

Реакция тканей кожи на синтетический материал «ТИОПРОСТ», разработанный для использования в тканевой инженерии

А.А. Руднева¹, А.В. Сахаров¹, А.А. Макеев¹, А.Е. Просенко¹, С.Н. Луканина¹, Е.И. Рябчикова²

¹ Новосибирский государственный педагогический университет, Новосибирск

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Skin Tissue Responses to an Artificial Material TIOPROST Developed for Use in Tissue Engineering

A.A. Rudneva¹, A.V. Sakharov¹, A.A. Makeev¹, A.E. Prosenko¹, S.N. Lukanina¹, E.I. Ryabchikova²

¹ The Institute of Antioxidant Chemistry, Novosibirsk State Pedagogical Institute, Novosibirsk

² The Laboratory of Biochemistry of Nucleic Acids, the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk

Исследовали реакцию тканей кожи на имплантацию синтетического материала «ТИОПРОСТ» на 150 мышах-самцах методами морфогистохимического анализа. Материал не вызывает заметной воспалительной реакции окружающей ткани на протяжении 3–40 сут. и способствует заживлению раневого дефекта. Пористая структура и химические свойства материала обеспечивают формирование каркаса для роста сосудов внутри имплантата, модулируют процесс воспаления и оказывают направленное влияние на дифференцировку клеток фибробластического дифферона. Матрица на основе материала «ТИОПРОСТ» выполняет объем дефекта и способствует активному выселению низкодифференцированных клеток-предшественников из стволовых ниш, их пролиферации и дифференцировке. Полученные результаты позволяют рекомендовать «ТИОПРОСТ» для использования в качестве остеопластического материала и носителя клеток при разработке тканеинженерных конструкций.

Ключевые слова: тканевая инженерия, имплантация, дерма кожи, воспаление.

Восстановление дефектов костной ткани, возникающих в результате травм, хирургического лечения опухолей и воспалительно-дегенеративных заболеваний альвеолярного отростка нижней челюсти остается одной из наиболее серьезных проблем челюстно-лицевой хирургии [1–5]. Наиболее перспективные подходы к восстановлению обширных дефектов костной ткани основываются на достижениях тканевой инженерии [1, 6], ключевым аспектом которой является получение имплантатов-носителей с заданными свойствами, в частности, способностью оказывать селективное действие на клетки тканей реципиента, индуцируя миграцию остеогенных клеток-предшественников из стволовых компартментов, их пролиферацию и дифференцировку [1, 3, 5, 7, 8]. Разработанный на основе антиоксиданта нового поколения синтетический материал «ТИОПРОСТ» имеет пористую структуру и обеспечивает инактивацию свободнорадикальных соединений, образующихся в результате посттравматической гипоксии и «кислородного» взрыва нейтрофилов, а также вступает в реакции разложения высокотоксичных гидроперекисей в области формирующегося регенерата и ложа костного дефекта.

Реакция клеток тканей кожи реципиента, соприкасающихся с имплантатом, является одним из критериев оценки свойств новых биоматериалов, применяемых в тканевой инженерии [9–11]. Целью данного исследования являлось изучение реакции тканей кожи мышей

Skin tissue reaction to implantation of synthetic material «TIOPROST» have been examined in 150 mice by morpho-histochemical analysis. Fast wound healing and absence of appreciable inflammatory reaction were observed in tissues surrounding the material during 3–40 days post implantation. The porous structure and chemical properties of the material modulated development of inflammation and provided formation of «a scaffold» for vessel growth inside the implant. Our study showed that the matrix based on «TIOPROST» is capable to fill in volume defects, to improve differentiation of fibroblastic cells, and to induce active migration of low-differentiated cells from stem cell niches, their proliferation and differentiation. The elaborated synthetic material «TIOPROST» can serve as osteoplastic material and the carrier of cells for development of tissue engineering constructions.

Key words: tissue engineering, implantation, skin derma, inflammation.

на имплантацию материала «ТИОПРОСТ», который может быть использован в качестве остеопластического материала и носителя клеток при разработке тканеинженерных конструкций, а также оценка интенсивности его биodeградации и васкуляризации.

