

ПОДХОДЫ К ТЕСТИРОВАНИЮ БИОМАТЕРИАЛОВ С ПОЗИЦИИ СОВРЕМЕННОЙ ПАРАДИГМЫ БИОСОВМЕСТИМОСТИ

Викнянчук А.Н.¹, Мишанин А.И.², Твердохлебов С.И.³,
Головкин А.С.²

¹ Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский
центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия

³ Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Национальный исследовательский
Томский политехнический университет», Томск, Россия

Контактная информация:

Головкин Алексей Сергеевич
ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: golovkin_a@mail.ru

Статья поступила в редакцию 09.02.2017
и принята к печати 16.04.2017.

Резюме

С современных позиций биосовместимость представляет собой характеристику всей системы «тканеинженерный трансплантат — организм реципиента», адекватное прогнозируемое функционирование которой определяется в равной степени всеми входящими в ее состав компонентами (организм реципиента, материал, клетки). При этом сам материал, безусловно, влияет на феномен биосовместимости, однако он тесно связан с функциональными характеристиками организма реципиента, его клеток и тканей. Биоматериалы, из которых изготавливают трансплантаты, не должны быть токсичными, иммуногенными и тромбогенными. Однако условия, в которые попадает трансплантат в организме, также могут повлиять на успешность и полноту выполнения изделием желаемой функции. В связи с этим большое значение имеет предварительное тестирование цитотоксичности используемых материалов, а также оценка их влияния на функциональную активность различных типов клеток. В обзоре рассмотрены основные методы, применяемые на данный момент для оценки влияния биоматериалов на жизнеспособность, адгезию и миграцию клеток *in vitro*, а также индукцию окислительного стресса и воспаления.

Ключевые слова: биосовместимость, тестирование *in vitro*, биоматериалы, трансплантология, цитотоксичность, клеточная адгезия.

Для цитирования: Трансляционная медицина. 2017; 4 (1): 29–40.

APPROACHES TO BIOMATERIALS TESTING ACCORDING TO MODERN BIOCOMPATIBILITY PARADIGM

Viknianshchuk A.N.¹, Mishanin A.I.², Tverdokhlebov S.I.³,
Golovkin A.S.²

¹ Saint Petersburg University, Saint Petersburg, Russia

² Federal Almazov North-West Medical Research Centre,
Saint Petersburg, Russia

³ National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia

Corresponding author:

Alexey S. Golovkin
Federal Almazov North-West Medical
Research Centre
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,
197341
E-mail: golovkin_a@mail.ru

Received 09 February 2017;
accepted 16 April 2017.

Abstract

From the modern perspectives biocompatibility is a feature of the whole system «tissue engineered graft — recipient's body». Adequate and predictable performance of this system is determined by all its components (recipient's body, material, cells) to the same extent. Biomaterials for tissue engineered grafts shouldn't be toxic, immunogenic and thrombogenic. At the same time, the efficiency of graft depends on the functional state of recipient's body, tissues and cells. In this case studies of the influence of biomaterials on the viability and functional activity of different cell types become crucial. This review focuses on common modern approaches to in vitro assessment of the viability, adhesion, migration and induction of oxidative stress and inflammatory potential of different types of cells in response to the contact with biomaterials.

Key words: Biocompatibility, in vitro testing, biomaterials, transplantology, cytotoxicity, adhesion.

For citation: Translyatsionnaya meditsina= Translational Medicine. 2017; 4 (1): 29–40.

Список сокращений

ПЦР — полимеразная цепная реакция, AnnV-FITC — аннексин-V, меченный изотиоцианатом флуоресцеина, PI — йодид пропидия

Современная парадигма биосовместимости

Представления о биосовместимости материалов и требованиях, к ним предъявляемых, менялись в разные периоды разработки и применения различных изделий медицинского назначения. Изначальные требования к материалам, длительно присутствующим в организме пациента и выполняющим определенные функции, заключались в непричинении вреда здоровью, и формулировались в определенном перечне ограничений. В частности, они должны были быть нетоксичными, неиммуногенными, нетромбогенными, неонкогенными, не вызывающими раздражения и т.д.

Однако постепенно такой подход менялся. К тому имелось три основных предпосылки. Во-первых, стало очевидным, что реакция на определенные материалы может быть различной в зависимости от того, в каких изделиях они будут применяться. В таком случае биосовместимость не может полностью зависеть только от характеристики материала, но будет напрямую связана с той ситуацией, в которой материал используется. Во-вторых, увеличивалось количество изделий, в которых материал должен был специфически реагировать с тканями, а не быть игнорированным ими (как это происходило с инертными материалами). Наконец, некоторые трансплантаты должны были со временем деградировать в организме, а не оставаться абсолютно стабильными на неопределенный срок [1, 2].

В результате в 1987 году было сформулировано определение биосовместимости как способности

материала в специфической ситуации выполнять необходимую функцию в условиях соответствующего ответа организма хозяина [2]. Это определение было основано на трех принципах:

- 1) Материал должен выполнять определенную функцию, а не просто существовать в тканях;
- 2) Ответ, который он вызывает, должен быть подходящим для применения этого материала;
- 3) Характер ответа на конкретный материал, а также его уместность могут изменяться в различных ситуациях.

Исходя из этой парадигмы, становится очевидным взаимодействие двух основных компонентов: реципиента и, собственно, материала. При этом в отношении реактивности организма пациента значимыми могут оказаться такие характеристики, как пол, возраст, основное и сопутствующие заболевания, физическая активность и ее особенности, прием лекарственных препаратов и т.д. Таким образом, каждый пациент будет иметь свои особенности, которые могут оказаться немодифицируемыми или трудно модифицируемыми, в то время как характеристики и свойства материала подлежат модификации, совершенствованию, тестированию и стандартизации [2, 3, 4].

