

7. Рахматуллин Р. Р., Поздняков О. А. "Биопластический материал". Патент РФ №2367476 от 21.03.2008г.

8. Koizumi N., Cooper L. J., Fullwood N. J. et al. An evaluation of cultivated corneal limbal epithelial cells, using cell-suspension culture. Invest Ophthalmol Vis Sci 2002;43:2114-2121.

NEW TECHNOLOGY DEVELOPMENT FOR TISSUE ENGINEERING OF CORNEAL EPITHELIUM

¹Makeev O. G., ²Korotkich S. A., ³Rachmatullin R. R.,
¹Knyazeva E. S., ²Gerasimov M. Y., ¹Zvereva A. E.

1 – GDH SR "Institute of Medical Cell Technology"

2 – State educational institution of higher professional education "Ural State Medical Academy"

Ministry of health and social development
3 – State educational institution of higher professional education « Orenburg State University»
RF. Ekaterinburg; Orenburg

Treatment of corneal epithelial pathology associated with the violation of the regeneration of the epithelium is a topical issue of Ophthalmology. Currently, a promising method of treating such conditions is the transplantation of cultured ex vivo corneal epithelial progenitors in the matrix.

In this investigation shows that the biomaterial "Hyamatrix®" has compatibility with the culture of human corneal cells. On its surface under certain conditions, cultivation is possible to obtain multilayered epithelial sheets and tight intercellular junctions.

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ НАНОЧАСТИЦ РЕНТГЕНОКОНТРАСТНОГО ОРТОТАНТАЛАТА ИТРИЯ НА КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Макеев О.Г.^{1,2}, Коротков А.В.^{1,2}, Васильев В.Г.³, Осминин А.Г.⁴, Васильева М.С.^{1,2}

¹Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Уральская государственная медицинская академия"

Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

²ГУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий.

³ Государственное учреждение Институт химии твердого тела УрО РАН

⁴Общество с ограниченной ответственностью Научно производственная фирма «ВОСТЭП»
Россия, Екатеринбург

Контактный e-mail: larim@mail.ru

Применение рентгеноконтрастных веществ (РКВ) значительно увеличивают ценность лучевых методов в диагностике широкого спектра различных заболеваний человека и животных. Осознавая эту значимость, исследователи продолжают разработку новых, безопасных и эффективных РКВ. В настоящее время в России, ввиду недостаточности производственных мощностей отечественной фарминдустрии, в основном применяются импортные РКВ, что является сдерживающим фактором использования эффективных методов диагностики в нашей стране. При этом широко используемые йодсодержащие РКВ, несмотря на их постоянное совершенствование, не в полной мере удовлетворяют современным требованиям вследствие их токсического действия на клетки паренхиматозных органов.

Разработан и запатентован [1] высокоэффективный рентгеноконтрастный препарат, представляющий собой гель на основе дистиллированной воды, в которой содержится 3% ортотантала иттрия (ОТИ) и 1,5 % натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы. Важной составляющей технологии является эффективный способ получения ОТИ в наноразмерном диапазоне. На рис. 1. приведена микрофотография наночастицы ортотантала иттрия, полученная на электронном микроскопе DJM 2100 (Япония) в институте электрофизики УрО РАН. Согласно приведенным данным, размер наночастицы контрастного средства составляет 20÷40 нанометров.

Свойства препарата позволяют отнести его к новому классу средств, обладающих следующими характеристиками:

1) наноразмерный уровень действующего компонента дает возможность использовать препарат по тем же показаниям, как и истинный раствор соединений йода, применяемых в качестве РКВ;

2) достигнутое уменьшение размеров частиц независимо от материала, сопровождается большим поглощением рентгеновских лучей, что позволяет снизить дозу вводимого РКВ при сохранении эффективности.

В УрГМА были проведены доклинические испытания полученного препарата на животных, в которых было показано отсутствие острой токсичности и отрицательного действия на общее состояние подопытных животных.