Материал и методы

Синтетический материал «ТИОПРОСТ» разработан в НИИ химии антиоксидантов на основе полифункционального серосодержащего антиоксиданта тиофана для замещения дефектов костной ткани [12, 13]. «ТИОПРОСТ» способен направленно изменять свои физико-химические свойства от гелеобразного до состояния твердого кристаллического вещества в течение 15–18 мин при температуре 20–21°C [14]. Контролируемый процесс кристаллизации материала позволяет создавать пористо-ячеистую структуру, обеспечивая тем самым искусственное воссоздание аналога костных ячеек с возможностью их васкуляризации и заселения клетками.

Исследование местной реакции тканей кожи на остеопластический материал «ТИОПРОСТ» проводили на мышах-самцах линии ICR массой 35 г в соответствии со стандартами серии ГОСТ Р ИСО 10993 «Оценка биологического действия медицинских изделий». Все манипуляции на животных осуществляли под хлороформным наркозом с соблюдением правил асептики и антисептики, в соответствии с международными принципами

e-mail: asakharov142@rambler.ru

Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным. Было сформировано 3 группы животных ($n = 50$): интактная, контрольная и опытная. Мышам опытной и контрольной групп под ингаляционным наркозом по средней линии спины наносили полнослойную рану кожи длиной 2 см. Браншами хирургических ножниц формировали карман, основание которого располагали на глубину 10 мм от линии разреза. Животным опытной группы в полученный карман вводили пластину синтетического материала «ТИОПРОСТ» овальной формы диаметром 5 мм и толщиной 1 мм с последующим ушиванием раны. Мышам контрольной группы рану оставляли свободной и ушивали шелком. С мышами интактной группы хирургических манипуляций не производилось, они содержались в стандартных условиях вивария. Индивидуальное наблюдение за животными велось в течение всего периода исследования. Животных всех групп по 10 особей из каждой выводили из эксперимента путем передозировки ингаляционного наркоза на 3, 7, 14, 30 и 40-е сут. после операции.

Реакцию тканей кожи мышей оценивали методами морфогистохимического анализа. Для проведения гистологических исследований вырезанные блоки ткани фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, проводили по стандартной методике и заливали в парафин. Для изучения общей морфологической картины срезы толщиной 3–5 мкм окрашивали гематоксилином Бёмера и эозином. Распределение суммарных кислых гликозаминогликанов (ГАГ) в межклеточном веществе дермы и гиподермы оценивали в реакции с альциановым синим по Сиддмену. Состояние коллагеновых волокон определяли реакцией по Маллори. Процентное содержание клеток воспалительного инфильтрата в тканях кожи мышей определяли на гистологических препаратах при увеличении $\times 400$.

Результаты исследования и их обсуждение

Светооптическое исследование образцов кожи животных контрольной группы на 3 сут. наблюдения выявило отчетливо сформированный дефект (рис. 1А), ограниченный от окружающих тканей лейкоцитарным валом и представленный клетками воспаления и тканевым детритом. Среди клеток воспалительного инфильтрата преобладали сегментоядерные нейтрофилы, выявлялись моноциты, единичные лимфоциты и макрофаги. На периферии и в центре раны отмечались отложения фибрина, признаки деструкции межклеточного вещества дермы (см. рис. 1А), особенно хорошо заметные при постановке

реакции на суммарные кислые ГАГ. Снижалась интенсивность реакции основного вещества дермы и нарушалась локализация ГАГ по отношению к волокнистым компонентам межклеточного вещества (рис. 1Б) в сравнении с образцами кожи животных интактной группы (рис. 1В). Коллагеновые волокна дермы фрагментированы, теряют характерную для нормы петлистую структуру (рис. 1Г). Кровеносные капилляры дермы и гиподермы в области демаркационного вала имели признаки деструкции и склероза. В периваскулярном пространстве определялись разрушенные эритроциты.

