

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 615.46.03:616.314-089.28].015.44

Узунян Н.А., Адамчик А.А., Бронштейн Д.А., Лернер А.Я., Гришкова Н.О., Тихонов А.И., Повстянко Ю.А.

### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФИБРОБЛАСТОВ С ПРОТЕТИЧЕСКИМИ МАТЕРИАЛАМИ

ФГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации ФМБА России», 125371, Москва

*Проведено экспериментальное изучение биосовместимости основных протетических материалов в клеточной культуре фибробластов человека. Выявлено негативное влияние на морфологию клеток хромокобальтового сплава, материала для съемных протезов на основе полиметилметакрилата, композита светового отверждения.*

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** фибробласты; клеточная культура; протетические материалы.

**Для цитирования:** *Российский стоматологический журнал. 2015; 19(5): 4–6.*

*Uzunyan N.A., Adamchik A.A., Bronshteyn D.A., Lerner A.Ya., Grishkova N.O., Tikhonov A.I., Povstyanko Yu.A.*

#### INTERACTION OF FIBROBLASTS WITH PROSTHETIC MATERIALS

«Institute for Advanced Studies of FMBA of Russia», 125371, Moscow, Russia

*Experimental study of the biocompatibility of the main prosthetic materials in cell culture of human fibroblasts. It revealed a negative effect on cell morphology hromokobaltovogo alloy material for dentures, based on polymethylmethacrylate, light-cured composite.*

**К e y w o r d s:** fibroblasts; cell culture; prosthetic materials.

**Citation:** *Rossiyskiy stomatologicheskij zhurnal. 2015; 19(5): 4–6.*

Организм человека все в большей степени подвергается психологическим и экологическим нагрузкам, способствующим искажению реактивности иммунной и эндокринной систем. На этом фоне материалы имплантатов и зубных протезов могут вызывать нетипичные аллергические и токсикохимические реакции. В связи с этим актуальны сравнительные исследования биосовместимости стоматологических материалов с использованием тонких методов оценки их токсичности в клеточных культурах, в частности фибробластов человека.

#### Материал и методы

Из коллекции культур тканей НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского выбраны нормальные клетки фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ-Т). Для культивирования использовали среду Игла (производства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова).

Для изучения биосовместимости и влияния на ростовую активность клеток ФЭЧ-Т стоматологических материалов применяли метилтетразолиевый тест (МТТ). МТТ – колориметрический тест, который является биологическим стандартом и рекомендован в этом качестве для оценки цитотоксического действия различных чужеродных веществ на клетки. Тест основан на прямой коррекции количества жизнеспособных клеток и интенсивности метаболизма специального реактива МТТ до водорастворимого темноокрашенного формазана под действием митохондриальной сукцинатдегидрогеназы (мертвые клетки и клетки со сниженной жизнеспособностью такой способностью не обладают). Последующая фотометрия растворенного с помощью диметилсульфоксида (ДМСО) формазана позволяет точно сопоставить изменение оптической плотности (ОП) раствора по отношению к контролю с изменением количества жизнеспособных клеток, а

в цитотоксических исследованиях оценить специфическую гибель клеток, индуцированную тем или иным цитотоксическим агентом. Предварительно отмые и автоклавированные образцы исследуемых материалов укладывали в лунки 24-луночного планшета Costar (США). Суспензию клеток в посевной дозе  $13 \cdot 10^5$  кл/мл в среде Игла с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (НПО «ПанЭко», Москва) вносили в каждую лунку планшета. Планшеты с образцами и клетками инкубировали в термостате с  $\text{CO}_2$  при  $37^\circ\text{C}$  в течение 48 ч. После инкубации культуральную среду удаляли и проводили МТТ [1–3]. Культуральную среду отсасывали из лунок, добавляли по 1 мл среды с 200 мкл МТТ (3[4,5-диметил-тиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия, «Sigma») в исходной концентрации 5 мг/мл и инкубировали в течение 4 ч. Затем среду с МТТ удаляли и добавляли по 1 мл ДМСО для растворения образовавшихся кристаллов формазана. Осадок клеток ресуспендировали в течение 5 мин пипетированием. Жизнеспособность клеток оценивали по интенсивности окраски раствора, измеряя ОП при длине волны 545 нм фотометра Immunochem 2100 (США) (см. рисунок).

