

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХОНДРОИТИН СУЛЬФАТА, иммобилизованного на поверхность костного коллагена

В.Ф.Посохова

• к.х.н., начальник центральной заводской лаборатории, ЗАО “ВладМиВа”
Адрес: 308023, г. Белгород, ул. Студенческая, 19, ЗАО “ВладМиВа”
Тел.: (4722) 200-999, доб. 164
E-mail: posohova_vera@mail.ru

В.П.Чуев

• д.т.н., генеральный директор ЗАО “ВладМиВа”
Адрес: 308023, г. Белгород, ул. Студенческая, 19, ЗАО “ВладМиВа”
Тел.: (4722) 200-999
E-mail: chuev@vladmiva.ru

С.В.Надеждин

• к.б.н., доцент кафедры анатомии и физиологии живых организмов, НИУ “БелГУ”;
руководитель ОПУ “Клеточные и вспомогательные репродуктивные технологии”
Адрес: 308000, г. Белгород, ул. Победы, 85
E-mail: nadezhdin@bsu.edu.ru

И.В.Лыкова

• студентка 5-го курса биолого-химического факультета, НИУ БелГУ, г. Белгород
Адрес: 308023, г. Белгород, ул. Студенческая, 19
Тел.: (4722) 200-999, доб. 120
E-mail: Lykova91@mail.ru

Резюме. Усовершенствована и внедрена технология получения биоматериалов “Биопласт-Дент” (деминерализованного и не деминерализованного), насыщенных сульфатированными гликозаминогликанами, и разработана методика количественного определения хондроитин сульфата, иммобилизованного на поверхность костного коллагена.

Ключевые слова: биоматериал, сульфатированные гликозаминогликаны.

С развитием имплантологии, а также совершенствованием методик хирургических операций возникла потребность оптимизации репаративного остеогенеза (восстановления и формирования новой костной ткани).

В стоматологии и челюстно-лицевой хирургии при лечении разнообразных стоматологических заболеваний (периодонтиты, кисты, пародонтиты, новообразования и др.) на сегодняшний день используются материалы различного происхождения — алло-, ауто-, ксенотрансплантаты и синтетические аналоги, отличающиеся по структуре и назначению. Применение аллотрансплантатов связано с опасностью инфицирования, возникновением отрицательных иммунных реакций и неконтролируемой резорбируемостью имплантата. Полного исключения иммунологических и инфекционных осложнений можно достичь, используя ауто-трансплантаты (“золотой стандарт”), что в реальности доступно только крупным специализированным учреждениям. Поэтому разработка отечественных конкурентоспособных биосовместимых, резорбируемых ксеноматериалов и их синтетических аналогов с повышенными остеоиндуктивными свойствами представляется необходимой и сохраняет свою актуальность.

Имплантируемый биоматериал, помещенный в дефект костной ткани, должен обладать свойством остеокондукции и остеоиндукции. Остеокондукция — свойство имплантируемого материала выполнять функцию инертного каркаса, необходимого для прорастания сосудов и клеток из костного ложа,

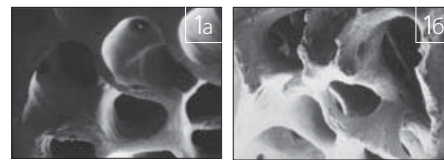
привлечения и миграции остеобластов на его поверхность, через остаток кровяного сгустка, сформированного вокруг имплантата. Остеоиндукция — это способность имплантируемого материала трансформировать недифференцированные мезенхимальные клетки в остеобласты, воздействуя на клетки-предшественники, которые стимулируют их пролиферацию и дифференцировку в остеогенные клетки [3].

Свойства биоинтеграции и биосовместимости, то есть быть деградируемыми и не вызывать у пациента воспалительных и иммунных реакций, достигают как за счет снижения его антигенных характеристик, так и за счет введения в костный материал протеогликанов, морфогенетических белков и факторов роста. Согласно литературным данным, костный коллаген и гликозаминогликаны, взятые по отдельности, обладают в основном лишь остеокондуктивными свойствами. Биоматериалы, которые содержат в своем составе основные компоненты межклеточного матрикса — коллаген, гидроксиапатит, гликозаминогликаны, способны оказывать определенный остеоиндуктивный эффект. Комплекс на основе коллагена и сульфатированных гликозаминогликанов (сГАГ) служит эффективным и активным субстратом для активации и связывания факторов роста, костных морфогенетических белков, агрегации тромбоцитов, остеобластов и остеокластов, что способствует ремоделированию костной ткани и стимуляции репарации мягких тканей и костного дефекта. Сульфатированные гликозаминогликаны непосредственно не индуцируют остеогенез, но создают оптимальную среду для пролиферации и дифференцировки остеогенных клеток и усиливают действие имеющихся факторов роста. Установлено, что коллаген, аффинно связанный с функциональными группами сГАГ, обладает способностью повышать его устойчивость к биодеградации [1, 4].