В образцах кожи мышей опытной группы на 3 сут. наблюдения ложе вокруг имплантированного материала «ТИОПРОСТ» характеризуется более интенсивным окрашиванием межклеточного вещества, чем окружающие имплантат ткани кожи (рис. 1Д). В отличие от соответствующих образцов кожи мышей контрольной группы, демаркационный вал вокруг имплантата отсутствовал. В дерме и гиподерме преобладали макрофаги и моноциты. Содержание нейтрофилов и лимфоцитов достоверно ниже соответствующих показателей образцов кожи мышей контрольной группы (таблица). Отсутствие демаркационного вала, ограничивающего поврежденную ткань, а также низкое содержание нейтрофилов в тканях регенерата свидетельствует, по данным О.Д. Мяделец (2006), об «экономной и рациональной реакции» со стороны дифферона нейтрофильных лейкоцитов на исследуемый материал «ТИОПРОСТ». Морфологическое исследование показывает, что имплантат ограничен от дермы и гиподермы умеренно альциан-позитивным основным веществом (рис. 1Е) и тонкими коллагеновыми волокнами (рис. 1Ж). Архитектоника волокнистых компонентов межклеточного вещества и тинкториальные свойства основного вещества тканей кожи не имеют выраженных отличий от соответствующих образцов кожи интактных животных (рис. 1З).

На гистологических препаратах материал «ТИОПРОСТ» определяется в виде оптически прозрачных полостей неправильной формы (рис. 1И). Это обусловлено его растворением в абсолютном спирте при проведении необходимой для морфологического анализа обработки материала. Поры имплантата анастомозируют между собой и образуют каналы, которые пронизывают имплантат под разными углами (см. рис. 1И). Внутреннее пространство каналов заполнено умеренно базофильным гомогенным содержимым, малодифференцированными фибробластами, а также клетками крови (единичными эритроцитами, нейтрофилами и моноцитами).

Цитограмма тканей кожи мышей после имплантации материала «ТИОПРОСТ» и группы сравнения

Клеточный состав в %	3 сут.		7 сут.		14 сут.		30 сут.	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
Нейтрофилы	88,18±18,22	15,01±2,05***	43,83±9,25	16,67±3,07*	25,24±4,05	11,35±2,76*	13,53±4,06	8,27±1,16
Эозинофилы	1,65±0,3	2,50±0,2*	2,84±0,27	1,97±0,15*	4,27±1,05	1,23±0,06**	1,94±0,53	1,15±0,26
Лимфоциты	5,24±1,1	1,25±0,08**	6,35±0,98	6,67±1,17	18,43±1,45	13,04±1,91*	3,94±1,42	2,15±0,5
Моноциты	3,17±0,88	27,24±4,76***	5,98±0,09	10,15±1,95*	5,26±0,45	8,69±1,31*	5,88±0,5	5,38±0,17
Макрофаги	0,53±0,01	42,74±7,12***	7,85±2,83	33,02±8,23**	12,63±1,28	21,74±3,31*	14,71±2,69	38,67±8,94*
Фибробласты	0,26±0,01	10,08±3,62*	17,45±1,54	23,33±2,04*	18,03±1,28	30,43±4,09**	29,41±2,71	32,82±7,42**
Фиброциты	0,97±0,03	1,18±0,07*	15,70±3,07	8,19±1,16*	16,14±2,28	13,52±3,08	30,59±4,82	11,56±2,42**

Примечание: Различия между показателями внутри групп достоверны (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

