

БИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

УДК 616.716.8-089.844-092.9-07

ОЦЕНКА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ И МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ УГЛЕРОДНОГО КОМПОЗИЦИОННОГО ВОЛОКНА

О. Н. Седегова, Н. Б. Асташина, Н. П. Логинова, А. П. Годовалов*

*Пермский государственный медицинский университет
им. академика Е. А. Вагнера, г. Пермь, Россия*

ASSESSMENT OF HEMATOLOGICAL AND MORPHOLOGICAL INDICES IN EXPERIMENTAL ANIMALS WHILE IMPLANTATING CARBON COMPOSITION FIBER

O. N. Sedegova, N. B. Astashina, N. P. Loginova, A. P. Godovalov*

Perm State Medical University named after E. A. Wagner, Perm, Russian Federation

Цель. В эксперименте изучена ответная реакция биологических тканей и систем экспериментальных животных на имплантацию углеродного композиционного волокна.

Материалы и методы. В эксперименте участвовали 2 группы беспородных белых крыс (самцов): первую группу составили 25 животных, которым внутримышечно имплантировано «чистое» углеродное волокно (УВ), а вторую – 25 животных с внутримышечно введенным аппретированным УВ. Контрольная группа включала 20 животных, содержащихся на тех же условиях, что и животные экспериментальных групп, но без имплантации каких-либо материалов. Для определения состава клеток периферической крови получили образцы из хвостовой вены. Фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови изучали с использованием формализированных эритроцитов барана по методу В. Н. Каплина.

Результаты. Определено, что при использовании углеродных материалов наблюдается активация моноцитарно-макрофагального и лимфоцитарного звеньев иммунной системы в первые 7 суток, что способствует формированию репаративного процесса в последующие сроки.

Выводы. Данные эксперимента подтвердили биологическую совместимость углеродного волокна с животными тканями, что дает возможность его использования в практической стоматологии.

Ключевые слова. Биологически совместимые материалы, углеродное волокно, иммунологическая реакция, гистологическое исследование, моноцитарно-макрофагальное звено, репаративный процесс.

© Седегова О. Н., Асташина Н. Б., Логинова Н. П., Годовалов А. П., 2015

e-mail: olgasedegova@gmail.com

тел. 8 919 710 07 55

[Седегова О.Н. (*контактное лицо) – старший лаборант кафедры ортопедической стоматологии; Асташина Н. Б. – доктор медицинских наук, доцент кафедры ортопедической стоматологии; Логинова Н. П. – кандидат медицинских наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии; Годовалов А. П. – кандидат медицинских наук, доцент кафедры иммунологии].

Aim. To study in experiment the response of biological tissues and systems of experimental animals to implantation of carbon composition fiber.

Material and methods. During the experiment, two groups of outbred white rats (males) were used: group 1 included 25 animals, who were intramuscularly implanted "pure" carbon fiber (CF); group 2–25 animals with intramuscularly introduced finished CF. the control group consisted of 20 animals kept in the same conditions as experimental groups, but without implantation of any materials. To determine the cell composition of peripheral blood, the samples were taken from the caudal vein. Phagocytic activity of peripheral blood leukocytes was studied with V.N. Kaplin method using formalinized sheep erythrocytes.

Results. It was detected that when using carbon materials there is observed activation of monocytic-macrophage and lymphocytic links of immune system during the first 7 days that later contributes to formation of reparative process.

Conclusions. The experimental data confirmed the biological compatibility of carbon fiber that permits to use it in practical dentistry.