К основным характеристикам материала, которые могут повлиять на ответ организма, относятся [2]:

- 1) состав материала, микро- (или нано-) структура, морфология;
- 2) кристалличность и кристаллография;
- 3) константы упругости;

4) массовая доля воды, гидрофобный-гидрофильный баланс;

5) макро-, микро-, нанопористость;

6) химический состав поверхности, химические градиенты, поверхностная подвижность молекул;

7) рельеф поверхности;

8) энергия поверхности;

9) электрические/электронные свойства поверхности;

10) параметры коррозии, профиль высвобождения ионов, токсичность ионов металла (для металлических материалов);

11) профиль деградации, форма продуктов деградации и токсичность (для полимерных материалов);

12) продукты отмывки, добавки, катализаторы, загрязняющие примеси и их токсичность (для полимерных материалов);

13) профиль растворения/деградации, токсичность продуктов деградации (для керамических материалов);

14) профиль высвобождаемых при деградации частиц.

К основным характеристикам общей реакции организма хозяина на биоматериалы относятся:

1) характеристики адсорбции и десорбции белка;

2) генерализованные цитотоксические эффекты;

3) активация нейтрофилов;

4) активация макрофагов, образование гигантских клеток инородного тела, формирование грануляционной ткани;

Рисунок 1.

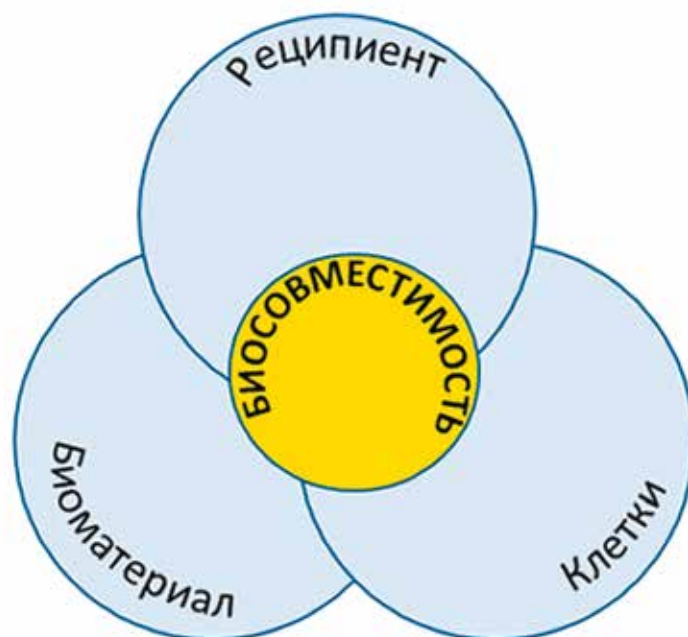


Рисунок 2.



- 5) фиброз и активность фибробластов;
- 6) микрососудистые изменения;
- 7) ткане/органоспецифический клеточный ответ (например, остеокластов и остеобластов для кости, эндотелиальной пролиферации);
- 8) активация каскада свертывания;
- 9) адгезия, активация, агрегация тромбоцитов;
- 10) активация комплемента;
- 11) продукция антител, реакции иммунных клеток;
- 12) острая гиперчувствительность/анафилаксия;
- 13) аллергическая реакция замедленного типа;
- 14) мутагенные реакции, генотоксичность;
- 15) репродуктивная токсичность;
- 16) онкогенез.

В настоящее время все шире используются изделия с длительным периодом функционирования в организме человека. При этом зачастую эксплантация не производится, либо используются биоматериалы, способные деградировать в организме. Биосовместимость имплантируемого на длительный срок медицинского устройства характеризуется его способностью выполнять свои функции с требуемой степенью инкорпорирования в организм реципиента, при этом не вызывая нежелательных местных или системных эффектов у пациента. При этом очевидно, что безопасность материала выступает на первый план [5, 6]. К од-

ной из разновидностей такого рода изделий можно отнести скаффолды для тканевой инженерии. Целью тканевой инженерии является создание *in vitro* функциональных тканевых компонентов, имплантация которых в организм реципиента приводила бы к регенерации поврежденных или утративших свою функцию тканей и органов за счет преднамеренной и контролируемой стимуляции выбранных клеток-мишеней, опосредованной механизмами молекулярного сигналинга и механотрансдукции. При этом предполагается, что организм излечивает себя сам за счет доставки в необходимую область молекулярных сигналов, клеток и/или поддерживающих конструкций. Средствами адресной доставки этих клеток оказываются скаффолды, которые, в свою очередь, могут служить в качестве матрицы, на которой происходит трансформация клеток в тканевом направлении с формированием определенной конструкции [7].

В такой ситуации биосовместимость матрицы для тканевой инженерии определяется ее способностью выполнять функции субстрата, поддерживающего определенную клеточную активность. В частности, биоматериал должен облегчать передачу молекулярных и механических сигналов с целью оптимизации тканевой регенерации, не вызывая нежелательных местных или системных эффектов [2, 8–10].

Таким образом, существующие на сегодняшний день подходы не позволяют трактовать понятие биосовместимости исключительно как свойство материала/изделия. С современных позиций биосовместимость представляет собой характеристику всей системы, адекватное прогнозируемое функционирование которой определяется в равной степени всеми входящими в ее состав компонентами (организм реципиента, материал, клетки) (рисунок 1).

На данный момент в мире разработано множество методик, направленных на оценку параметров, характеризующих биосовместимость материалов медицинского назначения как *in vitro*, так и *in vivo* (рисунок 2) [11, 12]. Однако использование животных моделей для рутинной оценки токсичности и биосовместимости материалов в настоящее время имеет большое количество ограничений. Это связано с существующим в разных странах лимитирующим законодательством, этическими нормами, высокой стоимостью таких исследований, усложненной стандартизацией условий проведения, большой длительностью тестирования. В связи с этим в последнее время все больше исследований по оценке цитотоксичности проводится на моделях *in vitro*. При этом для одобрения какого-либо метода тестирования *in vitro* как альтернативы проведения исследования *in vivo* должны быть подтверждены лишь два аспекта — надежность и актуальность. Надежность основана на воспроизводимости результатов внутри и между лабораториями, а так же с течением времени. Актуальность относится к научной значимости и полезности результатов по сравнению с альтернативным методом применительно к конкретной ситуации [13, 14].