Подсчет выросших клеток, определение их размера и объема в виде гистограммы производили с помощью ручного автоматизированного счетчика клеток пипетки Scepter Millipore (Германия), которая позволяет получить данные о популяции клеток, концентрации, распределении по размеру и объему. Инкубацию фибробластов выполняли в течение 96 ч. Затем монослой выросших на дне лунок клеток изучали визуально в световом микроскопе Olympus СКХ41 (Япония), снимали смесью 0,02% Версена–Химопсина и разводили в 1 мл среды Игла для подсчета пипеткой Scepter Millipore.

Для изучения морфологии клеток, характера их прикрепления к субстрату прибегали к окрашиванию акридином оранжевым. При взаимодействии с чистыми нуклеиновыми кислотами акридиновый оранжевый образует комплексы, флюоресцирующие зеленым при связывании с ДНК и красным при связывании с РНК. После инкубации в течение 96 ч удаляли культуральную среду, лунки промывали дважды 1 мл фосфатного буфера и добавляли по 1 мл 95% спирта.

**Для корреспонденции:** Узунян Нарине Адольфовна, uzunyan.narina@mail.ru

**For correspondence:** Uzunyan Narine Adolfofna, uzunyan.narina@mail.ru

Таблица 1. Определение влияния на ростовую активность и жизнеспособность клеток ФЭЧ-образцов с помощью МТТ

Образец и его положение	ОП 545 нм	Разность с контролем, %
Титан Grade 4	0,727 ± 0,087	+4,8
Никелид титана	0,657 ± 0,07	-5,1
Титан-ниобий-циркониевый сплав	0,679 ± 0,016	-1,9
Титан-ниобий-танталовый сплав	0,619 ± 0,011	-10,6
Хромокобальтовый сплав	0,767 ± 0,095	+ 9,8
Диоксид циркония для каркасов несъемных протезов	0,741 ± 0,047	+6,6
Прессованная керамика	0,620 ± 0,053	-10,4
Диоксид циркония для дентальных имплантатов	0,749 ± 0,09	+7,6
Композит светового отверждения	0,496 ± 0,098	-28,3
Материал для съемных протезов на основе нейлона	0,650 ± 0,027	-6,1
Материал для съемных протезов на основе полиметилметакрилата	0,567 ± 0,061	-18,1
Контроль клеток	0,692 ± 0,071	

Через 15 мин удаляли спирт и высушивали лунки. Затем добавляли по 1 мл 0,01% акридинового оранжевого на 10 мин, отмывали дважды 1 мл фосфатного буфера. Покровные стекла с окрашенными клетками вынимали и изучали во флюоресцентном микроскопе Opton Axioskop (Германия).

Исследовали следующие материалы известных фирм производителей:

Таблица 2. Определение среднего размера и объема клеток с помощью автоматического счетчика клеток Scepter Millipore

Образец и его положение	Показания пипетки Scepter Millipore			
	средний объем, пл	средний диаметр, мкм	концентрация, кл/мл	соотношение клеток образец/контроль, %
Контроль клеток	3,38	18,63	6,78·10 <sup>4</sup>	
Титан Grade 4	2,86	17,62	9,21·10 <sup>4</sup>	+135,8
Никелид титана	2,65	17,18	7,64·10 <sup>4</sup>	+112,7
Титан-ниобий-циркониевый сплав	2,44	16,71	9,64·10 <sup>4</sup>	+142,2
Титан-ниобий-танталовый сплав	1,45	14,06	6,96·10 <sup>4</sup>	+102,7
Хромокобальтовый сплав	2,46	16,76	4,22·10 <sup>4</sup>	-62,2
Диоксид циркония для каркасов несъемных протезов	2,95	17,80	6,34·10 <sup>4</sup>	-93,5
Прессованная керамика	2,18	16,09	5,99·10 <sup>4</sup>	-88,4
Диоксид циркония для дентальных имплантатов	2,7	17,27	6,11·10 <sup>4</sup>	-90,1
Материал для съемных протезов на основе нейлона	3,02	17,93	5,43·10 <sup>4</sup>	-80,1
Материал для съемных протезов на основе полиметилметакрилата	2,8	17,52	4,88·10 <sup>4</sup>	-72,0

- титан Grade 4;
- титан-ниобий-циркониевый сплав;
- титан-ниобий-танталовый сплав;
- никелид титана;
- хромокобальтовый сплав;
- диоксид циркония для каркасов несъемных протезов;
- диоксид циркония для дентальных имплантатов;
- прессованную керамику;
- композит светового отверждения;
- материал для съемных протезов на основе полиметилметакрилата;
- материал для съемных протезов на основе нейлона.

