

УДК 616.728.3-018.3:616-007.248:617.5-089.844

АНАЛИЗ БИОСОВМЕСТИМОСТИ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ РАСШИРЯЮЩЕГОСЯ САМОБЛОКИРУЮЩЕГОСЯ ИНТРАМЕДУЛЛЯРНОГО СТЕРЖНЯ С ПОМОЩЬЮ КУЛЬТУРЫ ОСТЕОГЕННЫХ ФИБРОБЛАСТОПОДОБНЫХ КЛЕТОК

¹Котельников Г.П., ²Проценко О.Н., ¹Волова Л.Т., ¹Ларцев Ю.В., ¹Зуев-Ратников С.Д.,
¹Долгушкин Д.А., ¹Татаренко И.Е., ¹Шорин И.С., ¹Кудашев Д.С.

¹ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет»

Минздрава России, Самара, e-mail: info@samsmu.ru;

²ГБУЗ Самарской области «Тольяттинская городская больница № 5»,

Тольятти, e-mail: medvaz@tlt.ru

Проведен сравнительный анализ биосовместимости материалов, используемых для изготовления расширяемого самоблокирующегося интрамедуллярного стержня для остеосинтеза переломов длинных трубчатых костей. Тестированию были подвергнуты образцы стали двух марок: 08X18H10 и 12X18H10T. В качестве тест-систем были использованы культуры остеогенных фибробластоподобных клеток 4-х пассажей. Выбор данной культуры для проведения экспериментальной работы был основан на ее органотипичности с клетками ретикулярной стромы костного мозга длинных трубчатых костей, участвующими в формировании эндостальной костной мозоли после проведения интрамедуллярного остеосинтеза. Всего было проведено 72 исследования – 52 опыта и 20 контрольных наблюдений. Результаты тестирования показали, что адгезия остеогенных фибробластоподобных клеток более выражена к образцу стали марки 12X18H10T. Также было выявлено, что сталь указанной марки не обладает цитостатическим действием на клетки ретикулярной стромы по сравнению со сталью марки 08X18H10, которая уже на ранних сроках индуцирует частичную гибель и вызывает снижение количества и качества пула остеогенных фибробластоподобных клеток. Проведенный сравнительный анализ результатов экспериментального исследования показал, что использование для изготовления интрамедуллярного стержня стали марки 12X18H10T перспективно будет оказывать положительное влияние на процессы остеointegrации после проведения остеосинтеза и способствовать формированию адекватной в качественном и количественном отношении эндостальной костной мозоли.

Ключевые слова: интрамедуллярный остеосинтез, сталь, клеточная культура, ретикулярная строма, остеointegrация

ANALYSIS OF BIOCOMPATIBLE MATERIALS FOR MANUFACTURING EXPANDS SELF-LOCKING INTRAMEDULLARY NAIL THROUGH THE OSTEOGENIC FIBROBLAST-LIKE CELL CULTURE

¹Kotelnikov G.P., ²Protsenko O.N., ¹Volova L.T., ¹Lartsev Y.V., ¹Zuev-Ratnikov S.D.,
¹Dolgushkin D.A., ¹Tatarenko I.E., ¹Shorin I.S., ¹Kudashev D.S.

¹Samara State Medical University, Samara, e-mail: info@samsmu.ru;

²Tolyatti city hospital № 5, Tolyatti, e-mail: medvaz@tlt.ru

The comparative study of biocompatibility for materials that used for expandable self-locking intramedullary nail for pipe bone osteosynthesis processing has been performed. Two steel samples of 1,4301 and 1,4878 grades (EN) were tested. As a test-system the authors used the osteogenic fibroblast-like cell culture of 4 passages. The choice of this culture for experimental research is based on its organotypical qualities to pipe bone medullary reticular stromal cells that participate in central callus formation after nailing. 72 investigations included 52 experiments and 20 control observations. The research results showed that osteogenic fibroblast-like cells adhesion pronounced more with 1,4878 grade steel sample. It was also found that the named steel grade does not offer cytotoxic action on the reticular stromal cells in comparison with 1,4301 grade steel that induce partial necrocytosis and causes osteogenic fibroblast-like cells pool quantity reduction since the early stages. Realized comparative study of the experimental research results showed that the 1,4878 grade steel used for intramedullary nail manufacturing will in prospect bias for the better osteointegration after the osteosynthesis and will be beneficial in quantitatively and qualitatively adequate central callus formation.