Параметры биосовместимости, оцениваемые в тестах *in vitro*

Цитотоксичность материала и жизнеспособность клеток

Еще в конце двадцатого века были описаны основные методики оценки цитотоксичности [15–17], а также опубликованы стандарты по их использованию, такие как, например, Американского общества по испытанию материалов (American Society for Testing and Materials — ASTM) [18] и Международной организации по стандартизации (International Standards Organization — ISO) [19]. Принято считать, что цитотоксичность, определяемая как свойство химических веществ оказывать токсическое действие на клетки, затрагивает различные аспекты клеточной функции, такие как жизнеспособность, пролиферация, адгезия, биосинтетическая активность и морфология клетки. Изучение данных характеристик при культивиро-

вании клеток *in vitro* позволяет проводить оценку токсикологических рисков использования тестируемого материала [20].

Методики тестирования материала могут подбираться в зависимости от структурных характеристик материала и от конкретной задачи. В случае использования прямых контактных методов клетки могут быть посеяны непосредственно на материал [21] или, наоборот, образец тестируемого материала может быть помещен на центр субконфлюэнтного монослоя выбранной клеточной линии [22].

Тесты, основанные на непрямом контактом методе, могут быть проведены путем разделения исследуемого материала и клеток посредством диффузионного барьера, в роли которого может выступать слой агара. В качестве альтернативы возможно внесение экстракта испытуемого материала, приготовленного с использованием культуральной среды, в культуру клеток, уже сформировавших монослой [23]. В случае, если полимеры могут быть растворены в воде или в солевых растворах, становится возможным использовать различные концентрации материала на монослое культуры клеток. После соответствующего времени инкубации (24–72 часа) проводится количественная оценка результатов культивирования клеток с исследуемыми концентрациями полимеров, что позволяет определить концентрацию, при которой наблюдается 50% погибших клеток в сравнении с контролем [24]. Этот тест позволяет проводить качественную и количественную оценку цитотоксичности, которая может быть подтверждена с использованием различных методов.

Качественную оценку связанных с цитотоксичностью морфологических изменений, таких как открепление клеток, округление, формирование гранул, уменьшение размера клеточного ядра и фрагментация цитоплазмы, обычно проводят путем исследования культуры живых клеток или фиксированных окрашенных клеток под инвертированным микроскопом. Более глубокое понимание морфологических изменений клеток в ответ на контакт с биоматериалом может быть получено при использовании флуоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии при окрашивании клеточного цитоскелета или ядра. Кроме того, в дальнейшем могут быть использованы сканирующая и трансмиссионная электронная микроскопия.

Несмотря на то, что сканирующая электронная микроскопия является достаточно информативным методом, позволяющим оценивать клеточные взаимодействия и топографию материала, она оказывается трудоемкой и затратной по времени, особенно для количественного подсчета клеток. С другой стороны, флуоресцентная ми-

микроскопия, которая позволяет визуализировать специфическое окрашивание определенных клеточных структур (например, клеточного ядра или микрофиламентов), может быть легко адаптирована для количественных исследований. Для этого необходимо оценить случайным образом выбранные или подготовленные изображения и провести количественный подсчет специфически флуоресцентно меченых событий на определенной стандартной площади образца. Метод позволяет провести подсчет клеток (по количеству ядер), оценку площади, занимаемой клетками (по распределению в цитоплазме филаментных красителей или при использовании мембранных красителей), а также оценить количество клеточных событий/структур (фокальная адгезия, клеточные адгезионные контакты, апоптотические/некротические клетки и т.д.) [25].

Ключевым показателем в оценке цитотоксичности является количественная оценка живых клеток, а также определение соотношения количества живых клеток к погибшим. Количественная оценка жизнеспособности клеток может проводиться с использованием витальных клеточных красителей. Эти тесты основаны на способности живых клеток поглощать и сохранять определенные красители. Количество красителя может быть измерено спектрофотометрически с последующим наложением результатов на стандартную калибровочную кривую, построенную для живых клеток [23].

Одним из самых простых и удобных методов является использование флуоресцентного красителя РКН, окрашивающего мембраны клеток. Длительный период полураспада (более 100 суток) позволяет использовать его для оценки пролиферации, а также в ряде тестов *in vivo*. Выбор красителя необходимо осуществлять с учетом непосредственной задачи, которую решает исследователь, принимая во внимание тропность красителя не только к мембранам клеток, но и к материалу.

Биохимические колориметрические исследования могут давать очень ценную информацию о количестве адгезировавшихся клеток на исследуемой поверхности, в то же время, предоставляя такие доказательства жизнеспособности клеток, как активность митохондрий, целостность мембран, окислительный стресс и т.д. Вместе с тем использование только этих методов предполагает, что:

1) материал специфично не влияет на принцип работы выбранного метода оценки жизнеспособности (например, митохондриальную активность в МТТ-тесте);

2) материал неспецифически не взаимодействует с реагентами или продуктами используемого теста.

Кроме того, с осторожностью нужно трактовать результаты тестирования материалов, модификация которых направлена на изменение метаболизма клеток, так как могут быть получены ложные результаты уровня адгезии. Для предотвращения таких ситуаций рекомендуется использовать одновременно несколько методов, оценивающих одну и ту же характеристику материала [25].

