

Изучение биосовместимости полимерных материалов (полиметилметакрилат и бисфенол-А-диглицидилметакрилат) на модели культуры клеток стромы роговицы

С.А. Борзенок^{1, 2}, Б.Э. Малюгин¹, С.Б. Измайлова¹, Е.П. Поручикова¹, И.А. Попов¹, Д.С. Островский^{1, 3}

¹ ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Москва;

² МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва;

³ НИИ патологии и патофизиологии РАН, Москва

РЕФЕРАТ

Цель. Определить пролиферативную активность клеток стромы роговицы (КСР) донора трупа в присутствии полимерных материалов (полиметилметакрилата (ПММА), бисфенол-А-глицидилметакрилата (бис-ГМА)) в условиях клеточной культуры (in vitro).

Материал и методы. Работа основана на методе клеточного культивирования клеток стромы роговицы доноров-трупов в условиях нормотермии. В качестве объекта исследования были взяты образцы полимерных материалов бис-ГМА, предоставленные ООО «Репер-НН» (г. Нижний Новгород) (группы 1-4), и ПММА, предоставленные ЭТП «МНТК» (г. Москва) (группа 5). В контрольной группе полимерный материал не использовали (группа 6). Использовалась культура КСР, соответствующая 7-му пассажу, сроки культивации составили 7 дней. Культивирование проводилось в условиях нормотермического культивирования с использованием стандартной ростовой среды DMEM/F12 с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотиков. Смена ростовой среды проводилась каждые 3 дня. КСР ежедневно извлекали из 4 лунок каждой группы, подсчитывали и оценивали динамику пролиферации с применением статистического критерия Вилкоксона.

Офтальмохирургия. – 2016. – № 4. – С. 16–19.

Результаты. В первый день наблюдения статистически достоверной разницы в уровне пролиферации между группами наблюдения выявлено не было. К концу срока наблюдения выявлена статистически достоверная разница между уровнями пролиферации кератоцитов в присутствии исследуемых образцов. По интенсивности пролиферации материалы располагались следующим образом (в порядке снижения признака): (контроль, К5) > К1 > (К3, К4) > К2. Между материалами К3 и К4 статистически достоверной разницы выявлено не было ($p > 0,05$).

Заключение. Среди изученных нами материалов в наименьшей степени пролиферации клеток стромы роговицы способствовал материал группы 2, наиболее способствующий – материал группы 5, остальные материалы (группы 1, 3, 4) не проявили однозначной тенденции по отношению к пролиферации КСР.

Ключевые слова: роговица, полиметилметакрилат, бисфенол-А-диглицидилметакрилат, полимеры, биосовместимость, кератоциты. ■

Авторы не имеют финансовых или имущественных интересов в упомянутых материале и методах.

ABSTRACT

The research of biocompatibility of polymeric materials (poly-methyl-meth-acrylate and bisphenol-A-diglycedyl-meth-acrylate) in a corneal stroma cell culture model

S.A. Borzenok^{1, 2}, B.E. Malyugin¹, S.B. Izmaylova¹, E.P. Poruchikova¹, I.A. Popov¹, D.S. Ostrovsky^{1, 3}

¹ The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow;

² The A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow;

³ The Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow

Purpose. To evaluate a proliferative activity of cadaver donor corneal stromal cells (CSCs) in contact with the polymers poly-methyl-meth-acrylate (PMMA) and bisphenol-A-di-glycidyl-meth-acrylate (bis-GMA) in the cell culture (in vitro).

Material and methods. The study was based on the method of cell culture of corneal stromal cells (CSCs) of cadaver donors under conditions of normothermia. Polymer samples served as objects of the research. There were 4 distinct modifications of bis-GMA, produced by the Reper-NN (Nizhniy Novgorod (the experimental groups K1-K4), and one of PMMA, produced by the ETP FEMI (Moscow)(the group K5). In the control group (the group K6) the polymer sample was not used. Cadaver donor

CSCs suspension of the 7th passage was added over the samples (20000 cells in 2mL of culture medium per sample) and then cultured during 7 days within the wells of standard culture 24-well plates (a sample per well) in the standard normothermic conditions using the DMEM/F12 culture medium supplemented with fetal bovine serum and antibiotics mix.