Keyword: intramedullary fixation, steel, cell culture, reticular stroma, osteointegration

Бурное развитие инновационных медицинских технологий в XXI веке привело к появлению огромного количества материалов биогенного и небиогенного происхождения, предназначенных для имплантации в организм человека. А это, в свою очередь, потребовало уточнения терминологии и ужесточения требований, предъяв-

ляемых к подобным изделиям медицинского назначения [1, 5].

В настоящее время, согласно статье 43 «Основ законодательства РФ об охране здоровья граждан», все новые технологии диагностики и лечения должны пройти доклинические исследования, которые включают эксперименты на живых системах:

животных и культурах клеток. ГОСТ Р ИСО 10993.5-99 (2000 г.) обязывает определение цитотоксичности на клеточных культурах, замечая, что обычно в качестве тест-систем используются суспензии подвижных клеток и известные линии клеток из известных источников (п. 5.1). В то же время допускается выбор для целей тестирования других культур, в частности, «если требуется особая чувствительность, используют лишь первичные клеточные культуры и линии клеток, полученные непосредственно из живых тканей, если можно продемонстрировать воспроизводимость и точность ответной реакции» (п. 5.2).

Культуры клеток как тест-системы имеют ряд существенных преимуществ по сравнению с экспериментальными животными. Основными из них являются возможность постановки эксперимента на большом количестве однородных объектов и быстрое получение результата. Кроме того, клетки в культуре легко доступны для различных манипуляций, при этом может быть достигнут непосредственный контакт тестируемого фактора или объекта с культивируемыми клетками, причем в течение заданного периода времени [2, 3, 4]. Однако главное преимущество культурального метода – это возможность прижизненного наблюдения культивируемых клеток с помощью микроскопа. Это позволяет оценивать в динамике на одной и той же тестовой культуре структурные характеристики клеток в монослое [6].

Нами была разработана конструкция расширяемого самоблокирующегося интрамедуллярного стержня, используемого для малотравматичного лечения больных с переломами длинных трубчатых костей. При этом помимо моделирования и комплексного изучения биомеханической системы «стержень – интрамедуллярный канал – кость» мы, в рамках доклинических исследований, провели комплексные исследования материалов, запланированных для изготовления стержня, направленные на изучение их биосовместимости.

Цель исследования – провести сравнительный анализ биосовместимости материалов, используемых для изготовления расширяемого самоблокирующегося интрамедуллярного стержня, предназначенного для остеосинтеза переломов длинных трубчатых костей.

Материал и методы исследования

Для тестирования на биосовместимость были представлены образцы стали марок 08X18H10 и 12X18H10T.

Образцы стали марки 08X18H10 были нарезаны из стержня толщиной 3×3 мм и имели форму кубиков или параллелепипедов.

Образцы стали марки 12X18H10T были представлены в форме плоских дисков диаметром 10 мм и толщиной 3 мм с гладкой блестящей поверхностью.

Исследования были проведены на тест-системе в виде культуры остеогенных фибробластоподобных клеток 4-х пассажей. Наш выбор данной культуры для проведения экспериментальной работы был основан на ее органотипичности с клетками ретикулярной стромы костного мозга длинных трубчатых костей, участвующими в формировании эндостальной костной мозоли после проведения интрамедуллярного остеосинтеза.

Остеогенные фибробластоподобные клетки выращивали из крыши черепа abortированного эмбриона 12-й недели гестации по стандартной методике. Клетки культивировали в стандартных условиях в CO²-инкубаторе Sanyo-Incubator MIR-262 («Sanyo», Япония) при температуре 37°C и постоянной влажности и 5% CO² в среде MEM (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург, РФ) с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург, РФ).