Культивирование на материале может приводить к снижению пролиферативной активности клеток по сравнению с физиологическими условиями. В такой ситуации оценка пролиферативной активности клеток оказывается очень важным тестом для описания биосовместимых свойств биоматериала. При оценке пролиферации клеток после культивирования на материале можно использовать следующие методы [26]:

1) ДНК-микрочипирование для оценки экспрессии генов (для этого проводят выделение мРНК из клеток после 30 часов культивирования на материале);

2) полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени;

3) иммунофлуоресценция.

Апоптоз/некроз

Количество клеток, вступивших в апоптоз или погибших после контакта с биоматериалом, является одним из основных критериев оценки цитотоксичности. Визуализация клеток возможна как посредством различных видов микроскопии, так и с помощью проточной лазерной цитометрии суспензии клеток, снятых с поверхности образца [27].

Одним из универсальных методов исследования апоптоза является анализ липидного состава плазматической мембраны клеток [27]. Запуск апоптоза, сопровождающийся снижением концентрации АТФ внутри клетки, вызывает изменения в работе широкого спектра внутриклеточных ферментов, что сказывается на нарушении асимметрии клеточной мембраны апоптотирующей клетки [28]. В поверхностном слое мембраны апоптотических клеток в большем, по сравнению с живыми клетками, количестве появляются молекулы фосфатидилсерина.

Для исследования асимметрии мембраны апоптотирующих клеток, а именно для выявления фосфатидилсерина, используют конъюгаты аннексина V с различными флуорохромами. В присутствии ионов кальция этот белок способен взаимодействовать с отрицательно заряженными фосфолипидами, при этом он обладает очень высоким сродством к фосфатидилсерину (константа диссоциации около $5 \cdot 10^{-10}$). В настоящее время наиболее распростра-

ненным и широко применяемым методом исследования апоптоза является окрашивание клеток при помощи аннексина V, меченного FITC (AnnV-FITC), и красителей ДНК (например, йодистого пропидия (PI) или 7-аминоактиномицина D (7-AAD)).

Принцип этого метода заключается в следующем. На ранней стадии апоптоза молекулы фосфотидилсерина появляются на поверхности клеток, что делает их доступными для взаимодействия AnnV-FITC. Потеря мембранной асимметрии в динамике развития апоптоза по времени совпадает с запуском конденсации хроматина и фрагментации ДНК. Однако целостность и непроницаемость для ДНК-связывающих красителей клеточной мембраны еще сохраняется, поэтому на гистограммах флуоресценции клетки, находящиеся на ранних стадиях апоптоза, будут характеризоваться как позитивные по AnnV-FITC и негативные по PI (AnnV-FITC+PI-). На поздней стадии апоптоза клеточная и ядерная мембраны теряют свою целостность и становятся проницаемыми для ДНК-связывающих красителей, поэтому клетки в поздней фазе апоптоза или уже погибшие будут позитивны по обоим красителям (AnnV-FITC+PI+). Такими же характеристиками флуоресценции могут обладать и некротические клетки, поскольку имеют разрушенную мембрану, в результате чего AnnV-FITC и PI свободно проникают в клетки и взаимодействуют со своими лигандами. Кроме того, некротические клетки могут не окраситься AnnV-FITC за счет разрушения цитоплазматической мембраны, но быть позитивными при окраске PI (AnnV-FITC-PI+) [27].

Следующий метод может быть использован в качестве скрининг-метода (быстрого в постановке и недорогого). Метод основан на одновременном применении двух флуоресцентных красителей — йодида YO-PRO-1 и PI [29]. Отличительной особенностью этих веществ, помимо небольшой молекулярной массы (629,3 и 668,4 Да, соответственно), является способность стехиометрическим образом связываться с нуклеиновыми кислотами клетки. Подобного рода взаимодействия сопровождаются накоплением красителей в цитоплазме (после взаимодействия с РНК) и в ядре (после взаимодействия с ДНК) клетки и, как следствие, изменением флуоресценции после возбуждения источником света с длиной волны 488 нм. Максимум эмиссии YO-PRO-1 приходится на зеленую часть спектра (около 509 нм), а PI — на красную (около 617 нм). Однако существенное различие между данными красителями заключается в способности проникать в клетки, билипидный слой мембраны которых для них является непроницаемым.

За накопление YO-PRO-1 внутри цитоплазмы отвечают P2RX7 лиганд-зависимые ионные кана-

лы, относящиеся к семейству пуринорецепторов [30, 31]. В живых клетках накопления YO-PRO-1 не происходит, так как эти каналы не активны или обладают невысокой способностью транспортировать краситель через мембрану. Однако их активация происходит при запуске апоптоза и по времени совпадает с нарушением асимметрии липидного состава поверхностной мембраны, что позволяет рассматривать накопление YO-PRO-1 в клетке в качестве события, характерного для «ранних» стадий апоптоза. Йодистый пропидий не имеет каких-либо интегрированных в мембрану специфических переносчиков и может проникать в цитоплазму и ядро только через поврежденные/фрагментированные мембраны, что обычно имеет место на финальных стадиях апоптоза при формировании апоптотических телец или при некрозе клеток. Таким образом, живые клетки в образце не будут окрашиваться ни одним из упомянутых выше красителей. Клетки, вступившие в апоптоз, будут позитивны только по YO-PRO-1, тогда как клетки, находящиеся на более поздних стадиях апоптоза, будут эффективно окрашиваться обоими красителями.

Клеточная адгезия

После того, как цитотоксичность материала исключена, можно переходить к сокультивированию клеток с материалом и последующей оценке адгезии. Естественно, в зависимости от природы и функции материалов, адгезия клеток на поверхности может быть и нежелательным эффектом. В любом случае, клеточная адгезия является предпосылкой для оценки любых дальнейших клеточных функций, таких как экспансия, пролиферация, миграция и биосинтетическая деятельность [20].