Key words. Biological compatible materials, carbon fiber, immunological reaction, histological study, monocytic-macrophage link, reparative process.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема разработки биосовместимых материалов медицинского назначения сохраняет свою актуальность на протяжении нескольких десятилетий. К материалам стоматологического назначения предъявляется ряд требований, в частности: отсутствие токсичности, коррозионная устойчивость, прочность, технологичность, близость показателей физических свойств материалов к таковым у естественных тканей. Уровень электрохимического потенциала углеродных материалов приближен к таковому у биологических сред живых организмов, поскольку углерод является одним из химических элементов, входящих в их состав. Он отличается биологической и химической инертностью, отсутствием токсичности и канцерогенности [1]. Развитие технологии получения различных видов углеродных материалов, наряду с выявленной совместимостью с живыми тканями и биологическими средами, привело к активизации исследований, а также разработке новых композиционных материалов на основе углерода и его соединений.

Цель исследования – изучить реакцию лейкоцитов периферической крови и органов иммунной системы на имплантацию углеродного композиционного волокна экспериментальным животным.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на 70 крысах-самцах линии Wistar. Через 7, 15 и 30 суток после имплантации углеродного волокна (УВ) у животных получали образцы крови из хвостовой вены. Для определения состава клеток периферической крови фиксированные мазки окрашивали азур-эозином по методу Романовского–Гимзы и подсчитывали число эозинофилов, базофилов, нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов. Фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови изучали с использованием формализированных эритроцитов барана по методу В. Н. Каплина [2–4].

С целью определения реакции биологических тканей на внутримышечное введение образцов УВ осуществляли морфологическое исследование органов опытных животных. Эксперимент проводился в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных или иных научных целей; в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных»; с требованиями международного стандарта ISO 10993 «Оценка биологического действия медицинских из-

делий»; рекомендациями «Сборник руководящих методических материалов по токсико-гигиеническим исследованиям полимерных материалов и изделий медицинского назначения» и утвержден решением этического комитета ГБОУ ВПО ПГМУ им. академика Е. А. Вагнера Минздрава России.

В эксперименте использованы 2 группы беспородных белых крыс (самцов), содержащихся на стандартной диете вивария: первую группу составляли 25 животных, которым внутримышечно имплантировано «чистое» УВ, а вторую – 25 животных с внутримышечно введенным аппретированным УВ. Контрольная группа включала в себя 20 животных, содержащихся на тех же условиях, что и животные экспериментальных групп, но без имплантации каких-либо материалов. Выведение животных из эксперимента проводили на 15-е (ранний срок) и 30-е (отдаленный срок) сутки после операции, что соответствует международному стандарту ИСО/ДИС «Биологический контроль материалов и изделий медицинского назначения», в котором определена длительность имплантационного теста от 7 до 90 суток (Draft International Standard). Для гистологического исследования забирали образцы селезенки, брыжеечных лимфатических узлов, скелетной мышечной ткани из зоны имплантации материала. Органы фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине (рН = 7,0), гистологические препараты изготавливали в соответствии со стандартными методиками с заливкой в парафин, срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Съемку препаратов проводили на морфометрической установке «Олимпус» (заведующая лабораторией отдела учебно-методического и научного обеспечения ГБОУ ВПО ПГМУ им. академика Е. А. Вагнера кандидат биологических наук Н. В. Чемурзиева).