Клеточный материал на 4-м пассаже был обследован методом ПЦР на наличие следующих инфекционных агентов: цитомегаловирус, вирусы гепатитов В и С, уреоплазма, хламидии *trachomatis*, микоплазма *hominis*, вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска (14 типов), вирус герпеса 1 и 2 типа, грибы рода *Candida albicans*. Результаты всех анализов были отрицательные. На заключительном пассаже была проведена идентификация клеток с использованием морфологических и биохимических методов и проточной цитометрии.

Исследование биосовместимости осуществляли методом прямого контакта в 12-луночных культуральных планшетах с плоским дном («Orange Scientific», Бельгия) и культуральных чашках Петри диаметром 3,5 см («Orange Scientific», Бельгия) в аналогичных условиях культивирования клеток.

Все работы с культурой проводили в ламинарном боксе БАВп-01 «Ламинар-С» (ЗАО «Ламинарные системы», Миасс, РФ). Образцы материала помещали на дно чашек или лунок планшета. Клетки снимали со дна культурального флакона стандартным способом (при помощи 0,25% раствора трипсина и 0,02% раствора Версена) и пересевали в планшеты с образцами. Контролем служили планшеты с культурой соответствующих клеток без образцов, которые пассировали и наблюдали одновременно с экспериментальными. При посеве доза во всех случаях составляла 20 тысяч клеток/см² (2·10⁴). Оценку нативной клеточной культуры и взаимодействия объекта и тест-системы проводили на сроках 1-е, 7-е и 14-е сутки. Всего было проведено 72 исследования – 52 опыта и 20 контрольных наблюдений.

Нативные культуры изучали, фотографировали и морфометрировали с помощью инвертированного микроскопа «Биолам-2-1» 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 (состояние цитоплазмы – наличие вакуолей, зернистости, наличие и состояние отростков, структуру ядра и ядрышек, положение ядра в клетке, количество ядер и ядрышек в клетках). 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. Для определения количества поврежденных клеток в монослое считали 200 клеток в 5 полях зрения, из них отдельно учитывали поврежденные клетки и выражали результат в %. На основании данных о плотности монослоя рассчитывали время удвоения культуры.

По окончании каждого срока эксперимента готовили гистологические препараты клеточных культур. Фиксированные 4% раствором параформальдегида препараты окрашивали орсеином по Унна – Тенцеру. В нефиксированных клетках монослоя выявляли нейтральный жир суданом IV и гематоксилином. Препараты изучали и фотографировали с помощью автоматизированной аналитической системы, включающей микроскоп «Olympus CX 21», цифровую фотокамеру «Olympus» C – 4000 ZOOM и системный блок на базе процессора Intel Pentium 4. Всего изучено 134 препарата. В эти же сроки поверхность образцов (по 2 опытных и 1 контрольный на каждый срок) исследовали методом растровой электронной микроскопии (РЭМ) с помощью микроскопа JEOL JSM – 6390A AnalysisSatation (Япония).

Результаты исследования и их обсуждение

Исследование биосовместимости стали марки 08X18H10

При наблюдении нативной культуры остеогенных фибробластоподобных клеток в динамике было выявлено, что через 2 часа после пересева большинство этих клеток приставали к культуральному пластику и распластывались на нем, а через 24 часа остеогенные фибробластоподобные клетки формировали неравномерный монослой, в котором клетки были соединены своими отростками друг с другом как по периферии лунки, так и в непосредственной близости от образца. Клетки не отличались по структуре и характеру их роста от контрольных культур.

На 7-е сутки эксперимента клетки на пластике были расположены хаотично с неравномерной и при этом достаточно низкой плотностью как вблизи образца, так и по периферии. По структуре и характеру роста клетки не отличались от контрольных культур, однако на отдельных участках, расположенных на поверхности испытуемого образца, визуализировали единичные нежизнеспособные клетки.

На 14-е сутки эксперимента наблюдали уменьшение количества остеогенных фибробластоподобных клеток как непосредственно вблизи помещенного образца, так и по периферии. Остеогенные фибробластоподобные клетки в непосредственной близости от помещенного образца имели более округлую форму по сравнению с периферией. Также мы отмечали укорочение отростков и уменьшение размеров цитоплазмы в соотношении с ядром. Ядра клеток были

представлены разными размерами, неправильной овальной формы, с гладкой оболочкой, хроматин в них был представлен в виде мелкой диффузно расположенной зернистости. В некоторых клетках наблюдали ядра с явлениями пикноза. Нейтральный жир не обнаруживали (рис. 1).