Хорошо известно, что характеристики поверхности материала, такие как химизм, смачиваемость, энергия поверхности и топография, играют ключевую роль в клеточной адгезии [32–34]. Количественно клеточная адгезия может быть оценена посредством исследования изображений, полученных после проведения световой и сканирующей электронной микроскопии. В качестве альтернативы могут применяться методы спектрофотометрического анализа, подобные тем, что используются при оценке цитотоксичности.

Известен подход, позволяющий оценивать не только количество адгезировавшихся на поверхности материала клеток, но и силу сцепления. Для этого проводят подсчет сошедших клеток после трипсинизации поверхности через 5 и 20 минут после обработки ферментом. Предполагается, что получаемый в таких условиях результат указывает на большую адекватность для измерения прочности

Таблица 1. Методы оценки мутагенности *in vitro*

Феномен	Метод
Генные мутации	Тест Эймса/ Тест E.coli Генные мутации в клеточных культурах млекопитающих
Повреждения хромосом	Митотические анеуплоидии в дрожжах Анализ метафаз культур клеток млекопитающих Тест микроядер
Повреждения ДНК	Митотическая конверсия гена (дрожжи) Обмен хроматидами Электрофорез единичных клеток

крепления, чем общий уровень адгезивных клеток [25]. При этом авторы утверждают, что результат трипсинизации должен быть представлен в виде кривой время/концентрация, чтобы получить сопоставимые и надежные результаты. Этот метод можно отнести к так называемым «механическим» методам оценки адгезии, так как он основан на определении силы сцепления клеток с поверхностью [35].

В последнее время были предложены новые методы для количественного определения биосовместимости материалов с точки зрения клеточной адгезии. В частности, была предложена методология *in situ* наблюдения за клетками, адгезированными на непрозрачных поверхностях [36]. Метод основан на использовании иммунных реакций в сочетании с флуоресцентным агентом и позволяет осуществлять непосредственное изучение клетки на месте адгезии.

Изменения морфологии клеток после адгезии на материалах можно изучать при помощи различных оптических методов: микроскопии фазового контраста, автоэмиссионной электронной микроскопии, конфокальной микроскопии.

В настоящее время считается уже недостаточной простая констатация факта высокой или низкой адгезии клеток на поверхности тестируемого материала. Используя парадигму тканевой инженерии, по которой биоматериал является активным участником процесса регенерации и может сам по себе участвовать в таких процессах, как управление дифференцировкой клеток, пролиферацией и т.д., становится очевидной целесообразность изучения механизмов адгезии клеток на материале. Для этого проводится оценка экспрессии белков цитоскелета и адгезии, таких как винкулин, талин и актин путем иммуноцитохимического окрашивания клеток с предварительной фиксацией и пермеабиллизацией. По интенсивности флуоресценции оценивается количество внутриклеточного белка [37]. Закономерно меняется и экспрессия генов, ко-

дирующих эти белки, — параметр, который также подлежит оценке.

Следует отметить, что определение содержания винкулина в клетке является одним из наиболее надежных методов оценки адгезии. Дело в том, что цитоплазматическая фракция винкулина, не связанного с другими белками, вымывается из клеток при обработке детергентом Triton X-100 до проведения процедуры фиксации. Таким образом, при дальнейшем иммуноцитохимическом окрашивании выявится только та фракция винкулина, которая ассоциирована с сайтами фокальной адгезии. Чувствительность метода может быть увеличена путем мечения антител к винкулину частицами коллоидного золота и их последующей визуализации при помощи автоэлектронной микроскопии с детектором обратно рассеянных электронов [35]. Вне сомнения, при выборе конкретного метода оценки адгезии клеток на материале стоит иметь ввиду топографию и другие свойства материала, такие как, например, степень прозрачности (в случае визуализации взаимодействия «клетка-материал» с помощью световой микроскопии).

Генотоксичность

Биоматериалы более не рассматриваются как инертные, биологически неактивные вещества. Наоборот, биологическая активность, которой они обладают, играет ключевую роль в их применении. С этих позиций тщательного исследования требует изучение влияния используемых материалов на регуляцию клеточного цикла.

Материал трактуется как мутагенный, если он индуцирует первичные повреждения ДНК, которые обычно восстанавливаются ферментами репарации ДНК. Иногда, когда этих систем не хватает, они несовершенны или перегружены, повреждение сохраняется в ДНК, передается в клетки-предшественники и трансформируется в мутации. Панель методов оценки мутагенности материалов представ-

лена в стандарте ISO 10993-3 [38, 39] и приведена в таблице [1].

Принципиально тесты на мутагенность заключаются в следующем: материал или исследуемый агент контактируют с клетками в течение определенного промежутка времени, после которого оцениваются различные, связанные с генами характеристики, в сравнении с положительным (известные генотоксичные агенты) и отрицательным контролями [20]. In vitro тесты могут быть классифицированы по использованию прокариотических и эукариотических организмов. Отдельные тесты созданы для детектирования мутаций в соматических и зародышевых клетках.

В 1950-е годы стало понятно, что метаболизм инородных компонентов может играть важную роль в канцерогенезе. Как полагают, опухолевый процесс при этом индуцируется химическими агентами, которые превращаются в реакционно-способные электрофильные вещества, способные взаимодействовать с белками и нуклеиновыми кислотами. Поэтому при выборе метода оценки мутагенного потенциала необходимо учитывать химические вещества (компоненты или продукты разрушения), которые могут повреждать ДНК самостоятельно или становятся мутагенными после превращения в реакционноспособные соединения.

Развитие таких технологий, как геномный, транскриптомный или протеомный анализ, позволяет оценивать экспрессию генов на ином уровне и, соответственно, проводить тестирование материалов и экстрактов [40, 41] более глобально. Уровень активности генов может изучаться с использованием нозерн-блота, гибридизации in situ или ПЦР. Может быть использован и более современный метод микроанализа, при котором выделенная РНК сначала конвертируется в кДНК или кРНК, а потом измеряется уровень гибридизации на микрочипах.