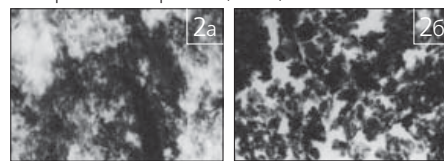
Обобщив опыт отечественных и зарубежных производителей костного коллагена и учтя требования, выдвигаемые врачами-стоматологами к идеальному матриксу для костной пластики, научными сотрудниками фирмы “ЗАО ОЭЗ “ВладМиВа” была разработана технология получения костного коллагена (не- и деминерализованного), насыщенного сГАГ. Используя современное оборудование и стандартизированные методы контроля, была выпущена опытная партия остеопластического биокомпозиционного материала серии “Биопласт-Дент”.



Технология производства данного материала включает анализ входящего сырья и контроль биоматериала на промежуточных стадиях. В полученном биокомпозиате практически полностью сохранена коллагеновая и гидроксиапатитовая структура нативной кости, что было подтверждено методом сканирующей электронной микроскопии (растровый электронно-ионный сканирующий микроскоп Quanta 200 3D фирмы FEI).



■Рис. 1. Фрагмент трабекулярной губчатой кости: аллокость (а), ксенокость (б). Сканирующий электронный микроскоп (x 500)



■Рис. 2. Кристаллы натурального гидроксиапатита: аллокость (а), ксенокость (б). Трансмиссионный электронный микроскоп (x 100000)

Установлено, что пористо-волокнистая структура костной ткани не нарушена, а отдельные волокна коллагена имеют типичный вид без каких-либо изменений, минеральный компонент расположен над поверхностью коллагеновых волокон в виде сферических образований.

Материал в процессе его получения контролировали на каждой стадии обработки с применением методик, утвержденных для данного типа материалов, что во много раз позволило снизить его антигенность, контаминацию микробами, прионами и другой патогенной микрофлорой. Концентрация эндотоксина в ходе технологического процесса определяли с помощью ЛАЛ-теста — реакции эндотоксинов, с использованием лизата кровяных клеток мечехвоста (Limulus Amebocyte Lysate (LAL), CHARLES RIVER ENDOSAFE).

Белок определяли после стадии обработки ферментом (папаин); 2% раствором гидроксида натрия (табл. 1) и в сочетании с фермент/химической обработкой при помощи спектрофотометра (HITACHI U — 2900 UV/VIS, 2J1 — 0003, Япония) по методу Брэдфорда и Лоури ($\lambda=595\text{nm}$).

Согласно табличным данным, после ферментативно-химической обработки костного материала белки практически не определяются. Это говорит о том, что предлагаемый нами способ позволяет снизить антигенность по уровню содержания белка до нуля. Отсутствие протеогликанов на стадии после обработки перекисью водорода и отмывки водой определяли спектрофотометрически по окрашиванию 1,9-диметиленовым синим ($\lambda=525\text{nm}$). Однако этот метод не нашел применения при анализе конечного продукта, в силу сложности проведения и отсутствия доступности необходимых реактивов. Контроль на липиды после обезжиривания проводили сульфифосфорванилиновым методом.

Химическая иммобилизация, основанная на образовании химической связи между сульфатированными гликозаминогликанами и функциональными группами костного коллагена интересна с научной точки зрения, но мало исследована.