Однако в настоящее время все чаще публикуются результаты исследований, свидетельствующие о том, что переход на наноразмерный уровень может сопровождаться не только появлением, но и усилением токсических свойств. Например, в работе Глушкова с соавт. [2] показаны токсические свойства наночастиц золота, выраженность которых тем сильнее, чем меньше размер частиц. Подобная закономерность продемонстрирована на наночастицах самой разнообразной химической природы. Было установлено, что токсичность наночастиц зависит не столько от массы или химического состава, сколько от совокупной площади поверхности частиц. Последнее дает основание для пересмотра известных данных о токсичности химических элементов и веществ, а так же методологии токсикологических исследований в целом. Учитывая отсутствие достаточной информации о токсичности наночастиц, неприменимость традиционного подхода для ее оценки и необходимость получения такой информации в кратчайшие сроки с целью стандартизации исследований и продуктов в этой области, ведущие экспертные организации для оценки токсичности наночастиц в первую очередь рекомендуют использовать исследования in vitro - на линиях клеток человека [4, 5, 6, 11, 12, 13]. В свою очередь, отсутствие токсикологического биоконтроля должно служить основанием для запрета производства.

хранения и применения вновь разрабатываемых образцов.

Это определило цель нашей работы, которая заключалась в исследовании токсичности наночастиц ортотанталата иттрия на культивируемых клетках человека.

Для оценки токсичности частиц ортотанталата иттрия были использованы фибробласты человека, как наиболее применимые для токсикологических исследований самых разнообразных субстанций [15]. Поскольку для наночастиц, имеющих в своем составе металлы, наиболее характерно поражение дыхательной цепи митохондрий, а для соединений иттрия - необратимое ингибирование митохондриальной лактат дегидрогеназы [14], в качестве метода оценки была избрана тест-система TOX 1 (Sigma, США), предназначенная для определения суммарной активности внутриклеточных дегидрогеназ [7] и TOX 7 (Sigma, США) для оценки активности лактат-дегидрогеназы [9]. Важно, что результаты этого метода оценки хорошо коррелируют с традиционными данными, получаемыми путем витальной микроскопии [15].

В работе были использованы клеточные линии фибробластов человека, полученные нами ранее [3]. После размораживания фибробласты инкубировали в среде DMEM (Sigma) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, глутамина (2,9 мг/мл), пенициллина (1000 ед/мл) и стрептомицина (1 мг/мл) в CO₂ инкубаторе (Sanyo, Япония) при 37 °C.

Культуральную среду меняли каждые 3 дня. Пассаж клеток производили раз в неделю. Подсчет числа клеток проводили при помощи анализатора Cobas micros (Roche).

С целью анализа возможного цитотоксического эффекта клетки помещали в 96 луночные планшеты с начальной плотностью 3000 клеток на одну лунку и инкубировали в CO₂ инкубаторе в течение 48 часов. Затем в каждую лунку, за исключением контрольных, вносили взвесь частиц ортотанталата иттрия в свежей среде DMEM (Sigma) в концентрации 20 мкг/мл или 100 мкг/мл [8, 10] и клетки вновь инкубировали в течение 8 суток со сменой среды каждые 3 дня. В сроки 1-8 суток жизнеспособность клеток оценивали при помощи избранных тест систем согласно прилагаемых протоколов. Фотометрию проводили при помощи вертикального фотометра Multiscan (Labsystems) при длине волны 570 (TOX1) и 490 нм (TOX7).

Как следует из представленных данных (табл. 1 и 2), прослеживается четко выраженная тенденция снижения оптической плотности культур, свидетельствующая как об уменьшении суммарной активности внутриклеточных дегидрогеназ (табл. 1), так и активности лактатдегидрогеназы (табл. 2). При этом и в том, и в другом случае наибольшая активность ферментов наблюдается в контрольных культурах и снижается при добавлении частиц ортотанталата иттрия по мере возрастания концентрации последних.

Вместе с тем следует отметить, что выявленная закономерность не является статистически значимой.

Одновременно, в период 1-8 суток культивирования рост клеток продолжался, - о чем свидетельствует нарастание оптической плотности от первых к восьмым суткам. Последнее характеризует выявленные нарушения как субкритические.

Таким образом, частицы танталата иттрия в концентрациях 20-100 мкг/мл не обладают значимой цитотоксической активностью в отношении культивируемых фибробластов человека в условиях *in vitro*.