Протеомный анализ позволяет оценивать активность трансляции различных белков. Целью такого анализа является определение физиологической или значимой патологической продукции белков [42]. Изучение активации онкогенеза и утраты продуктов генов-онкосупрессоров может быть крайне полезным для in vitro тестирования канцерогенного потенциала биоматериалов [15].

Окислительный стресс

Ионы металлов, а также индуцируемые ими свободные радикалы — активные формы кислорода могут стать причинами окислительного стресса в клетках при культивировании на материале. Для оценки окислительного стресса после культивирования на материале можно использовать следующие методы [26]:

1) ДНК-микрочипирование для оценки экспрессии генов супероксиддисмутазы, глутатион пероксидазы, глутатион-S-редуктазы, белков теплового шока, гемоксигеназы-1;

2) оценка активности супероксиддисмутазы (увеличение свидетельствует об окислительном стрессе), количества глутатиона (снижение свидетельствует об окислительном стрессе), образования свободных радикалов (увеличение свидетельствует об окислительном стрессе);

3) оценка уровня гемоксигеназы методом иммуноферментного анализа (увеличение свидетельствует об окислительном стрессе), детекция нитротирозина (маркера NO-зависимого оксидативного стресса).

Одним из механизмов немедленного ответа организма на чужеродный материал является респираторный взрыв макрофагов, в результате которого продуцируется большое количество свободных радикалов, таких как супероксидный анион-радикал (O_2^-). В запуске этого процесса участвует фермент NADPH-оксидаза, каталитические субъединицы которого представлены белками gp91phox, p22phox, p47phox, p67phox и малым G-белком Rac1. Активность фермента может свидетельствовать об интенсивности респираторного взрыва макрофагов и оценивается по экспрессии генов субъединиц p22phox, p47phox, p67phox и gp91phox методом ПЦР в реальном времени после культивирования клеток на материале, а также методом вестерн-блоттинга (субъединицы p22phox и p47phox) [43].

Воспаление

В тестах in vitro также может быть исследована индукция провоспалительной активности клеток после культивирования в присутствии биоматериалов [4]. При этом в качестве модели могут быть использованы не только собственно иммунокомпетентные клетки (моноциты, макрофаги), но и эндотелиальные клетки. Например, для оценки адгезии мононуклеарные моноциты человека активировали липополисахаридом для индукции дифференцировки в макрофаги и активации воспалительного потенциала, после чего инкубировали в присутствии тканеинженерных скаффолдов в течение 12 и 24 часов. Число адгезировавших макрофагов оценивают по активности лактатдегидрогеназы [44]. Также можно оценивать экспрессию генов IL-8 и циклооксигеназы-2 методами ДНК-микрочипирования и ПЦР в реальном времени. При этом увеличение экспрессии этих генов будет свидетельствовать об активации провоспалительной активности клеток [43].

Широкое распространение для определения содержания провоспалительных цитокинов и других

медиаторов воспаления получили методы иммуноферментного анализа (материалом служит кондиционированная культуральная среда), а также проточная цитометрия и вестерн-блоттинг (материалом служат непосредственно клетки) [44].

Миграция клеток

Миграция клеток при контакте с материалом или продуктами его деградации демонстрирует иммуногенность и хемотактический потенциал используемого материала. Эти свойства также являются важной характеристикой биосовместимости. Поэтому оценка миграционной активности различных клеток после культивирования в присутствии биоматериалов представляет все больший интерес. Так, в одном из исследований тканеинженерные скаффолды с иммобилизованными в них ростовыми факторами помещали в нижнюю камеру Боудена и погружали в бессывороточную среду. На покрытые фибронектином вставки помещали эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC) и оценивали их миграционную активность спустя 24 часа по количеству клеток, оказавшихся на нижней стороне вставки. При этом сравнивали количество клеток, мигрировавших на нижнюю сторону вставки, по сравнению с контрольными лунками без биоматериалов. Дополнительно оценивали количество жизнеспособных клеток [45].

Гемосовместимость является важной характеристикой материалов, имплантируемых в сосудистое русло и имеющих непосредственный контакт с клетками крови. Для успешной интеграции в сосудистое русло протез должен обладать двумя фундаментальными биологическими свойствами: способностью к эндотелизации и гемосовместимостью. Тромбогенные свойства сосудистого скаффолда играют наиболее важную роль на ранних этапах регенерации сосуда, когда каркас не до конца покрыт монослоем эндотелиальных клеток. Оклюзия графта из-за тромбоза является одной из причин неудачных имплантаций. Тромбогенность биоматериала *in vitro* можно оценить по адгезии к нему тромбоцитов. При этом количество клеток коррелирует с содержанием в них фермента лактатдегидрогеназы (LDH) [44]. Это позволяет использовать метод спектрофотометрии (длина волны 340 нм) после проведения реакции восстановления субстрата (пирувата в присутствии NADH) ферментом LDH (в лизате тромбоцитов) для установления количества адгезировавших тромбоцитов.

Для анализа тромбогенности материала также применяют оценку времени свертывания цельной крови в присутствии биоматериала. Для этого цельную венозную кровь, собранную в пробирки с цитра-

том натрия в качестве антикоагулянта, реактивируют добавлением 10% раствора 0,1M CaCl₂ и немедленно помещают в лунки 12-луночного планшета совместно с биоматериалами на 10, 30 и 60 минут. Затем лизируют эритроциты, не попавшие в тромб, добавлением дистиллированной воды. Далее проводят спектрофотометрический анализ (длина волны 540 нм) гемоглобина из лизированных эритроцитов. Чем выше уровень гемоглобина, тем меньше эритроцитов оказалось в тромбе, и тем менее тромбогенными свойствами обладает материал [44].