The culture medium was replaced every 3rd day. The main subject of the research was the CSCs proliferation degree evaluation. Cells were extracted from the 4 wells of each group daily and were counted. The Wilcoxon test was used for a statistical significance evaluation.

Results. On the first day of observation no statistically significant difference in the level of proliferation degree between the groups

was found. A statistically significant difference between the levels of keratocytes proliferation was revealed in the presence of test samples by the end of the observation period. Proliferation intensity rates were in order of the symptom diminishing as follows: (control, K5) >K1>(K3,K4)>K2. There was detected no significant difference between groups K3 and K4 ($p>0.05$).

Conclusion. Among the investigated materials the polymer K2 had the lowest proliferation-inducing properties; K5 had the highest

and others (K1, K3, K4) did not show an unambiguous tendency to the proliferation induction.

Key words: *cornea, poly-methyl-meth-acrylate, bisphenol-A-di-glycidyl-meth-acrylate, polymers, biocompatibility, keratocyte.* ■

The research was sponsored by the Russian Fund of Fundamental Research (RFFR), research grant No. 15-29-03882.

No author has a financial or proprietary interest in any material or method mentioned.

The Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery.- 2016.- No. 4.- P. 16-19.

Современная хирургия патологии роговицы во многом связана с использованием различных полимерных имплантов, выполняющих оптические и каркасные функции (интрастромальные роговичные сегменты, кератопротезы и др.). Критерии отбора для полимера одинаковы: высокая биосовместимость, как следствие низкая токсичность, стабильность состояния на протяжении длительного времени пребывания в тканях глаза.

Наиболее широкое распространение получил полиметилметакрилат (ПММА) [6, 8]. С учетом своей высокой прочности и стабильности он стал основой для первых интраокулярных линз. Позднее по мере развития офтальмохирургии ПММА занял устойчивые позиции в сфере хирургии патологии роговицы в качестве основы для выполнения стромальных имплантов (роговичные сегменты, интрастромальные линзы инлай, линзы для проведения интраламеллярной кератопластики) [2-4].

Производство имплантов из ПММА всегда содержит в себе несколько этапов: первично осуществляют получение полимера из смеси мономера с последующей его физической обработкой (точение, формование) для получения конечного продукта. Эти этапы чаще всего разнесены во времени и месте, ввиду чего всегда остается риск инфицирования и внесения дополнительных «компонентов» (молекул, инородных тел и т.п.). Немаловажным является аспект возможности получения сложных форм имплантов для решения определенных конструктивных задач, что не всегда может быть осуществлено вышеописанными методами [5].

Принципиально отличающимся способом получения готовых полимерных изделий является технология

фотополиграфии, сутью которой является одностадийность процесса: одномоментное получение полимера и готового изделия [5]. Дополнительным плюсом такого способа получения искомого изделия является возможность получения сложных форм (сверхмалые формы изделия, нестандартные профили и т.д.).

Учитывая вышесказанное, актуальным остается вопрос выбора полимерных материалов для производства интрастромальных имплантов, использующихся в лечении различных патологических состояний роговицы. В качестве исследуемого материала для производства интрастромальных имплантов нами был выбран бисфено-А-диглицидилметаритал (бис-ГМА) – полимер, активно использующийся в последнее время в стоматологической практике и зарекомендовавший себя низкотоксичным и высоко стабильным при длительном нахождении в достаточно агрессивной среде [14]. Выбор этого полимера также обусловлен доступностью использовать его в качестве мономерной основы для реакции фотополиграфии, которая, на наш взгляд, является более перспективной в плане производственных возможностей ввиду своей одноэтапности и с учетом потенциальной возможности выполнять сложные конструктивные формы имплантов.

ЦЕЛЬ

Определить пролиферативную активность клеток стромы роговицы

(КСР) донора-трупа в присутствии полимерных материалов (полиметилметакрилата (ПММА), бисфенол-А-глицидилметакрилата (бис-ГМА)) в условиях клеточной культуры (in vitro).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе исследовались свойства образцов полимерных материалов ПММА и бис-ГМА, предоставленные ООО «НЭП МНТК «МГ» и ООО «Репер-НН» соответственно. Образцы из различных полимеров физически представляли собой бесцветные прозрачные «таблетки» диаметром 10 мм и высотой 0,5 мм (рис. 1).