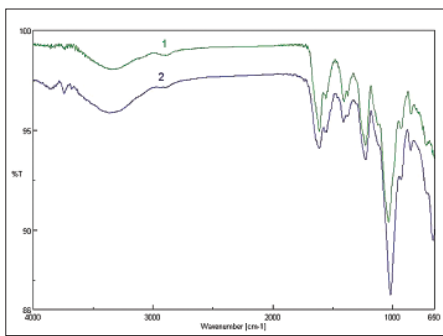
Нанесение сГАГ на костный матрикс проводили в течение 2 часов при определенных условиях: $t=37^\circ\text{C}$, $\text{pH}=3,5-6,5$. Для подтверждения подлинности хондроитин сульфата использовали ИК-спектрокопию НПВО (метод нарушенного полного внутреннего отражения) (FT/IR — 4100 LE, Япония). Рассматривали полосы поглощения, характерные для сГАГ, в области волновых чисел $4000-650\text{cm}^{-1}$.

■ Таблица 1. Результаты исследований биоматериалов на наличие белков

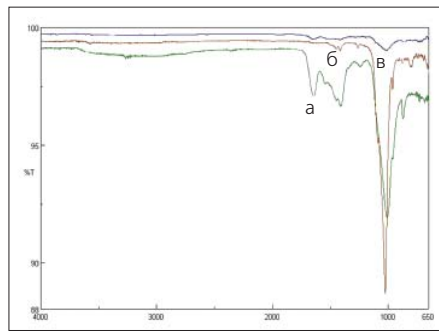
№ п/п	Способы обработки	Масса образца, г	Показатели измерения, мкг/мл				
			1	2	3	4	5
1.	После обработки папаином	0,0554	0,013	0,014	0,014	0,013	0,014
2.	После обработки щелочью	0,0564	0,009	0,008	0,009	0,008	0,009
3.	После ферментативно-химической обработки	0,0562	0,001	0,000	0,001	0,000	0,001

■ Таблица 2. Количество связанных сульфатированных гликозаминогликанов ксеноколлагеном

Время инкубации (мин)	Содержание мГ сГАГ / гр сухого коллагена		
	Эксперимент 1	Эксперимент 2	Эксперимент 3
5	28	30	31
10	49	51	64
20	71	72	75
30	84	85	83
60	90	91	93
120	91	93	94



■ Рис. 3. ИК-спектры НПВО для лиофилизованных форм: препарат "Хондролон" (1); "Структурм", капсулы 500 мг" (2)

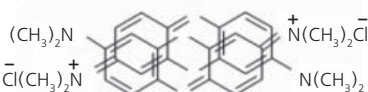


■ Рис. 4. ИК-спектры НПВО субстанций костного материала с иммобилизованным сГАГ ("Структурм"): pH = 4,5-5,5 (а); pH = 3,5-4,5 (б); pH = 5,5-6,5 (в)

Деформационные и скелетные колебания молекул в диапазоне от 650 до 1350 см⁻¹ свидетельствуют о подлинности используемых субстанций в процессе производства биокомпозита (рис. 3). Незначительные изменения в структуре молекулы приводят к заметным изменениям в диапазоне от 650 до 1350 см⁻¹, что отчетливо прослеживается на рис. 4 (б, в). Следовательно, необходимым условием иммобилизации сГАГ на костный матрикс является поддержание слабощелочной среды раствора (рис. 4 а).

Доказано, что концентрация сГАГ менее 800 мкг/см³ материала не оказывает выраженного стимулирующего эффекта на процесс репарации костного дефекта, а концентрация более 1500 мкг/см³ материала может вызывать аллергическую реакцию. Ксеноматериалы, как следует из табл. 2, способны химически связывать сГАГ в количестве, значительно превышающем значение физиологической нормы.

Известно, что катионные красители тиазинового ряда (метиленовый синий, 1,9-диметиленовый синий, толуидиновый синий) прочно связываются с элементами соединительной ткани, в частности с сульфатированными гликозаминогликанами. Поэтому исследован комплекс метиленового синего с хондроитин сульфатом. Так как метиленовый синий (МС) способен образовывать в водных растворах ди-, три-, тетра- и мультимерные ассоциаты (рис. 5), нами разработана методика определения сГАГ, иммобилизованных на костный матрикс.