Статистическую обработку данных проводили с использованием непарного варианта *t*-критерия Стьюдента. За пороговый уровень значимости принимали величину $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Во все сроки наблюдения статистически значимого увеличения количества лейкоцитов периферической крови не отмечено. Непосредственно перед имплантацией в крови экспериментальных животных количество лейкоцитов составило $9300,0 \pm 281,7$ в 1 мкл, через 7 суток от момента имплантации – $9360,0 \pm 254,4$ в 1 мкл ($p > 0,05$), через 15 суток – $9266,7 \pm 240,4$ в 1 мкл ($p > 0,05$) и через 30 суток – $10100,0 \pm 341,6$ в 1 мкл ($p > 0,05$). При оценке состава клеток периферической крови не выявлено статистически значимых изменений количества эозинофилов, базофилов и палочкоядерных нейтрофилов во все сроки наблюдения. До имплантации число сегментоядерных нейтрофилов составило $2961,0 \pm 297,9$ в 1 мкл, через 7 суток после имплантации оно статистически значимо снизилось до $2152,0 \pm 95,9$ в 1 мкл ($p < 0,05$). Через 15 и 30 суток после имплантации количество сегментоядерных нейтрофилов статистически значимо не отличалось от числа таковых до имплантации. Подобные изменения количества сегментоядерных нейтрофилов, вероятно, связаны с активацией клеток в первые сутки после внедрения имплантата. Число моноцитов в периферической крови экспериментальных животных до имплантации составило $20,4 \pm 7,3$ в 1 мкл. Через 7 суток после имплантации количество моноцитов статистически значимо увеличилось и составило $77,6 \pm 20,3$ в 1 мкл ($p < 0,05$). Через 15 суток после имплантации количество моноцитов было $108,7 \pm 16,8$ в 1 мкл ($p < 0,05$), а через 30 суток – $104,0 \pm 42,5$ в 1 мкл ($p < 0,05$). Увеличение числа моноцитов в периферической крови совпадает с увеличением потребности в этих клетках на периферии, в очаге внедрения имплантата, поскольку основная функция тканевых макрофагов заключается в утилизации разнообразных объектов.

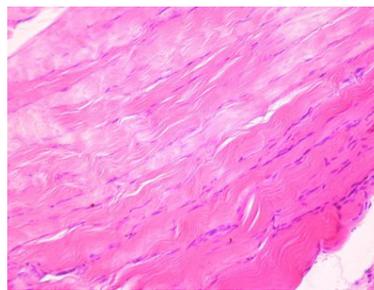
Известно, что существует несколько вариантов активации макрофагов [5]. Одна из них, альтернативная, способствует репаративным

процессам и ремоделированию ткани, когда у макрофагов повышается способность к дифференцировке в прогениторные клетки фибробластического дифферона, увеличивать синтез компонентов межклеточного матрикса [6]. При оценке фагоцитарной активности лейкоцитов показано, что через 7 суток после имплантации число фагоцитирующих клеток было статистически значимо меньше ($22,8 \pm 0,6 \%$), чем до имплантации – $31,9 \pm 2,3 \%$ ($p < 0,05$). Через 15 и 30 суток после имплантации число фагоцитов статистически значимо не отличалось от такового до имплантации. Аналогичная тенденция обнаружена при оценке фагоцитарного числа. Подобное снижение фагоцитарной активности, в том числе среди моноцитов, вероятно, указывает на преобладание стимулов альтернативной активации макрофагов.

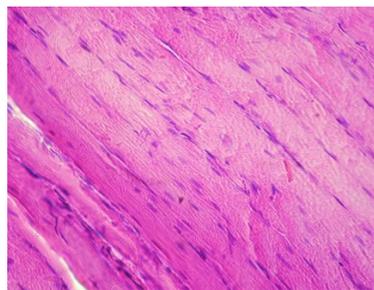
Через 7 суток после имплантации число лимфоцитов в периферической крови составило $6977,2 \pm 133,8$ в 1 мкл и было статистически значимо выше, чем до имплантации ($5945,6 \pm 441,5$ в 1 мкл; $p < 0,05$). Через 15 и 30 суток число лимфоцитов статистически значимо не отличалось от такового до момента имплантации ($6463,0 \pm 108,0$ в 1 мкл и $7079,0 \pm 97,0$ в 1 мкл соответственно; $p > 0,05$).