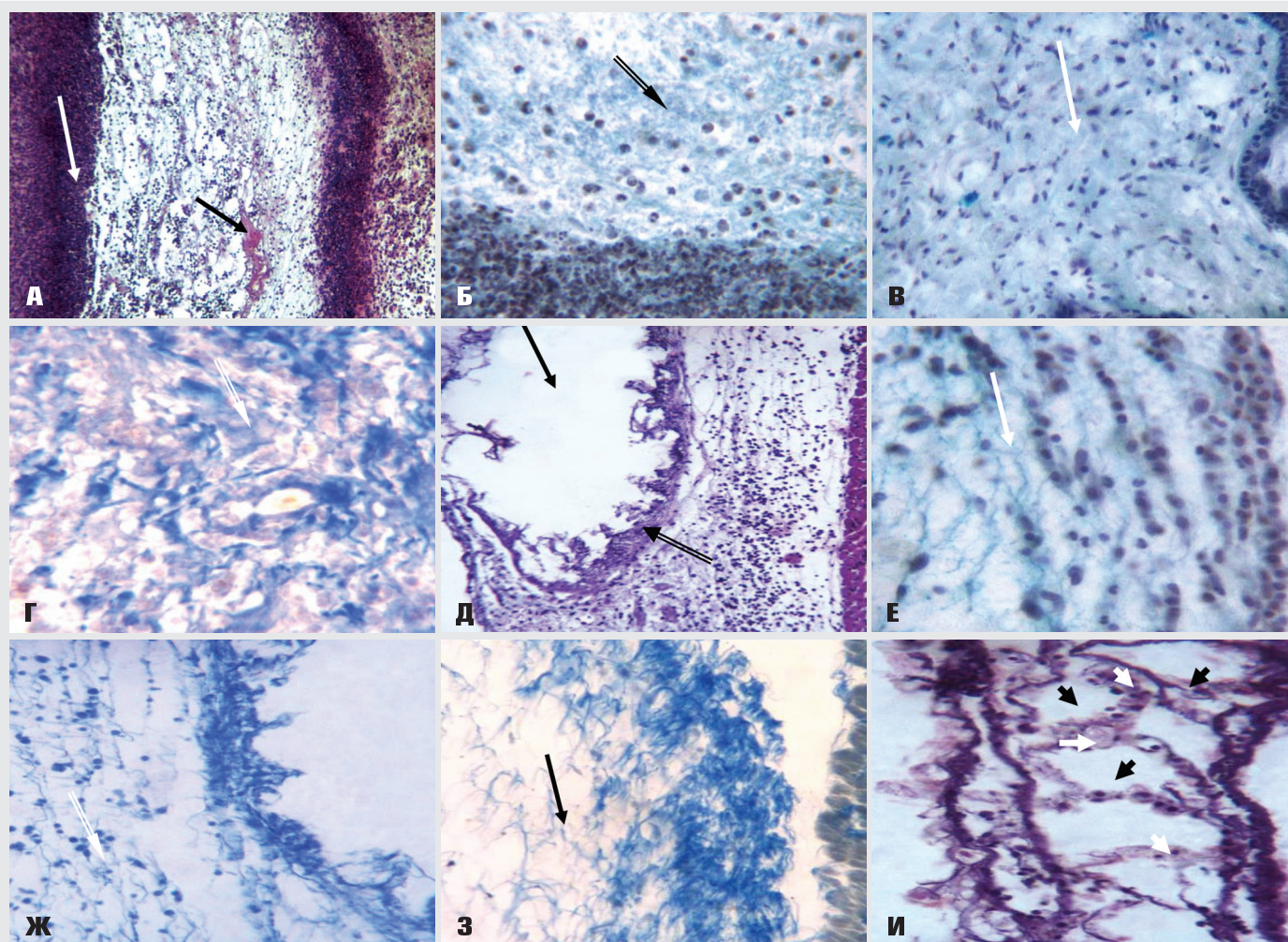


Рис. 1. Реакция тканей кожи мышей на материал «ТИОПРОСТ», 3-и сут. после подкожной имплантации: А, Б, Г – рана кожи мышей контрольной группы. Светлая стрелка – демаркационный вал; темная – фибрин; двойная темная стрелка – кислые ГАГ; двойная светлая стрелка – коллагеновые волокна. В, З – ткани кожи мышей интактной группы. Светлая стрелка – реакция на кислые ГАГ; темная – коллагеновые волокна. Д, Е, Ж, И – реакция тканей кожи мышей на имплантат. Темная стрелка – имплантат; двойная темная – ложе вокруг имплантата; светлая – кислые ГАГ; двойная светлая – коллагеновые волокна; светлая головка стрелки – каналы внутри имплантата; темная – материал «ТИОПРОСТ». Окраска: А, Д, И – гематоксилин и эозин; Б, В, Е – альциановый синий; Г, Ж, З – по Маллори. Ув.: А, Д – $\times 100$; Б, В, Ж, З, И – $\times 200$; Г, Е – $\times 400$