Кроме того, возможно использование метода проточной цитометрии для оценки уровня экспрессии поверхностных клеточных молекул адгезии. Так, в одном исследовании проточная цитометрия применялась для оценки экспрессии тромбомодулина, который является компонентом системы антикоагуляции; тканевого фактора; а также эндотелиального рецептора протеина C (CD201), который участвует в регуляции свертывания крови, на эндотелиальных клетках после культивирования на материале [46].

Заключение

Таким образом, современная парадигма биосовместимости подразумевает важность всей системы — материал, клетки, организм. При этом сам материал, безусловно, влияет на феномен биосовместимости, однако он тесно связан с функциональными характеристиками организма реципиента, его клеток и тканей. В современных условиях к биоматериалу предъявляются более высокие (в том числе функциональные) требования, выходящие за рамки «простой» биоинертности в организме пациента. Таким образом, всестороннее тестирование биоматериала в системах *in vitro* приобретает высокую значимость. В зависимости от вида исследуемого биологического материала, его физических, химических и механических характеристик, а также приложения в биологии или медицине возможен подбор различных методов тестирования биосовместимости с учетом конкретных задач, поставленных перед исследователем. Немаловажным оказывается опыт работы конкретной лаборатории с теми или иными методами исследования, наличие приборной и ресурсной базы. При выборе спектра исследований также необходимо учитывать тренды современной доказательной медицины, по которым целесообразно одни и те же наблюдения подтверждать разными методами.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 16-13-10239).

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

- Williams DF. There is no such thing as a biocompatible material. *Biomaterials*. 2014; 35:10009–14.
- Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008; 29:2941–2953.
- Reeve L, Baldrick P. Biocompatibility assessments for medical devices — evolving regulatory considerations. *Expert Rev. Med. Devices*. 2017; 14:161–167.
- Bryers JD, Giachelli CM, Ratner BD. Engineering biomaterials to integrate and heal: The biocompatibility paradigm shifts. *Biotechnol. Bioeng.* 2012; 109 (8):1898–1911.
- Swetha B, Mathew S, Murthy BVS et al. Determination of biocompatibility: A review. *Int. Dent. Med. J. Adv. Res.* 2015; 1:1–6.
- Onuki Y, Bhardwaj U, Pharm M et al. A Review of the Biocompatibility of Implantable Devices: Current Challenges to Overcome Foreign Body Response. *J. Diabetes Sci. Technol.* 2008; 2:1003–1015.
- Rodina AV, Tenchurin TK, Saprykin VP et al. Proliferative and Differentiation Potential of Multipotent Mesenchymal Stem Cells Cultured on Biocompatible Polymer Scaffolds with Various Physicochemical Characteristics. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017; 162:488–495.
- Williams DF. The Williams dictionary of biomaterials. Liverpool: Liverpool University Press; 1999.
- Sevostyanova VV, Elgudin YL, Wnek GE et al. Properties of tissue-engineering polycaprolactone matrices impregnated by VEGF and bFGF growth factors. *Cellular Transplantation and Tissue Engineering*. 2012; VII:62–67. In Russian [Севостьянова В. В., Elgudin Y. L., Wnek G. E. и др. Свойства тканеинженерных матриц из поликапролактона, импрегнированных факторами роста VEGF и bFGF. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2012; VII:62–67].
- Antonova LV, Matveyeva VG, Borisov VV et al. Impact of various modifications of biodegradable membranous scaffolds surface on multipotent mesenchymal stromal cells adhesion and viability. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2012; 4:5–13. In Russian [Антонова Л. В., Матвеева В. Г., Борисов В. В. и др. Влияние различных вариантов модификации поверхности биодеградируемых пленочных матриц на адгезию и жизнеспособность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. *Бюллетень сибирской медицины*. 2012; 4:5–13].
- Hadjizadeh A, Doillon CJ. Directional migration of endothelial cells towards angiogenesis using polymer fibres in a 3D co-culture system. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2010; 4:524–531.
- Keong LC, Halim AS. In Vitro models in biocompatibility assessment for biomedical-grade chitosan derivatives in wound management. *Int. J. Mol. Sci.* 2009; 10:1300–1313.
- Bruner LH, Carr GJ, Chamberlain M et al. Validation of Alternative Methods for Toxicity Testing. *Toxicol. Vitr.* 1996; 479–501.
- Chiellini F. Perspectives on: In Vitro Evaluation of Biomedical Polymers. *J. Bioact. Compat. Polym.* 2006; 21:257–271.
- Kirkpatrick CJ, Bittinger F, Wagner M et al. Current Trends in Biocompatibility Testing. *Proc. Instn. Mech. Engrs.* 1998;75–84.
- Pizzoferrato A, Ciapetti G, Stea S et al. Cell Culture Methods for Testing Biocompatibility. *Clin. Mater.* 1994;173–190.
- Dekker A, Panfil C, Valdor M et al. Quantitative Methods for In Vitro Cytotoxicity Testing of Biomaterials. *Cell Mater.* 1994; 4: 101–112.
- ASTM document F, Standard practice for direct contact cell culture evaluation of materials for medical devices. 1983.
- Part 5. Tests for cytotoxicity: in vitro methods, International Organisation of Standardisation, Geneva,. ISO Doc. Biol. Compat. Med. devices. 1992.
- Silva GA, Marques AP, Gomes ME et al. Cytotoxicity Screening of Biodegradable Polymeric Systems. In: Reis RL, San Roman J (eds). *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2004: 339–349.
- Ferruti P, Bianchi S, Ranucci EF et al. Novel Agmatine-containing Poly(amidoamine) Hydrogels as Scaffolds for Tissue Engineering. *Biomacromolecules*. 2005; 2229–2235.
- Harmand MF. Part I: Toxicological Risk Evaluation Using Cell Culture. In: Braybrook JH (ed). *Biocompatibility Assessment of Medical Devices and Materials*. London: John Wiley & Sons; 1997: p. 121.
- Kirkpatrick CJ, Dekker A. Quantitative Evaluation of Cell Interaction with Biomaterials In Vitro. In: Doherty PJ, Kirkpatrick CJ and Dekker A (eds). *Biomaterial-Tissue Interfaces*. Amsterdam: Elsevier; 1992: p. 31.
- Signori F, Chiellini F, Solaro R. New Self-assembling Biocompatible-biodegradable Amphiphilic Block Copolymers. *Polymers (Basel)*. 2005; 9642–9652.
- Cortês JA, Mavropoulos E, Hausen M et al. Methodological Implications on Quantitative Studies of Cytocompatibility in Direct Contact with Bioceramic Surfaces. *Key Eng. Mater.* 2011; 493–494: 325–330.
- Tsaryk R, Peters K, Unger RE et al. Improving cytocompatibility of Co28Cr6Mo by TiO₂ coating: gene expression study in human endothelial cells. 2013; 10(86).
- Kudriavtsev IV, Golovkin AS, Zurochka AV et al. Modern technologies and approaches to apoptosis studies in experimental biology. *Medical Immunology*. 2012; 14:461–82. In Russian: [Кудрявцев И. В., Головкин А. С., Зурочка А. В. и др. Современные методы и подходы к изучению апоптоза в экспериментальной биологии. *Медицинская иммунология*. 2012; 14:461–82].
- Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P. Mechanisms of phosphatidylserine Exposure a phagocyte recognition signal on apoptotic T-lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1995; 182:1597–1601.
- Idziorek T, Estaquier J, De Bels F et al. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *J. Immunol. Methods*. 1995; 185:249–258.
- Glisic-Milosavljevic S, Waukau J, Jana S et al. Comparison of apoptosis and mortality measurements in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using multiple methods. *Cell Prolif.* 2005; 38:301–311.
- Stokes L, Jiang LH, Alcaraz L et al. Characterization of a selective and potent antagonist of human P2X(7) receptors, AZ11645373. *Br J Pharmacol.* 2006; 149:880–887.

