БИОЛОГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА БИОИМПЛАНТАТОВ С ПОМОЩЬЮ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Волова Л.Т.

Самарский государственный медицинский университет

В Самарском банке тканей ЦНИЛ СамГМУ четверть века проводятся исследования по разработке новых способов лечения больных с патологией соединительных и покровных тканей. Эти способы основаны на применении в реконструктивных операциях аллогенных имплантатов серии «Лиопласт»®, а также различных клеточных культур, получаемых в нашей лаборатории.

Другим, не менее важным направлением деятельности Самарского банка тканей являются исследования, направленные на формирование методологии лабораторного анализа с помощью клеточных технологий для оценки качества, безопасности и эффективности биоимплантатов, а также других изделий медицинского назначения, лекарственных средств и физиотерапевтических факторов.

Согласно Российскому законодательству и международным нормам биоэтики, каждый инновационный проект в области медицины предполагает обязательные и всесторонние доклинические испытания новых препаратов и способов лечения на живых системах (in vivo и in vitro). Среди них исследования с использованием культур клеток являются наиболее прогрессивными и этичными.

Существующие нормативы и стандарты лабораторных испытаний лекарственных средств и изделий медицинского назначения, к которым относятся и биоимпланты серии «Лиопласт»®, производимые в Самарском банке тканей Самарского государственного медицинского университета (3), включают в себя исследования in vitro на клетках. Однако такие приемы для оценки качества исследуемых объектов в основном направлены на выявление цитотоксичности (ГОСТ ИСО). Вместе с тем, современный уровень клеточных технологий, принципы биоэтики и требования GLP - «хорошая лабораторная техника», делают применение клеточных культур в этой области медицины чрезвычайно актуальным.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: расширить возможности культурального метода для определения качества и свойств биоимплантатов и других медицинских объектов.

Для этого необходимо создать методологическую базу контроля риска и дифференцированной оценки характера их влияния на морфофункциональное состояние определенных популяций клеток.

Известно, что методология представляет собой комплекс принципов, методов и моделей.

Принципы, сформулированные в работе, заключаются:

- в проведении исследования на культурах различных клеток, последовательно сменяющих друг друга в фазах раневого процесса (например, микрофаги, макрофаги, фибробласты, хондробласты, остеобласты);

- в обязательном анализе состояния клеток монослоя, а также компонентов культуральной среды с помощью комплекса лабораторных методов исследования.

Для обеспечения этих исследований используются следующие методы: морфологические, морфометрические, иммунологические, биохимические, в том числе, и предложенный и запатентованный нами способ оценки основной коллагенсинтетической функции фибробластов и других клеток-механоцитов. Суть его заключается в определении в культуральной среде оксипролина - маркера коллагена.

Моделью служила имплантация изучаемого объекта на прикрепленные клетки культуры. С этой целью в лаборатории выращивали различные виды культур клеток (макрофаги, фибробласты, фибробластоподобные клетки). Опыты проводили с биоматериалами серии «Лиопласт»®, а также с синтетическими препаратами аналогичного действия. Параллельно каждой опытной серии ставили 3 контроля. Первый контроль – только культура клеток в среде без помещения на нее исследуемого материала. Второй контроль - культуральная среда и помещенный в нее материал. Третий контроль – культуральная среда без изучаемого объекта.

Результаты комплексного исследования показали, что при помещении лиофилизированной спонгиозы на монослой фибробластов отсутствует повреждение клеток и наблюдается их адгезия. Установлено повышение коллагенсинтетической функции фибробластов в этих условиях в 5 раз по сравнению с контролем.

Выполнены исследования брефоостеоматрикса (БОМ), который получают из незрелой костной ткани плодов человека (18 – 22 недель гестации) путем ее деминерализации в слабых растворах HCl кислоты. Этот материал исходно отличается от других видов костной ткани белковым спектром.

Уже через 2 часа после его имплантации на монослой культуры фибробластов четко видны 3 зоны. В непосредственной близости от образца происходит гибель клеток, затем следует зона низкой плотности, в отдаленной зоне плотность монослоя не изменяется.

К четвертым суткам эксперимента монослой полностью восстанавливается. В это же время отмечается значительное усиление пролиферации клеток. Показатели белковосвязанного оксипролина при экспозиции БОМ возрастают в 50 раз по сравнению с контролем и в 10 раз по сравнению со спонгиозой.

Исследования БОМ на культуре макрофагов, клеток предшествующих появлению фибробластов в ране, участвующих в экссудативной фазе воспаления, при помещении на них БОМ обнаружили выраженный хемотаксис клеток к «кислому» образцу БОМ, имеющему PH меньше 4. После нейтрализации материала такой картины не наблюдается. Эти факты дают объяснение быстрого рассасывания БОМ у животных и человека. В эксперименте in vivo (на кроликах, крысах, собаках и свиньях) ранее нами было установлено огромное скопление остеокластов вокруг БОМ, фагоцитирующих данный материал, чего не наблюдалось при имплантации других недеминерализованных костных препаратов (с нейтральным PH).

Наши исследования демонстрируют важность показателя PH изучаемого объекта в формировании клеточной реакции. «Кислые» средства повышают местный иммунитет.

Раскрыть механизм действия биогенных материалов на коллагенсинтезирующие клетки помогли наши исследования физиотерапевтических факторов (электромагнитные колебания низкой интенсивности - НЕМИ).

При определенных режимах НЕМИ часть клеток погибает, а оставшиеся начинают активно пролиферировать. Нами запатентован способ стимуляции роста фибробластов.

Механизм действия НЕМИ объясняется тем, что после гибели части клеток биологически активные вещества выходят в среду и стимулируют сохранившиеся клетки в культуре. Этот факт подтверждает аксиому: без альтерации нет регенерации. Но при этом воздействии (НЕМИ), в отличие от биогенных материалов, синтез коллагена дермальными фибробластами не увеличивается, а наоборот, снижается в 1,5 раза по сравнению с контролем, что является оптимальным при лечении ожогов. При воздействии НЭМИ не формируются грубые деформирующие рубцы. Это подтверждено нашими экспериментальными и клиническими исследованиями обожженных.

Испытания с использованием клеточных технологий «аллогенного гидроксиапата» серии «Лиопласт», имеющего щелочную реакцию, и синтетического гидроксиапатита с нейтральной реакцией, показали неодинаковый характер реакции клеток культуры на их имплантацию. Так при помещении нанокристаллического материала, представляющего собой комплекс из минерального компонента и небольшого количества органического вещества костной ткани, на монослой фибробластов наблюдается аналогичная картина эксперименту с брефоматриксом. Имела место гибель прилежащих к нему клеток. Но уже к четвертым суткам восстанавливалась плотность монослоя и резко возрастала пролиферативная активность фибробластов.

Напротив, при исследовании синтетического гидроксиапатита не отмечено ни повреждающего, ни стимулирующего его действия как на клетки, так и на синтез ими коллагена. В то время как при «аллогеннном гидроксиапатите» содержание белковосвязанного оксипролина в культуральной среде увеличивается в 5 раз, по сравнению с контролем и синтетическим ГАП.

Таким образом, разработанный нами алгоритм контроля качества биоимплантатов и других медицинских средств с помощью культур клеток, позволяет параллельно вести анализ их безопасности и биологической эффективности. Примененный комплексный подход, заключающийся в исследовании состояния клеток монослоя и содержания продуктов жизнедеятельности клеток в культуральной среде, дает возможность оценки пролиферативной активности клеток и их синтетической функции в измененных условиях.