Через 7 сут. после операции имплантат ограничен от окружающей ткани рыхло расположенными тонкими извитыми коллагеновыми волокнами (рис. 2А). В отличие от образцов кожи животных контрольной группы в окружающей имплантат ткани наблюдается невысокое содержание нейтрофилов и эозинофилов, а также регистрируется повышение процентного содержания макрофагов и фибробластов (см. таблицу). Макрофаги представлены крупными клетками с короткими отростками и интенсивно базофильной цитоплазмой, на их периферии, в области отростков, отмечается усиление интенсивности базофильного окрашивания, и регистрируются многочисленные мелкие оптически прозрачные вакуоли. Указанные морфологические признаки говорят о высокой функциональной активности макрофагов. Повышение активности макрофагов на 7-е сут. после подкожной имплантации синтетического материала «ТИОПРОСТ» может быть связано с началом процессов его биodeградации. Активный синтез кислых ГАГ фибробластами в области ложа имплантата, а также в по-

лости каналов, образуемых порами материала «ТИОПРОСТ» (рис. 2Б), может свидетельствовать об избирательном влиянии компонентов материала в данный период времени на дифференцировку фибробластов. У мышей контрольной группы на 7-е сут. после операции реакция кожи на повреждение характеризуется более интенсивным воспалением и задержкой регенерации, в области раны локализуется молодая грануляционная ткань с большим количеством сосудов, высоким содержанием нейтрофилов и малодифференцированных фибробластов.

Наблюдаемое к 7-м сут. отсутствие выраженных признаков воспаления и фиброза тканей в области ложа имплантата свидетельствует о биосовместимости материала «ТИОПРОСТ» с тканями кожи. Отмечается миграция фибробластов в полость пор материала и активный синтез данными клетками ГАГ и коллагена. Можно полагать, что под влиянием компонентов, входящих в состав материала «ТИОПРОСТ», осуществляется регуляция синтеза коллагеновых волокон фибробластами

и сборки макромолекулярных агрегатов протеогликанов. Сопряжение синтеза коллагена и протеогликанов фибробластами способствует формированию органотипического регенерата на периферии имплантата.

К 14-м сут. имплантат отграничен от окружающей ткани тонкими коллагеновыми волокнами, расположенными параллельно его поверхности. Не обнаружено признаков формирования фиброзной капсулы вокруг имплантированного материала «ТИОПРОСТ» во всех исследованных образцах, полученных от мышей опытной группы. Соединительная ткань, образующая ложе имплантата (рис. 2В), имеет различную степень зрелости. В ткани, прилежащей к имплантату, выявляется большое количество тонких коллагеновых волокон, вокруг которых отмечается умеренная реакция на кислые ГАГ. За ней располагается более зрелая соединительная

ткань, содержащая преимущественно фиброциты и более плотно расположенные коллагеновые волокна. Основное вещество хорошо выражено, локализуется между волокнами и характеризуется интенсивной реакцией на кислые ГАГ. Отсутствие оформленной фиброзной капсулы вокруг имплантата, а также низкое содержание в соединительной ткани ложа нейтрофильных лейкоцитов и лимфоцитов (см. таблицу) свидетельствуют о биосовместимости имплантата и влиянии материала «ТИОПРОСТ» не только на активность клеток воспаления, но и клеток фибробластического и моноцитарного дифференции. Одним из уникальных свойств материала «ТИОПРОСТ» является отсутствие признаков воспалительной инфильтрации тканей кожи вокруг имплантата на фоне его интенсивной деградации, осуществляющейся за счет функциональной активности макрофагов,