■ Рис. 5. Предполагаемое строение димера МС (показана одна из четырех резонансных структур)

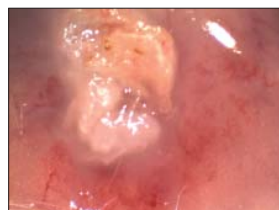
Агрегированные молекулы МС взаимодействуют с отрицательно заряженными молекулами хондроитин сульфата, иммобилизованного на костную ткань с образованием прочного ярко-фиолетового

комплекса. Содержание сГАГ определяли карбазоловым методом по реакции Диле, предварительно восстановив МС до бесцветного лейкосоединения, не способного образовывать комплекс с хондроитин сульфатом [2]. В качестве раствора сравнения использовали пробу без хондроитин сульфата, предварительно исключив из определения мешающие факторы, дающие аналогичную окраску по реакции Диле. Согласно данному исследованию разработана методика количественного определения хондроитин сульфата, иммобилизованного на поверхность костного коллагена.

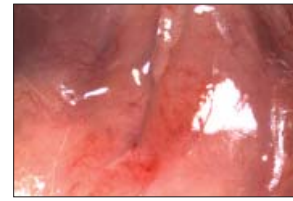
Полученный по предлагаемому способу костный материал имплантировали под кожу экспериментальным животным (крысам породы Вистар), согласно требованиям ГОСТа Р ИСО 10993-6-2009. Через 1,5-2 месяца животных выводили из эксперимента и изготавливали гистологические срезы по общепринятой схеме, которые изучали с помощью аппаратно-программного комплекса Видео-Тест-Размер (микроскоп Аxioplan plus фирмы Zeiss).



■ Рис. 6. Место инокуляции биокомпозитного материала "Биопласт-Дент" под кожу подопытного животного

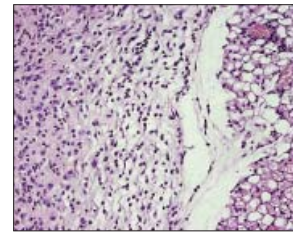


■ Рис. 7. Биокомпозитный материал "Биопласт-Дент", покрытый соединительной капсулой

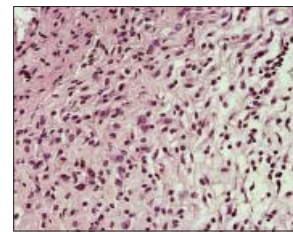


■ Рис. 8. Артериальная гиперемия ложа соединительной капсулы

В ходе оценки биологической реакции организма на инокуляцию биокомпозитного материала "Биопласт-Дент" в зоне дефекта признаков местной воспалительной реакции выявлено не было (рис. 6, 7, 8). Биокомпозитный материал покрыт фиброзной капсулой, вокруг которой отмечается артериальная гиперемия.



■ Рис. 9. Рыхлая волокнистая соединительная ткань регенерационной зоны с полнокровием сосудов



■ Рис. 10. Рыхлая (справа) и плотная (слева) волокнистая соединительная ткань с пролиферирующими фиброцитами

В ходе исследования гистологических препаратов патологических изменений в соединительнотканном компоненте регенерационной зоны не выявлено (рис. 9, 10). Реакция тканей на инокуляцию биокомпозитного материала была умеренной и составила 5 мм от поверхности соприкосновения имплантата с тканью до участков, имеющих характеристики нормальной ткани с нормальным кровообращением.

Таким образом, материал "Биопласт-Дент" является биосовместимым, способным к поддержанию гистотипической дифференцировки клеток и обеспечению репаративной регенерации соединительной ткани. Введенный в костный коллаген сГАГ образует активный комплекс, снижающий первичную воспалительную реакцию на имплантированный материал, что повышает его устойчивость к биодеградации. При этом полученный биокомпозит является активным субстратом для индукции и связывания факторов роста, костных морфогенетических белков, агрегации тромбоцитов, остеобластов и остеокластов, что способствует ремоделированию костной ткани.

ЛИТЕРАТУРА:

- Иванкин А.Н., Васюков С.Е., Панов В.П. / Получение, свойства и применение хондроитин сульфатов // Химико-фармацевтический журнал. - 1985. - № 3. - С. 192-202.
- Кочетков Н.К. Химия углеводородов / Кочетков Н.К., Бочков А.Ф., Дмитриев Б.А. и др. - М.: "Химия", 1967. - 672 с.
- Понкратов А.С. Костная пластика в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии. Остеопластические материалы: Руководство для врачей / Понкратов А.С., Лекишвили М.В., Копецкий И.С. - 2011.
- Chondroitin sulfate: structure. Role and pharmacological activity. Volpi N. Eds. - 2006. - San Diego: Elsevier.