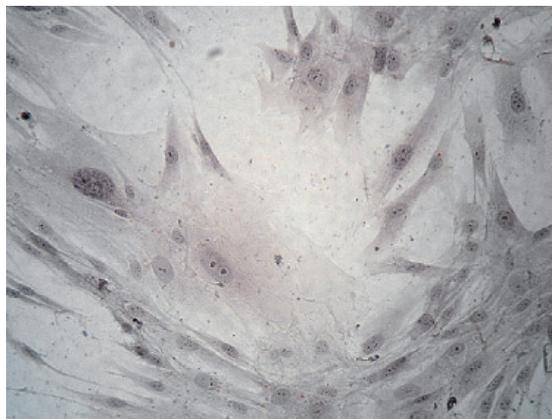


Рис. 1. Культура остеогенных фибробластоподобных клеток из крыши черепа эмбриона. Клетки вблизи от поверхности образца стали марки 08X18H10. 14-е сутки эксперимента. Окраска гематоксилин + судан IV. Увеличение 400

Результаты анализа биосовместимости образца стали марки 12X18H10T

При наблюдении нативной культуры в динамике было выявлено, что через 2 часа после пересева большинство этих клеток приставали к культуральному пластику и распластывались на нем, а через 1 сутки остеогенные фибробластоподобные клетки формировали неравномерный монослой, в котором клетки были соединены своими отростками друг с другом и плотность которого была неодинакова как по периферии лунки, так и в непосредственной близости от образца. Клетки не отличались по структуре и характеру их роста от контрольных культур.

На 7-е сутки эксперимента мы наблюдали плотный монослой фибробластов, расположенных в одном направлении. Клетки имели вытянутую форму и очень близко прилежали друг к другу, соединяясь своими отростками друг с другом. При этом остеогенные фибробластоподобные клетки формировали более плотный монослой не только по периферии, но и вблизи образца. Размер ядер варьировал, что свидетельствовало о разной степени зрелости клеток.

На 14-е сутки эксперимента остеогенные фибробластоподобные клетки в непосредственной близости от помещенного образца стали свободно располагались в разных на-

правлениях, визуализировались в нескольких слоях с различной плотностью. Отростки клеток имели ровные контуры и значительную длину, а также наслаивались друг на друга. Цитоплазма клеток была оксифильна и представлялась гомогенной. Ядра клеток имели округлую форму с незначительной разницей в размерах, с хорошо различимыми внутри них ядрышками правильной овальной формы, с гладкой оболочкой. Хроматин в виде мелкой зернистости был расположен в ядрах диффузно. Нейтральный жир также не обнаруживали (рис. 2).

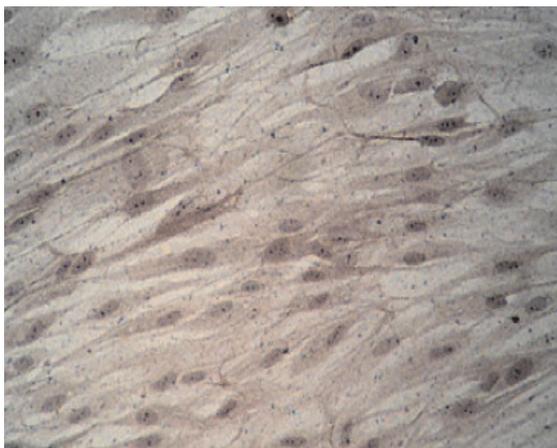


Рис. 2. Культура остеогенных фибробластоподобных клеток из крышки черепа эмбриона. Клетки вблизи от поверхности образца стали марки 12X18H10T. 14-е сутки эксперимента. Окраска гематоксилин + судан IV. Увеличение 400

Выводы

1. Проведенная экспериментальная работа и анализ ее результатов показали, что адгезия остеогенных фибробластоподобных клеток более выражена к тестированному образцу стали марки 12X18H10T по сравнению со сталью марки 08X18H10. Проспективно это будет оказывать положительное влияние на процессы остеоинтеграции после выполнения интрамедуллярного остеосинтеза стержнем, изготовленным из стали марки 12X18H10T.