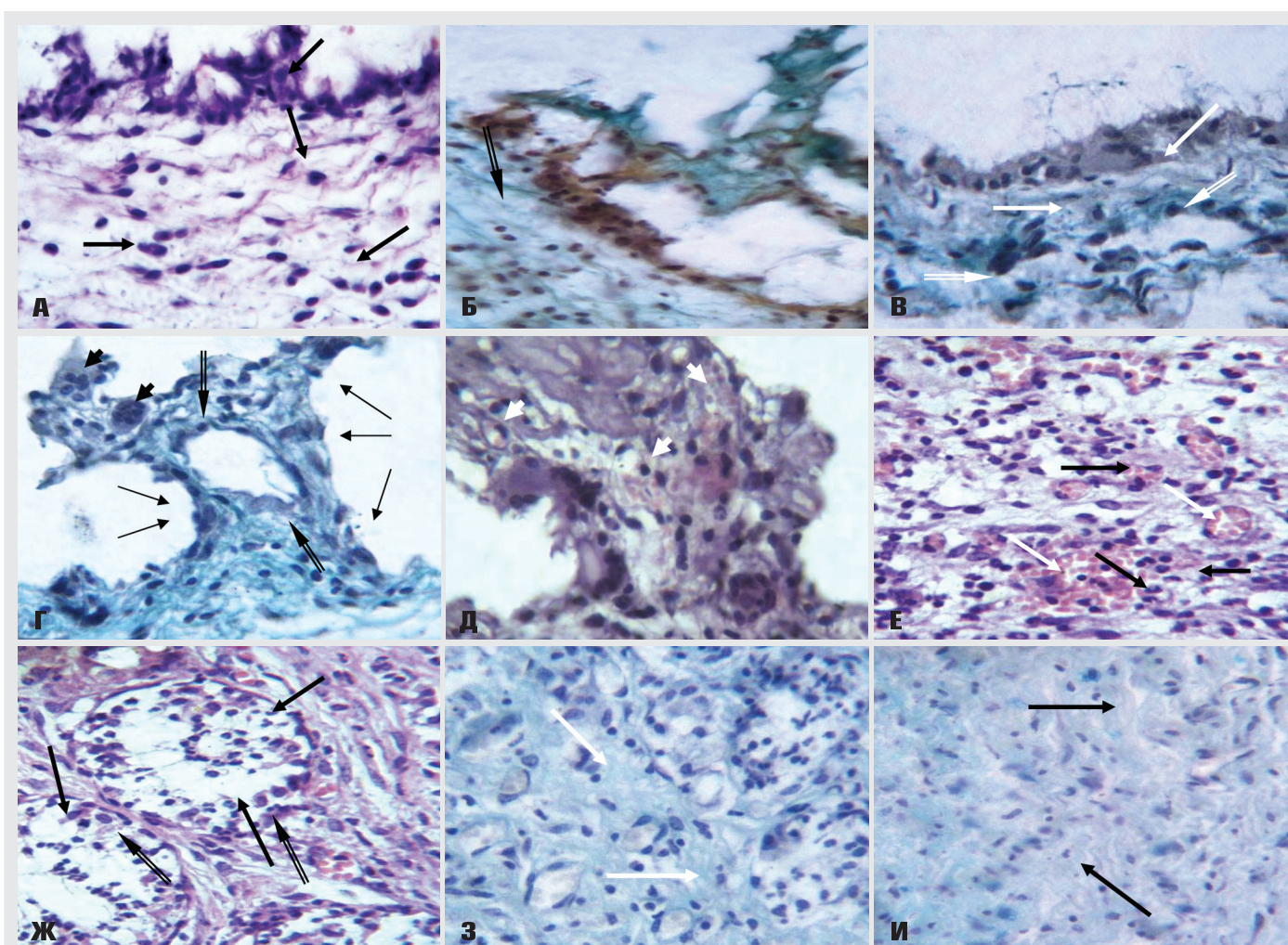


Рис. 2. Реакция тканей кожи мышей на материал «ТИОПРОСТ»:

А, Б – структура ложа вокруг имплантата через 7 сут. после подкожной имплантации.

