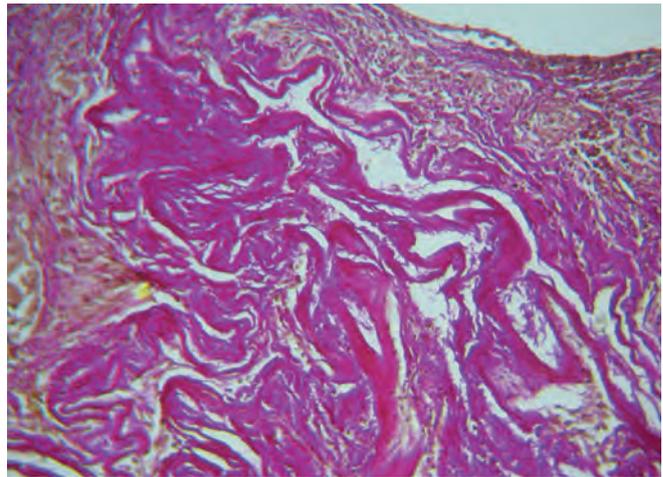


Рис. 6. Результаты гистологического исследования тканевой реакции на имплантацию мембраны на основе внеклеточного коллагенового матрикса. Срок имплантации 7 дней. Окраска по Вейгер-Ван-Гизону, x200

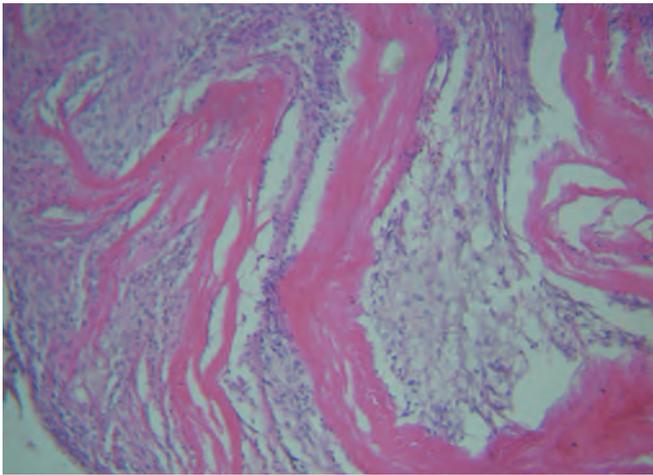


Рис. 7. Результаты гистологического исследования тканевой реакции на имплантацию мембраны на основе внеклеточного коллагенового матрикса. Срок имплантации 14 дней. Окраска гематоксилин-эозин, x200

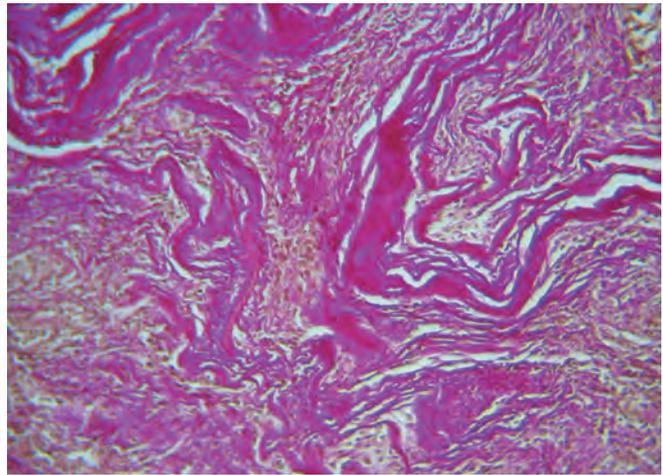


Рис. 8. Результаты гистологического исследования тканевой реакции на имплантацию мембраны на основе внеклеточного коллагенового матрикса. Срок имплантации 14 дней. Окраска по Вейгер-Ван-Гизону, x200

способствует усилению репаративных процессов. Срок биорезорбции мембраны на основе ВКМ составил около одного месяца, полное восстановление структуры тканей реципиента происходило за 60 суток, в то время как полная резорбция образцов коллагеновой мембраны bioPLATE MEMBRANE Barrier и восстановление тканей реципиента происходит в течение не менее трех месяцев (табл. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований по изучению физико-механических характеристик и биологического действия внеклеточного коллагенового матрикса свидетельствуют о перспективности применения внеклеточного

коллагенового матрикса и медицинских изделий на его основе для регенерации мягких тканей.