Образцы бис-ГМА были предоставлены четырьмя партиями (условные группы 1, 2, 3, 4) по 24 штуки в партии (всего 96 образцов). Образцы ПММА были предоставлены одной партией (24 штуки, группа 5). Группы 1-5 составили экспериментальные группы, в контрольной группе никакой полимерный материал не использовался.

Предоставленные образцы материалов выдерживали в клеточной in vitro культуре клеток стромы роговицы (КСР) 7-го пассажа в течение 2-7 дней.

В качестве источника КСР использовали корнеосклеральные диски доноров-трупов диаметром 16 мм, выкраиваемые из донорских глазных яблок в условиях работы Глазного банка МНТК «МГ» с соблюдением всех действующих процедур и в рамках законодательства РФ [1].

Для корреспонденции:

Малюгин Борис Эдуардович, докт. мед. наук, профессор, зам. ген. директора по научной работе ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России
E-mail: malyugin@mntk.ru



Рис. 1. Схема единичного образца испытываемых материалов

Трупные донорские глаза отбирались по ряду критериев:

- средний возраст доноров – до 50 лет,
- время от момента смерти донора до начала экспериментальных исследований и консервации – не более 16-ти часов,
- показатели адреналиновой пробы по Борзенку С.А. – не ниже В [1],
- значения морфологического показателя трансплантатности роговицы по классификации Борзенка С.А. – 2 и 3 [1].

Выделение КСР человека выполняли по следующей технологии: при помощи шпателя-скребок с задней поверхности корнеосклерального диска удаляли эндотелий и десцеметову мембрану, лезвием отсекали от стромального фрагмента лимбально-склеральную часть. Полученный фрагмент ферментативно дезагрегировали в растворе коллагеназы II типа концентрации 1 мг/мл (MPBiomedicals, LLC, США), разведенном в среде Игла в модификации Дульбекко в смеси со средой Хэма F12 (1:1; DMEM/F12), с добавлением смеси антибиотиков (пенициллин 10000 МЕ/мл, стрептомицин 10000 мкг/мл, амфотерицин 25 мкг/мл, MPBiomedicals, LLC, США) в стандартных условиях (+37° С, 5% CO₂, 100% влажность) в течение 2 часов [12, 13].

После инкубации фрагмент промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ), разрезали на мелкие фрагменты размером около 2 мм² и переносили в раствор коллагеназы II типа (2 мг/мл), разведенной в среде DMEM/F12 с добавлением антибиотиков, и выдерживали при температуре +4° С в течение 15 часов [10, 11].

Далее измельченную ткань трикратно промывали ФСБ и центрифугировали (1400 об./мин., 5 минут), осадок ресуспендировали в растворе коллагеназы II типа (10 мг/мл) и инкубировали в течение 2 часов с регулярной механической дезагрегацией на платформенном термо-

шейкере (125 об./мин., по 7 минут каждые 30 минут инкубирования), после чего проводили повторное центрифугирование [15].

Полученный осадок однократно отмывали в ФСБ, центрифугировали и смешивали с полной ростовой средой [DMEM/F12 (89% по об.), фетальной телячьей сывороткой (10% по об.), смесью антибиотиков (1% по об.)] [9, 16]. Подсчет клеток производили в камере Горяева (МиниМед, Россия) и затем высевали их в стерильную чашку Петри (35 мм) в концентрации 3x10⁵ клеток на чашку, и инкубировали в стандартных условиях. На следующий день и далее каждые 3 дня производили смену среды вплоть до образования монослоя клеток на дне чашки Петри, получая таким образом первичную культуру КСР.

Далее первичную культуру КСР пересевали (пассировали) 6-7 раз для получения необходимого количества клеток. Для дезагрегации слоя клеток использовали растворы Версена (ПанЭко, Россия) из расчета 0,1-0,2 мл/см² и 0,25% трипсина (ПанЭко, Россия) из расчета 0,1 мл/см². Инкубировали в стандартных условиях с использованием питательной среды упомянутого состава. Плотность клеток при расеве составляла не менее 1x10⁵/см².

Жизнеспособность клеток определяли стандартным тестом с трипановым синим [7].