31. Yamamoto A, Mishima S, Maruyama N et al. Quantitative Evaluation of Cell Attachment to Glass, Polystyrene and Fibronectin Shear, or Collagen-coated Polystyrene by Measurement of Cell Adhesive Force and Cell Detachment Energy. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000; 114–124.
32. Ruggiero C, Mantelli M, Curtis A et al. Protein-surface Interactions: An Energy Based Mathematical Model. *Cell Biochem. Biophys.* 2005; 407–418.
33. Barbucci R, Pasqui D, Wirsén A et al. Micro- and Nano-structured Surfaces. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2003; 721–725.
34. Owen GR, Meredith DO, Gwynn AP et al. Focal Biocompatibility? Adhesion Quantification — A New Assay of Material: Review. *Eur. Cell Mater.* 2005; 85–96.
35. Manso M, Ogueta S, Perez-Riguero J et al. Testing Biomaterials by the In-situ Evaluation of cell Response. *Biomol. Eng.* 2002; 239–242.
36. Musilkova J, Kotelnikov I, Novotna K et al. Cell adhesion and growth enabled by biomimetic oligopeptide modification of a polydopamine-poly(ethylene oxide) protein repulsive surface. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2015; 26:1–13.
37. Biological Evaluation of Medical Devices, Part 3. ISO 10993 Tests Genotoxicity, Carcinog. Reprod. Toxicity. ISO Geneva, Switzerland. 1994.
38. Use of International Standard ISO 10993-1, “Biological evaluation of medical devices — Part 1: Evaluation and testing within a risk management process.” 2016.
39. Butte A. Use and Analysis of Microarray Data. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004; 951–960.
40. Carpenter AE, Sabatini DM. Systematic Genome-wide Screens of Gene Function. *Nat. Rev. Genet.* 2004; 11–22.
41. Washburn MP, Wolters D, Yates 3rd JR. Large-scale Identification, Analysis of the Yeast Proteome by Multidimensional Protein Technology. *Nat. Biotechnol.* 2001; 242–247.
42. Potnis PA, Tesfamariam B, Wood SC. Induction of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidase and apoptosis by biodegradable polymers in macrophages: implications for stents. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2011; 57:712–720.
43. Haghjooy Javanmard S, Anari J, Zargar Kharazi A et al. In vitro hemocompatibility and cytocompatibility of a three-layered vascular scaffold fabricated by sequential electrospinning of PCL, collagen, and PLLA nanofibers. *J Biomater Appl.* 2016; 31:438–449.
44. Lakshmanan R, Kumaraswamy P, Krishnan UM et al. Engineering a growth factor embedded nanofiber matrix niche to promote vascularization for functional cardiac regeneration. *Biomaterials.* 2016; 97:176–195.
45. Wood S, Hancock G, Tesfamariam B. Bioresorbable polymers and paclitaxel impair endothelial regeneration by induction of autophagy. *J Am Coll Cardiol.* 2015; 66:15_S.

Информация об авторах:

Викнянчук Алиса Николаевна, магистрант биологического факультета, Санкт-Петербургский государственный университет;

Мишанин Александр Игоревич, младший научный сотрудник, Институт молекулярной биологии и генетики, ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Твердохлебов Сергей Иванович, кандидат физико-математических наук, доцент, Национальный Томский политехнический университет;

Головкин Алексей Сергеевич, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник, Институт молекулярной биологии и генетики, ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Alisa N. Viknianshchuk, graduate student, Faculty of Biology, Saint-Petersburg State University;

Alexander I. Mishanin, junior research fellow, Institute of Molecular Biology and Genetics, Federal Almazov North-West Medical Research Centre;

Sergei I. Tverdokhlebov, PhD, associate professor, Tomsk National Polytechnic University;

Alexey S. Golovkin, PhD, MD, senior researcher, Institute of Molecular Biology and Genetics, Federal Almazov North-West Medical Research Centre.