Разработанная на основе внеклеточного коллагенового матрикса стоматологическая мембрана рекомендуется к широкому клиническому применению при заживлении пародонтальных дефектов, для аугментации мягких тканей, закрытия рецессии, увеличения объема прикрепленной кератинизированной десны.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баландина М. А., Кобозев М. И., Мураев А. А., Иванов С. Ю. Сравнительный анализ эффективности хирургических методик закрытия множественных рецессий десны // Здоровье и образование XXI века. 2016. Vol. 18. №1. С. 103-107.

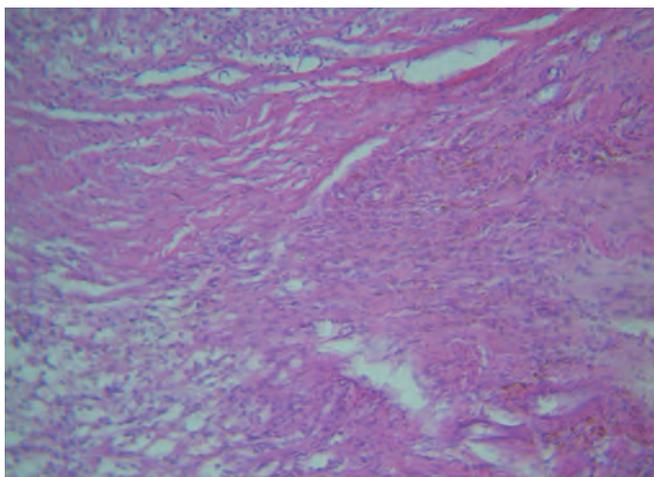


Рис. 9. Результаты гистологического исследования тканевой реакции на имплантацию мембраны на основе внеклеточного коллагенового матрикса. Срок имплантации 30 дней. Окраска гематоксилин-эозин, х200

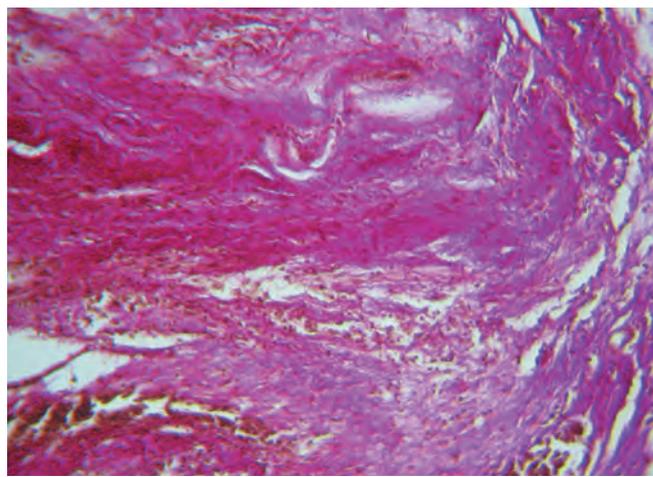


Рис. 10. Результаты гистологического исследования тканевой реакции на имплантацию мембраны на основе внеклеточного коллагенового матрикса. Срок имплантации 30 дней. Окраска по Вейгерту-Ван-Гизону, х200

