

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,

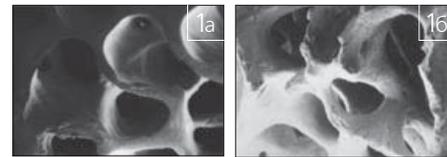
привлечения и миграции остеобластов на его поверхность, через остаток кровяного сгустка, сформированного вокруг имплантата. Остеоиндукция — это способность имплантируемого материала трансформировать недифференцированные мезенхимальные клетки в остеобласты, воздействуя на клетки-предшественники, которые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

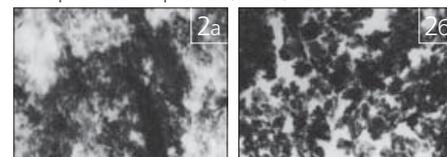
Обобщив опыт отечественных и зарубежных производителей костного коллагена и учтя требования, выдвигаемые врачами-стоматологами к идеальному матриксу для костной пластики, научными сотрудниками фирмы “ЗАО ОЭЗ “ВладМиВа” была разработана технология получения костного коллагена (не- и деминерализованного), 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-волоконная 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-диметиловым 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-спектроскопию НПВО (метод нарушенного полного внутреннего отражения) (FT/IR — 4100 LE, Япония). Рассматривали полосы поглощения, характерные для сГАГ, в области волновых чисел $4000-650\text{cm}^{-1}$.