Литература

1. Патент РФ № 2205030 Средство для рентгенологического исследования.
2. Глушкова А.В., Радиков А.С., Рембовский В.Р. Нанотехнологии и нанотоксикология - взгляд на проблему // «Методологические проблемы изучения и оценки био- и нанотехнологий (нановолны, частицы, структуры, процессы, биообъекты) в экологии человека и гигиене окружающей среды». Материалы пленума Научного совета по экологии человека и гигиене окружающей среды РАМН и Минздравоохранения Российской Федерации Под редакцией академика РАМН Ю.А. Рахманина, Москва, 2007.
3. Макеев О.Г., Улыбин А.И., Зубанов П.С. Отчет о трехлетних испытаниях аутологичных дермальных фибробластов для коррекции дефектов кожи //Ж-л Вестник Уральской медицинской академической науки. Екатеринбург, 2008 №4. С. 63-70
4. Approaches to Safe Nanotechnology Managing the Health and Safety Concerns Associated with Engineered Nanomaterials // NIOSH Publication. 2009-P.125.
5. Bonn, P. J. et al. The potential risks of nanomaterials: A review carried out for ECETOC. //Fibre Toxicol. 2006 V3, p 11-23.
6. Medina C, Santos-Martinez MJ, Radomski A, Corrigan OI, Radomski MW. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. //British Journal of Pharmacology 2007 V150, p 552-558.
7. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell IB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. //Cancer Res. 1987 Feb 15;V47(4), p 936-942.
8. Schubert David, Dargusch Richard, Raitano Joan, Chan Siu-Wai. Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective //Biochemical and Biophysical Research Communications V342, p 86-89.
9. Decker, T., Lohmann-Matthes, M-L. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. //J. Immunol. Methods 1998, V15, p 61-69.
10. Soto K.F, Carrasco A., Powell T.G., Garza K.M., Murr L.E., Comparative *in vitro* cytotoxicity assessment of some manufactured nanoparticulate materials characterized by transmission electron microscopy. //J. Nanoparticle Res. 2005, V7, p 145-169.
11. Braydich-Stolle Laura, Hussain Saber., Schlager John J, Hofmann Marie-Claude. In Vitro Cytotoxicity of Nanoparticles in Mammalian Germline Stem Cells //Tox. Sci. 2005, V88(2), p 412-419.
12. Monteiro-Riviere N.A., Ryman-Rasmussen J.P. Toxicology of nanomaterials. //in: Biological concepts and techniques in toxicology: an integrated approach. (Riviere JE, ed), London: 2006 Taylor & Francis, p. 217-33
13. SCIENTIFIC COMMITTEE ON EMERGING AND NEWLY IDENTIFIED HEALTH RISKS (SCENIHR). Modified Opinion (after public consultation) on The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies //10th plenary meeting of 10 March 2006, SCENIHR/002/05/2006, P 79.
14. Seishiro H., Naomi K., Keiko S. and Suzuki K.T. Distribution, localization, and pulmonary effects of yttrium chloride following intratracheal instillation into the rat. //Toxicology and Applied Pharmacology Volume 104, Issue 2, 15 June 1990, p 301-311.
15. Sujata K. B., Yetter A.B Correlation of visual *in vitro* cytotoxicity ratings of biomaterials with quantitative *in vitro* cell viability measurements //Cell Biology and Toxicology 2008, V. 24, Number 4, p315-319.

**INVESTIGATION OF TOXICITY OF
NANOPARTICLES RADIOPAQUE
ORTOTANTALATA
YTTRIUM ON CULTURED HUMAN CELLS**

**Makeev O.G., Korotkov A.V., Vasiliev V.G.,
Osminin A.G., Vasilieva M.S.**

State educational institution of higher professional education "Ural State Medical Academy"

*Ministry of health and social development
GDH SR "Institute of Medical Cell Technology"
Institute of Solid State Chemistry, UB RAS.
RF, Ekaterinburg.*

Society with the limited responsibility scientifically production firm "VOsTEP". RF, Ekaterinburg

In this paper we give an estimate of the toxicity of a new radiopaque substance.

Developed substance is a gel consisting of a yttrium orthotantalat nano-sized particles, carboxymethylcellulose and water.