Темная стрелка – фибробласты; двойная темная – кислые ГАГ;

В, Г, Д – реакция тканей кожи мышей на имплантат через 14 сут. Светлая стрелка – молодая соединительная ткань; двойная светлая – зрелая соединительная ткань; темная стрелка – локализация материала «ТИОПРОСТ»; двойная темная – поры, выполненные соединительной тканью; темной головкой стрелки обозначены гигантские многоядерные клетки, светлой – кровеносные сосуды.

Е – рана кожи мыши контрольной группы, 14-е сут. наблюдения. Темной стрелкой обозначены клетки воспаления, светлой – кровеносные сосуды.

Ж, З – реакция тканей кожи мышей на имплантат, 30 сут. после имплантации. Темная стрелка – участки деградации материала «ТИОПРОСТ»; двойная темная – макрофаг; светлая – кислые ГАГ.

И – кожа мыши интактной группы. Темная стрелка – реакция на кислые ГАГ.

Окраска: А, Д, Е, Ж – гематоксилин и эозин; Б, В, Г, З, И – альциановый синий.

Ув.: А, В, Д, Е, З, И – $\times 400$; Б, Г, Ж – $\times 200$

среди которых определяются гигантские многоядерные клетки (рис. 2Г). Важно отметить, что эти клетки регистрируются лишь на участках соприкосновения ткани с имплантируемым материалом, где отчетливо видно, что в результате их взаимодействия происходит разрушение материала, а имплантат имеет неровные контуры. Этот процесс напоминает резорбцию костной ткани остеокластами. Именно на 14-е сут. приходится пик деградации материала «ТИОПРОСТ», и регистрируется активный рост кровеносных сосудов через его поры (рис. 2Д).

Таким образом, имплантация материала «ТИОПРОСТ» не вызывает развития выраженной воспалительной реакции в окружающей ткани, наблюдаемой в коже животных контрольной группы (рис. 2Е). Образцы кожи мышей контрольной группы характеризуются наличием созревающей грануляционной ткани с высокой степенью васкуляризации и большим количеством клеток, среди которых, кроме фибробластов, фиброцитов и макрофагов, определяется высокое содержание нейтрофилов, эозинофилов и лимфоцитов (см. таблицу). Отличительным признаком образцов кожи мышей контрольной группы на 14-е сут. наблюдения является снижение числа фибробластов и увеличение содержания фиброцитов, сопровождающееся формированием в дерме грубоволокнистого рубца.

Через 30 сут. после подкожной имплантации материала «ТИОПРОСТ» наблюдается его активная деградация за счет увеличения функциональной активности макрофагов. Этот процесс приводит к расширению пор материала и заполнению их молодой грануляционной тканью с признаками активной васкуляризации. В составе ткани преобладают активные фибробласты и макрофаги (рис. 2Ж). Следует отметить, что в исследуемый период времени среди клеток соединительной ткани, окружающей трансплантат, регистрируются нейтрофилы и моноциты, содержание которых достоверно не различается с контрольными образцами. Важно, что архитектура коллагеновых волокон, а также тинкториальные свойства основного вещества при постановке

реакции на кислые ГАГ в исследуемых образцах кожи мышей опытной группы (рис. 2З) не имеют выраженных различий с образцами кожи животных интактной группы (рис. 2И). В образцах кожи животных контрольной группы к 30-м сут. процесс репарации завершается формированием рубцовой ткани, среди клеток которой отмечаются многочисленные клетки воспаления (см. таблицу).

На 40-е сутки наблюдения в тканях кожи материал «ТИОПРОСТ» не идентифицируется, а структура тканей кожи не имеет отличий от аналогичных образцов кожи мышей интактной группы. У мышей контрольной группы репарация дермы завершается формированием рубца.