### Результаты

В опытах на биосовместимость установлено, что влияние на ростовую активность ФЭЧ-Т с помощью МТТ все образцы (за исключением композита светового отверждения) через 24 ч инкубации не оказывали токсического влияния на клетки, поскольку показатели не выходили за пределы 20% разницы с показателями контрольного образца (табл. 1). Однако обращает на себя внимание заметная разница с контролем, характерная не только для светоотверждаемого композита (-28,3%), но и для материала для съемных протезов на основе полиметилметакрилата (-18,1%).

При изучении морфологии клеток после 96 ч инкубации большинство материалов не утратило ростовую активность клеток, а сами фибробласты не отличались от контроля. В то же время выявлен процесс дегенерации клеток ФЭЧ, что выражалось в округлении клеток, их укорачивании и откреплении от пластика на дне лунки, в присутствии хромокобальтового сплава, материала для съемных протезов на основе полиметилметакрилата и композита светового отверждения (табл. 2; рис. 2). Так, концентрация клеток в присутствии указанных материалов составляла в сравнении с контрольной соответственно 62,2, 72, 64,3%.

После окрашивания клеточной культуры акридиновым оранжевым клетки контроля флюоресцировали в ультрафиолетовом свете желтым цветом, максимально при 550 нм, ядро клеток испускало яркую флюоресценцию, цитоплазма тоже излучала свечение. Клеточная культура в присутствии хромокобальтового сплава, материала для съемных протезов на основе полиметилметакрилата и композита светового отверждения испускали флюоресцентный свет меньшей интенсивности (рис. 3).

### Заключение

Возможности современных методов изучения биосовместимости стоматологических материалов, в частности в клеточной культуре фибробластов человека, позволяют дифференцировать материалы по степени воздействия на клетки. В данном экспериментальном исследовании удалось выявить определенное негативное воздействие на фибробласты человека таких материалов, как хромокобальтовый сплав, материал для съемных протезов на основе полиметилметакрилата и композит светового отверждения.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Грудянов А.И., Ерохин А.И., Миронова Л.Л., Коношко О.И. Лабораторное исследование активности фибробластов в сочетании с различными видами подсадочных материалов in vitro. *Цитология*. 2001; 43(9): 854.
2. Макаренков А.С., Терехов С.М., Калашникова Е.А., Смирнова Т.Д. Изучение вариабельности интенсивности метаболизма МТТ в культуре клеток при оценке пролиферации и гибели клеток с помощью МТТ-теста. *Цитология*. 2003; 45(9): 899.
3. Подчерняева Р.Я., Суетина И.А., Михайлова Г.Р., Лопатина О.А., Бобринский И.И., Морозов Р.А., Селезнев А.С. Культивирование перевиваемых клеточных линий на подложках из углеродных нанотрубок и влияние электростимуляции на пролиферацию клеток. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57(5): 46–8.