Определение биосовместимости исследуемых образцов проводили по окончании сроков культивирования. Образцы материалов помещали в лунки 24-луночных культуральных планшетов (Tissue Culture Testplate, SPL LIFE SCIENCES, США) по одному в лунку (группы 1, 2, 3, 4, 5; по 24 лунки на группу). Поверх образцов в лунки вносили по 1 мл суспензии КСР 7 пассажа (по 20 тыс. клеток). В качестве контроля в пустые лунки идентичного планшета вносили суспензию КСР в идентичных количестве и концентрации (группа 6; 24 лунки). Все планшеты культивировали в стандартных условиях.

Каждый день, начиная со вторых суток культивирования, по 4 образца из каждой группы выводили из эксперимента. Для этого каждую экспериментальную лунку промывали раствором Версена, добавляли в нее раствор трипсина, инкубировали в

течение 10-15 минут, полученную суспензию клеток собирали и подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность клеток определяли в стандартном тесте с окраской трипановым синим.

Уровень пролиферации – изменение количества клеток в культуре с течением времени – является одним из основных параметров, определяющих влияние внешних условий культивирования, в том числе на присутствие чужеродных объектов (образцов материалов), на состояние клеток.

Для измерения количества клеток в лунках планшетов использовали методы описательной статистики.

Для решения цели работы были сформулированы следующие нулевые гипотезы:

1. Наличие или отсутствие образцов исследуемых материалов в культуре не влияет на уровень пролиферации культивируемых клеток.

2. Исследуемые типы образцов оказывают одинаковое влияние на уровень пролиферации клеток в культуре.

В силу малого объема выборки (менее 20) определение типа распределения признака было затруднено, поэтому для проверки нулевых гипотез применяли наиболее универсальный критерий непараметрической статистики – критерий Уилкоксона.

Статистическая обработка данных исследования клинического и экспериментального материалов производилась на персональном компьютере с помощью пакета лицензированных программ статистической обработки данных SPSS v 12.02 для Windows и программа STATISTICA 7.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные численные данные измерения количества КСР в различных сроки культивирования представлены на рис. 2.

Витальный контроль КСР на 7-е сутки культивирования показал положительную динамику во всех экспериментальных группах. В группе 5 выраженность образования монослоя КСР на поверхности исследуемого образца слабо отличалась от

таковой в контрольной группе. При рассмотрении групп 1-4 данный показатель был значительно ниже (рис. 2) ($p < 0,01$). Данное наблюдение может косвенно говорить о разности степени адгезии КСР к рассматриваемым полимерным материалам.

По интенсивности уровня пролиферации исследуемые материалы располагаются следующим образом (в порядке снижения признака): (контроль, группа 5) > группа 1 > (группа 3, группа 4) > группа 2. При детальном анализе полученных результатов групп 3 и 4 статистически достоверной разницы выявлено не было ($p < 0,01$), что может гипотетически свидетельствовать о соответствии химических компонентов представленных образцов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о достаточной совместимости исследуемых полимерных материалов (ПММА и бис-ГМА) с клетками стромы роговицы донора трупа человека. Среди изученных нами материалов наименьшие адгезивные свойства проявил материал группы 2, адгезия КСР в группе 5 практически соответствовала таковой в группе контроля. Остальные материалы (группы 1, группы 3, группы 4) не проявили однозначной тенденции по отношению к стимуляции пролиферации кератоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борзенков С.А. Медико-технологические и методологические основы эффективной деятельности Глазных тканевых банков России в обеспечении операций по сквозной трансплантации роговицы: Дис. ... д-ра мед. наук. – М., 2008. – 306 с.
2. Верзин А.А. Интраламеллярная кератопластика биополимерной линзой для