Результаты проведенного исследования реакции тканей кожи мышей на разработанный для использования в тканевой инженерии синтетический материал «ТИОПРОСТ» показывают, что данный материал не вызывает заметной воспалительной реакции окружающей ткани и способствует заживлению раны. Можно предположить, что поверхность данного материала несет специфические молекулярные сигналы для окружающих его клеток кожи, обеспечивающие сопряжение процессов воспаления и репарации на участке контакта тканей и имплантата. При подкожной имплантации вокруг материала «ТИОПРОСТ» уже на 3-и сут. появляются макрофаги и фибробласты, что свидетельствует о быстром переходе процесса воспаления в процесс репарации.

Химические свойства разработанного материала и его пористая структура обеспечивают формирование каркаса для роста сосудов внутри имплантата, модулируют развитие стадий воспаления и оказывают направленное влияние на дифференцировку клеток фибробластического дифферона, и опосредуют развитие восстановительных процессов в тканях кожи в направлении органотипической регенерации.

Результаты изучения реакции тканей кожи мышей на имплантат позволяют заключить, что материал «ТИОПРОСТ» способен полностью заполнять объем дефекта и может быть рекомендован для использования при разработке тканеинженерных конструкций.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Панасюк А.Ф., Ларионов Е.В. Биоматериалы для тканевой инженерии и хирургической стоматологии. Клиническая стоматология, 2004; 1(1): 44–46.
2. Григорьянц Л.А., Сирак С.В., Слетов А.А. и соавт. Эффективность использования композиционных остеопластических материалов для пластики костных дефектов челюстей. Стоматология, спецвыпуск 2007; 60–64.
3. Hollister S.J., Lin C.Y., Saito E. et al. Engineering craniofacial scaffolds. Orthod. Craniofac. Res. 2005; 8(3): 162–73.
4. Arevalo-Silva C.A., Eavay R.D., Cao Y. et al. Internal support of tissue-engineered cartilage. Arch. Otolaryngol. Head. Neck. Surg. 2000; 126(12): 1448–52.
5. Burg K.J.L., Porter S., Kellam J.F. Biomaterials development for bone tissue engineering. Biomaterials 2000; 21: 2347–59.
6. Волков А.В. Тканевая инженерия: новые перспективы развития медицины. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2005; 1: 57–63.
7. Слуцкий Л., Ветра Я. Биологические вопросы материаловедения (к проблеме реактогенности биоматериалов). 2001. Рига: Латвийская мед. академия: 150.
8. Temenoff JS, Mikos AG. Injectable biodegradable materials for orthopaedic tissue engineering. Biomaterials 2000; 21: 2405–12.
9. Панин А.М., Иванов С.Ю., Нури Фарзин и соавт. Морфологическое изучение тканевой реакции на подкожную имплантацию

биоматериалов. Биомедицинские технологии (Репродукция тканей и биопротезирование). 2002; 18: 64–75.

10. Воложин А.И., Григорян А.С., Виноградова О.Д., Бабахин А.А. Тканевая реакция на подкожное введение стоматологических акриловых пластмасс при atopической аллергии в эксперименте. Биомедицинские технологии (Репродукция тканей и биопротезирование), 2004; 23: 34–46.

11. Мусина Л.А., Муслимов С.А., Лебедева А.И., Зыков О.В. Роль макрофагов в регенерации соединительной ткани при имплантации биоматериалов. Актуальные вопросы патологии. Здравоохранение Башкортостана, 2004; 4: 146–49.

12. Агеев А.С., Зайдман А.М., Сысолятин П.Г. Сравнительная характеристика регенераторных процессов в костной ткани нижней челюсти при использовании коллапана и тифана. Сибирский консилиум, 2006; 52(5): 109–13.

13. Жуков Д.В., Зайдман А.М., Прохоренко В.М. Оптимизация репаративной регенерации костной ткани и реакции лимфатических узлов при введении препаратов плазмарал и тифан. Хирургия, морфология, лимфология, 2006; 3(5): 40–43.

14. Руднева А.А., Сахаров А.В., Макеев А.А., Просенко А.Е. Разработка нового остеопластического материала на основе антиоксиданта тифана. Кислород и антиоксиданты, 2009; 1: 99–101.

15. Мяделец О.Д. Морфофункциональная дерматология. — М.: Медлит, 2006. — 752 с.

Поступила 30.11.2009