При изучении гистологического строения скелетной мышечной ткани в месте контакта с углеродным волокном на 15-е сутки верифицировали умеренный отек и рыхлость расположения мышечных волокон. Исчерченность волокон хорошо просматривается (рис. 1, а). На всем своем протяжении волокна сохраняют ровный ход. На поперечном срезе симпласта – ядра округлой формы, прилежат к сарколемме. Расстояние между миофибриллами несколько увеличено, лежат рыхло. В прослойках соединительной ткани (эндомизий) наблюдается слабое расширение и наполнение клетками крови сосудов мелкого калибра. Периваскулярных признаков воспаления не установлено. В некоторых участках наблюдали единичное

присутствие клеток лейкоцитарного ряда, без признаков их активации. Соединительная ткань в прослойках между волокнами богата клетками, в составе которых доминируют клетки фибробластического дифферона. Фибробласты располагаются преимущественно вблизи капилляров эндомизия, часть клеток митотически активна.



а



б

Рис. 1. Скелетная мышечная ткань в месте контакта с углеродным волокном без аппрета: а – в ранний; б – в отдаленный срок наблюдения. Окраска гематоксилин-эозином, ув. на 600

Через 30 дней исследования морфологической реакции на имплантацию углеродного волокна со стороны скелетной мышечной ткани не было. Мышечные волокна формировали ровные пучки, но при введении волокна с аппретом наблюдали умеренное их утолщение и некоторую рыхлость расположения, при этом миофибриллы в этих участках располагались упорядоченно. В волокнах хорошо верифицировалась исчерченность. Сосуды в окружающей их соединительной ткани спокойные, большей

частью пустые. Периваскулярных лейкоцитарных инфильтратов и признаков воспаления в эндомизии нет. В месте контакта с имплантатами имеются участки разрастания соединительной ткани (рис. 1, б).

В селезенке у животных при имплантации имеются признаки иммунного напряжения разной степени выраженности. При введении углеродного волокна с аппретом в паренхиме органа наблюдаются расширение и переполнение венозных сосудов клетками крови, признаки умеренного гемостаза. Селезеночные тяжи широкие и переполнены клетками крови. В тяжах красной пульпы участки скопления гемосидерина. Белая пульпа сформирована, лимфоидные узелки крупные, разные по активности, в некоторых случаях окружены широкой маргинальной зоной.

На 30-е сутки эксперимента в селезенке, независимо от типа имплантируемого волокна, белая пульпа занимает около трети органа и представлена вторичными лимфоидными узелками разного размера. В пределах органа их активность разная. Многие из них содержат пролиферирующие клетки лимфоидного ряда. Все функциональные зоны белой пульпы развиты. В красной пульпе синусы умеренно расширены, частично заполнены клетками крови. В селезеночных тяжах скопление форменных элементов крови, преимущественно эритроцитов. Присутствуют также макрофаги, зернистые и незернистые лейкоциты и плазмоциты на разных стадиях созревания. Крупные сосуды полупустые, эндотелий формирует ровную выстилку. Трабекулярные вены широкие, заполнены клетками крови, преимущественно эритроцитами.

В лимфатических узлах, независимо от типа введения имплантата, наблюдали признаки умеренного иммунного напряжения, проявляющиеся увеличением функциональных зон (рис. 2). В корковом веществе скопление лимфоидных узелков разного размера и активности. Участки междуузелковой зоны заполнены лимфоцитами. Синусы в этой

части расширены, некоторые переполнены клетками. Паракортикальная зона широкая, клетки в ней формируют плотное скопление. Расположенные в этой части посткапиллярные венулы расширены, выстланы высоким эндотелием. Часть сосудов переполнена клетками крови. В мозговом веществе тяжи широкие, переполнены клетками крови. Окружающие синусы расширены, содержат лимфоциты. В этой части органа у животных при введении имплантата с аппретом наблюдается сосудистая реакция со стороны гемокапилляров. Мелкие кровеносные сосуды увеличены в объеме, наблюдаются умеренные признаки замедления капиллярного кровотока, явления гемостаза.