2. Сталь марки 12X18H10T не обладает цитостатическим действием на клетки ретикулярной стромы по сравнению со сталью марки 08X18H10, которая уже на ранних сроках индуцирует частичную гибель и вызывает снижение количества и качества пула остеогенных фибробластоподобных клеток. Указанное свойство стали марки 12X18H10T также будет способствовать формированию адекватной в качественном и количественном отношении эндостальной костной мозоли.

3. В связи с тем, что разработанный интрамедуллярный стержень после введения

в костномозговой канал длительное время контактирует не только со стромой, но и с паренхимой костного мозга, необходимо проведение дополнительных морфологических и биохимических исследований, изучающих влияние материала стержня на структурные клеточные элементы костного мозга (миелобласты, миелоциты, лимфоциты, эритроциты и др.).

Список литературы

1. Вирхов С.П. Биомедицинское материаловедение: учебное пособие для вузов / С.П. Вирхов, Т.А. Холомина, П.И. Бегун, П.Н. Афонин – М.: Горячая линия-Телеком, 2006. – 383 с.
2. Волова Л.Т. Биологическая система оценки качества биоимплантатов с помощью клеточных технологий // Успехи современного естествознания. – 2008. – № 5. – С. 86–88.
3. Григорьян А.С. Проблемы интеграции имплантатов в костную ткань (теоретические аспекты) / А.С. Григорьян, А.К. Топоркова. – М.: Техносфера, 2007. – 128 с.
4. Деев Р.В. Клеточные технологии в травматологии и ортопедии: пути развития / А.А. Исаев, А.Ю. Кочиш, Р.М. Тихилов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – № 4 (Том II). – С. 18–30.
5. Murray P.E. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated / P.E. Murray, Godoy C. Garcia, Godoy F. Garcia // Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal. – 2007. Vol. 12, № 3. – P. 258–66.
6. Pizzoferrato A. Cell culture methods for testing biocompatibility / A. Pizzoferrato, G. Ciapetti, S. Stea // Clin. Mater. – 2009. – Vol.15, № 3. – P. 173–90.

References

1. Virchow SP Biomeditsinskoye materialovedeniye: Uchebnoye posobiye dlya VUZov [Biomedical Materials: Textbook for High] / S.P. Virkhov, T.A. Kholomina, P.I. Begun, P.N. Afonin M.: Goryachaya liniya-Telekom, 2006. 383 p.
2. Volova LT Biologicheskaya sistema otsenki kachestva bioimplantatov s pomoshchyu kletochnykh tekhnologiy [The biological system of quality assessment bioimplantativ using cellular technologies] // Uspexhi sovremennogo yestestvoznaniya [The success of modern science]. 2008. no. 5. pp. 86–88.
3. Grigor yan AS Problemy integratsii implantatov v kostnyuyu tkan (teoreticheskiye aspekty) [Problems of integration of implants in bone tissue (theoretical aspects)] / A.S. Grigor yan, A.K. Toporkova. M.: Tekhnosfera, 2007. 128 p.
4. Deyev RV Kletochnyye tekhnologii v travmatologii i ortopedii: puti razvitiya [Cellular technologies in traumatology and orthopedics: the development] / A.A. Isayev, A.YU. Kochish, R.M. Tikhilov // Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya. [Cell transplantation and tissue engineering] 2007. no. 4 (Tom II). pp. 18–30.
5. Murray P.E. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated / P.E. Murray, Godoy C. Garcia, Godoy F. Garcia // Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal. 2007. Vol. 12, no. 3. pp. 258–66.
6. Pizzoferrato A. Cell culture methods for testing biocompatibility / A. Pizzoferrato, G. Ciapetti, S. Stea // Clin. Mater. 2009, Vol.15, no. 3. pp. 173–90.

Рецензенты:

Повелихин А.К., д.м.н., профессор кафедры травматологии, ортопедии и экстремальной хирургии, ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России, г. Самара;

Сонис А.Г., д.м.н., директор ИПО, проректор по лечебной работе, заведующий кафедрой общей хирургии с клиникой пропедевтической хирургии, ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России, г. Самара.