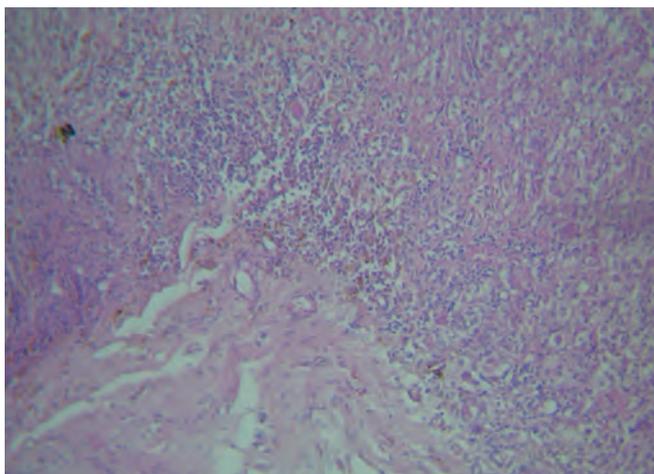


Рис. 11. Результаты гистологического исследования тканевой реакции на имплантацию мембраны bioPLATE MEMBRANE Barrier. Срок имплантации 30 дней. Окраска гематоксилин-эозин, х200

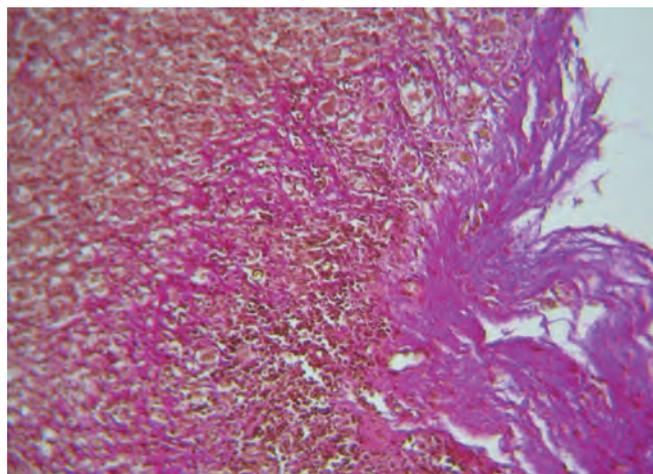


Рис. 12. Результаты гистологического исследования тканевой реакции на имплантацию мембраны bioPLATE MEMBRANE Barrier. Срок имплантации 30 дней. Окраска по Вейгерту-Ван-Гизону, х200

Balandina M. A., Kobozev M. I., Muraev A. A., Ivanov S. Ju. Sravnitel'nyj analiz effektivnosti hirurgicheskikh metodik zakrytija mnozhestvennyh recessij desny // Zdorov'e i obrazovanie NHI veka. 2016. Vol. 18. №1. S. 103-107.

2. Пальцев М. А., Иванов А. А., Северин С. Е. Межклеточные взаимодействия. 2-е изд. – М.: Медицина, 2003. – 288 с.

Pal'cev M. A., Ivanov A. A., Severin S. E. Mezhkletochnye vzaimodejstviya. 2-e izd. – М.: Medicina, 2003. – 288 s.

3. Севастьянов В. И., Кирпичников М. Т. Биосовместимые материалы. – М.: МИА, 2011. – 544 с.

Sevast'janov V. I., Kirpichnikov M. T. Biosovmestimye materialy. – М.: MIA, 2011. – 544 s.

4. ГОСТ Р ИСО 10993–2–2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными».

GOST R ISO 10993–2–2011 «Izdelija medicinskie. Ocenka biologicheskogo dejstviya medicinskih izdelij. Chast' 2. Trebovaniya k obrashheniju s zhivotnymi».

5. Badylak S. F. The extracellular matrix as a biologic scaffold material // Bio-materials. 2007. №28. P. 3587-3593.

6. Badylak S. F., Freytes D. O., Gilbert T. W. Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function // Acta Biomaterialia. 2009. Vol. 5. №1. P. 1-13.

7. Brown B., Lindberg K., Reing J., Stolz D. B., Badylak S. F. The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix // Tissue Eng. 2006. Vol. 12. №3. P. 519-526.

• **Полный список литературы находится в редакции**

Поступила 31.05.2018

Координаты для связи с авторами:
355017, г. Ставрополь, ул. Мира, д. 310
E-mail: venediktovpenza@gmail.com