Поступила 28.08.15

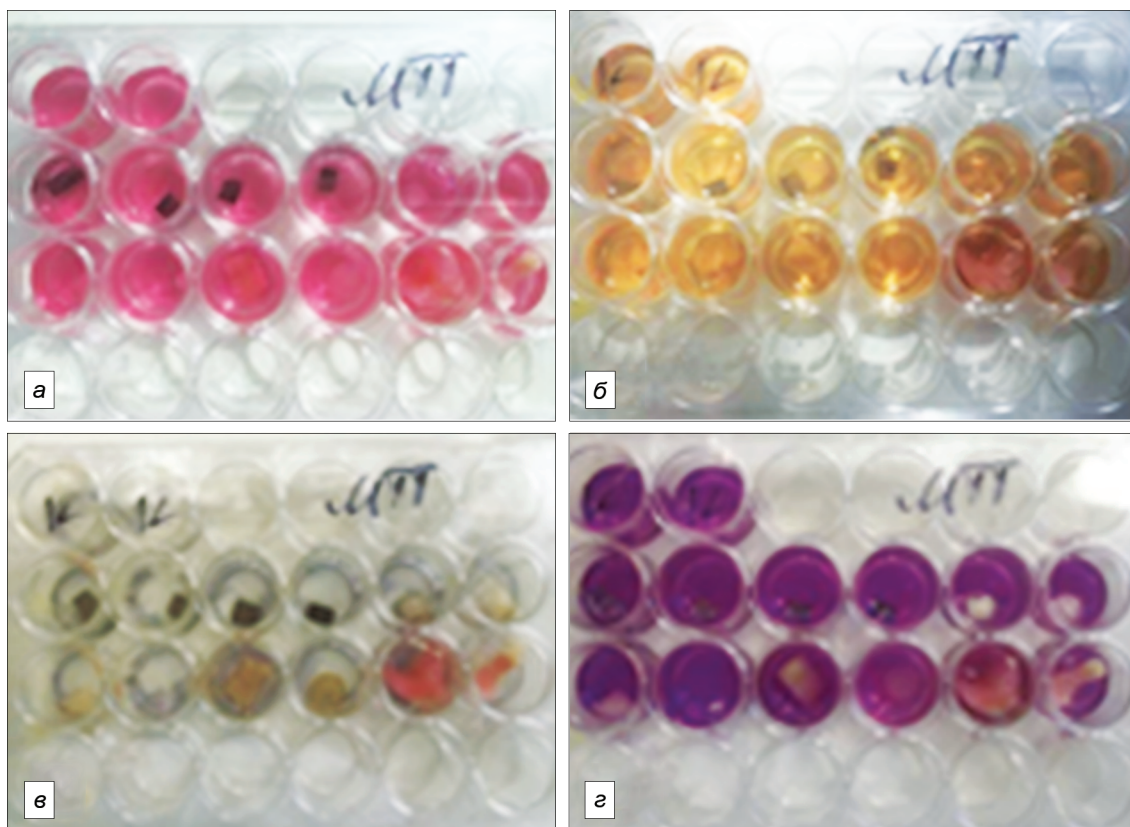


Рис. 1. Последовательность проведения МТТ в клеточной культуре фибробластов.  
*a* – клеточная суспензия с образцами материалов в 24-луночном планшете; *б* – клетки в среде МТТ через 4 ч инкубации; *в* – окрашенные формазаном клетки на дне лунок после удаления среды с МТТ; *г* – растворение кристаллов формазана после добавления 1 мл ДМСО в лунки с клетками и образцами.

Рис. 2. Гистограмма показателей автоматического счетчика клеток Scepter Millipore.

Здесь и на рис. 3: *a* – контроль, *б* – в присутствии композита светового отверждения.

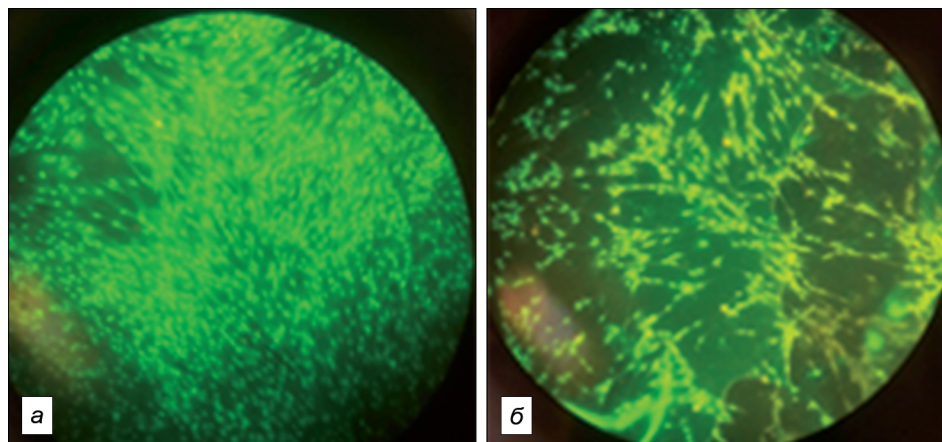
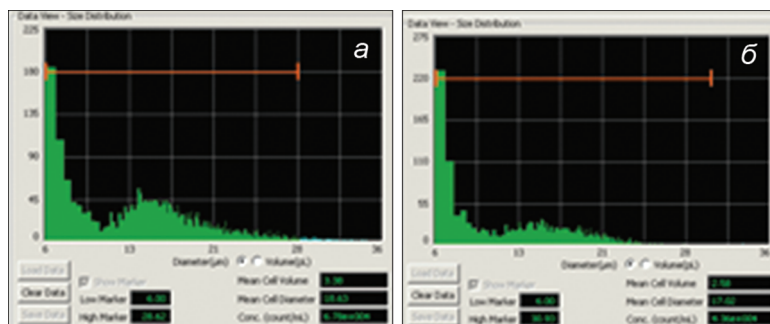


Рис. 3. Клеточная культура ФЭЧ-Т через 96 ч инкубации (окрашивание акридиновым оранжевым).