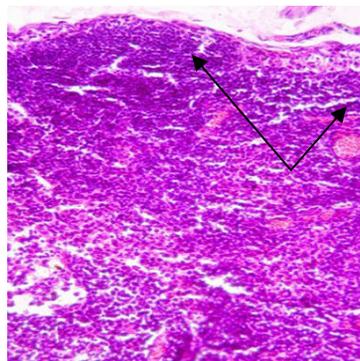


Рис. 2. Лимфатический узел при введении углеродного волокна с аттретом. Стрелками показано полнокровие сосудов. Окраска гематоксилин-эозином, ув. на 400

В лимфатических узлах у животных обеих групп на 30-е сутки в области коры формировались вторичные узелки среднего размера, большая часть которых в состоянии активности. В центральной части большинства из них присутствуют лимфобласты и макрофаги. Междуузелковые пространства в большинстве случаев свободные, в этих участках просматриваются расширенные синусы. Паракортикальная зона развита умеренно. Клетки лежат плотно. В мозговом веществе тяжи имеют четкое очертание и состоят из клеток лимфоидного ряда. Синусы во всех зонах органа спокойные, клетками не перегружены.

Выводы

В ходе проведенных исследований установлено, что в первые 7 суток после имплантации наблюдается активация клеток иммунной системы, преимущественно моноцитарно-макрофагальной системы и лимфоцитов. Подобные изменения отражают первый этап развития иммунного ответа, когда моноцитарно-макрофагальные клетки осуществляют распознавание внедренного объекта и представляют полученную информацию лимфоцитам. В более поздние сроки активность лимфоцитарного звена снижается, а у моноцитарно-макрофагальных клеток наблюдается альтернативная активация, способствующая регенеративным процессам.

В целом показано отсутствие значимой реакции со стороны лимфоидных органов, а также отсутствие изменений мышечной ткани. Результаты эксперимента показали, что при имплантации углеродного волокна выраженных патоморфологических изменений в органах экспериментальных животных не выявлено. Установлены однотипные морфологические процессы со стороны биологических тканей: на ранних сроках отмечена умеренная реакция сосудов, которая проявляется замедлением капиллярного и венозного кровообращения, что сопровождается слабым отеком, без серьезных структурных перестроек. К концу исследования состояние органов соответствует нормальному физиологическому строению. При использовании углеродных материалов наблюдается активация моноцитарно-макрофагального и лимфоцитарного звеньев иммунной системы в первые 7 суток, что, вероятно, будет способствовать формированию репаративного процесса в последующие 30 суток.

Данные эксперимента подтвердили биологическую совместимость углеродного волокна по отношению к тканям организма, что

дает возможность использования данного материала в практической стоматологии.

Библиографический список

1. Анциферов В. Н., Рогожников Г. И., Асташина Н. Б. и др. Применение современных конструкционных материалов при комплексном лечении больных с дефектами челюстно-лицевой области, Перспективные материалы 2009; 3: 46–51.
2. Каплин В. Н. Нетрадиционная иммунология инфекций. Пермь: Изд-во Перм. гос. мед. академии 1996; 163.
3. Каплин В. Н., Кузнецов В. Ф., Обернебесова Т. П. Методические аспекты изучения фагоцитоза. I съезд иммунологов России: тез. докл. (23–25 июня 1992 г.). Новосибирск 1992; 200–201.
4. Шилов Ю. И., Орлова Е. Г. Адренергическая регуляция функций циркулирующего пула фагоцитирующих клеток при остром стрессе. Докл. Академии наук 2000; 373 (2): 267–269.
5. Liu H., Wu X., Gang N., Wang S., Deng W., Zan L., Yu S. Macrophage functional phenotype can be consecutively and reversibly shifted to adapt to microenvironmental changes. Int. J. Clin. Exp. Med 2015; 8(2): 3044–3053.
6. Martinez F. O., Gordon S., Locati M., Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. J. Immunol 2006; 177 (10): 7303–7311.
7. Sica A., Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. J. Clin. Invest. 2012; 122(3): 787–795.
8. Wang N., Liang H., Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. Front. Immunol 2014; 5: 614.

Материал поступил в редакцию 21.08.2015