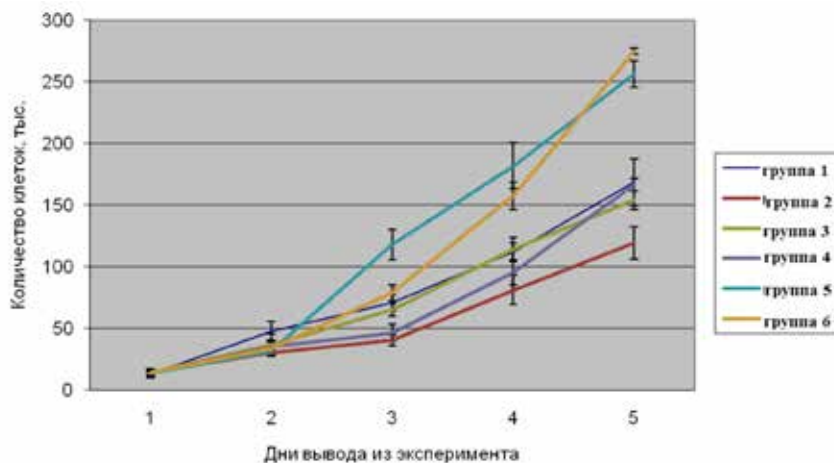


Рис. 2. Изменение количества клеток стромы роговицы при нормотермическом культивировании в присутствии исследуемых материалов (группы 1-5 – экспериментальные группы, группы 6 – контроль)

лечения буллезной кератопатии и коррекции афакии (клинико-экспериментальное исследование): Дис. ... канд. мед. наук. – М., 2002. – 192 с.

3. Гурбанов Р.С. Интрастромальная кератопластика в коррекции миопии и миопического астигматизма при кератоконусе: Дис. ... канд. мед. наук. – М., 2010. – 116 с.

4. Измайлова С.Б. Медико-технологическая система хирургического лечения прогрессирующих кератэктазий различного генеза: Дис. ... д-ра мед. наук. – М., 2014. – 314 с.

5. Калашиников И.Н., Урьяш В.Ф., Треушников В.В., Пастухов Н.В. Свойства некоторых новых терапевтических систем и лечебных материалов на основе акриловых сополимеров // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2010. – № 2 (2). – С. 516-522.

6. Федоров С.Н. Имплантация искусственного хрусталика. – М., Медицина, 1977. – 208 с.

7. Фрешии Р.Я. Культура живых клеток. Практическое руководство. – М., Бинном, 2010. – 714 с.

8. Amzallag T., Pynson J. Lens biomaterials for cataract surgery // J. Fr. Ophthalmol. – 2007. – Vol. 30, № 7. – P. 757-767.

9. Du Y., Funderburgh M.L., Mann M.M. et al. Multipotent stem cells in human corneal stroma // Stem. Cells. – 2005. – Vol. 23, № 9. – P. 1266-1275.

10. Du Y., Rob D.S., Funderburgh M.L. et al. Adipose-derived stem cells differentiate to keratocytes in vitro // Mol. Vis. – 2010. – Vol. 10, № 16. – P. 2680-2689.

11. Funderburgh M.L., Mann M.M., Funderburgh J.L. Keratocyte phenotype is enhanced in the absence of attachment to the substratum // Mol. Vis. – 2008. – Vol. 14. – P. 308-317.

12. Lakshman N., Kim A., Petroll W.M. Characterisation of corneal keratocyte morphology and mechanical activity within 3-D collagen matrices // Exp. Eye Res. – 2010. – Vol. 90, № 2. – P. 350-359.

13. Long C.J., Potb M.R., Tasbeva E.S. et al. Fibroblast growth factor-2 promotes keratin sulfate proteoglycan expression by keratocytes in vitro // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275, № 18. – P. 13918-13923.

14. Reichl F.X., Seiss M., Kleinsasser N. et al. Distribution and excretion of BisGMA in guinea pigs // J. Dent. Res. – 2008. – Vol. 87, № 4. – P. 378-380.

15. Scott S.G., Jun A.S., Chakravareti S. Spher formation from corneal keratocyte and phenotype specific markers // Exp. Eye Res. – 2011. – Vol. 93, № 6. – P. 898-905.

16. Zhang S., Espander L., Imbof K.M. Bunnell Differentiation of Human Adipose-derived Stem Cells along the Keratocyte Lineage in vitro // J. Clin. Exp. Ophthalmol. – 2013. – Vol. 4, № 270. – P. 11435.

Поступила 14.11.2016

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта 15-29-03882 «код офи-м».



WWW.OOR.RU ОБЩЕСТВО ОФТАЛЬМОЛОГОВ РОССИИ – В ИНТЕРНЕТЕ!