Investigation of toxicity of nanoparticles performed on a model of culture of human fibroblasts in vitro. As an evaluation method used in test systems TOX 1 and TOX 7. It is established that nanoparticles ortotantalata yttrium concentrations of 20-100 micrograms/ml did not have significant cytotoxic activity against human fibroblasts.

**СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ СУСТАВНОЙ ПОВЕРХНОСТИ
ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫМИ КОНСТРУКЦИЯМИ**

Макеев О.Г., Обухов И.А., Помогаева Е.В.

*ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Минздрава России
ГУ СО «Институт медицинских клеточных технологий»
Россия, г. Екатеринбург*

Контактный e-mail: larim@mail.ru

Хрящевая ткань обуславливает способность суставов выдерживать статические и динамические нагрузки, а ее повреждение приводит к ограничению свободы движений и болевому синдрому. Регенеративные возможности хрящевой ткани ограничены и не позволяют в полной мере восстанавливать функциональную и анатомическую целостность, особенно при глубоких и распространенных дефектах.

Позитивный эффект консервативных методов лечения для восстановления суставной поверхности продемонстрирован только на начальных стадиях развития процесса при условии сохранения гистоархитектоники хрящевой ткани [2]. Тотальная артропластика эндопротезами, будучи крайней травматичной процедурой, выполняется при выраженных дегенеративных изменениях в суставе, когда надежда на восстановление собственного хряща отсутствует. Методом выбора, повышающим репаративные возможности хрящевой ткани, может стать хондропластика.

В современной травматологии и ортопедии используют разнообразные методы хондропластики, которые могут быть разделены на три основные группы [4, 14]:

1. методики «костномозговой стимуляции»;
2. трансплантация остеохондральных графтов (мозаичная пластика);
3. методы тканеинженерного восстановления суставного хряща.

В многих работах по хондропластике подчеркивается, что при использовании методов «костномозговой стимуляции», место дефекта заполняется волокнистой хрящевой тканью, деформационные и прочностные параметры которой значительно уступают таковым у нормального внутри-суставного хряща [1].

При мозаичной пластике дефект заполняется полноценной хрящевой тканью, взятой с ненагружаемых поверхностей сустава. Однако широкое использование метода в клинике, несмотря на обнадеживающие результаты лечения, при малых и средних по площади хондральных повреждениях, ограничено дефицитом пластического материала [14].

В свою очередь, методы тканеинженерного восстановления суставной поверхности потенциально дают возмож-

ность воссоздания гиалиновой хрящевой ткани со свойствами нативной, что позволяет избежать недостатков, присущих мозаичной пластике [9]. Далее представлена классификация способов восстановления хрящевой ткани с использованием технологий тканевой инженерии.

Классификация методов тканевой инженерии хрящевой ткани по пространственному ориентированию клеток

1. методы первого поколения – культивирование клеток в 2-х мерной культуре (in vitro – АС1, in vivo – АМІС на матрице, индуцирующей аутохондрогенез);

2. методы второго поколения – культивирование клеток с поддержкой трехмерной пространственной ориентации: а) тканеинженерные конструкции с матрицами - носителями (in vitro – МАС1 – матрица ассоциированный аутохондрогенез);

б) ТК б МН in vitro – тканеинженерные конструкции без матриц-носителей (метод «pellet-культуры»).

Методы имплантации аутохондроцитов первого поколения

К методам первого поколения относится применение жидкой суспензии клеток, которая вносится в дефект суставной поверхности, предварительно покрытый мембраной. В качестве мембраны используют надкостницу или биоматериалы (Chondro Gide – Geitlich Biomaterials, или Carticel – Genzyme Biosurgery). Методика применяется в клинике с удовлетворительными отдаленными результатами. Однако способ имеет два значимых недостатка: потеря клетками своего фенотипа при их культивировании в двухмерной культуре и сложность управления жидкой суспензией во время операции [7]. Как вариант решения проблемы предложена процедура АМІС (индуцированный аутохондрогенез), представляющая собой одноэтапную операцию, основанную на регенеративном потенциале собственных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) костного мозга, поступающих в область дефекта из произведенной хирургическим путем микротравматизации субхондральной кости. Хондрогенный потенциал ММСК поддерживается мембраной Chondro Gide.