



Пятая международная конференция

**ФИЗИКА —  
НАУКАМ О ЖИЗНИ**

Санкт-Петербург • 16–19 октября • 2023



# Методические подходы к проведению доклинических исследований *in vitro* материалов биомедицинского назначения

М.Н. Егорихина, Д.Д. Линькова, Ю.П. Рубцова, И.Н. Чарыкова, И.И.  
Кобякова, Е.А. Фарафонтова, Чесноков С.А., Р.С. Ковылин, Д.Я. Алейник

ФГБОУ ВО ПИМУ Минздрава России  
2023

# Материалы в медицине

## Назначение:

- создание имплантатов
- тканевая инженерия
- раневые покрытия
- медицинские изделия предполагающие прямой контакт с тканями пациента

- металлоконструкции
- биокерамика
- отверждаемые синтетические полимеры

- децеллюляризованные матриксы
- гидрогели (синтетические/природные )

# ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

**ГОСТ ISO 10993-5-2011 Часть. 5. «Исследования на цитотоксичность: методы in vitro»**

Дата введения 2013-01-01

Стандарт подготовлен на основе применения ГОСТ Р ИСО 10993-5-2009

Дата введения 2010-09-01

качественные тесты на цитотоксичность:  
прямой контакт, элюирование мембран, метод диффузии на фильтре

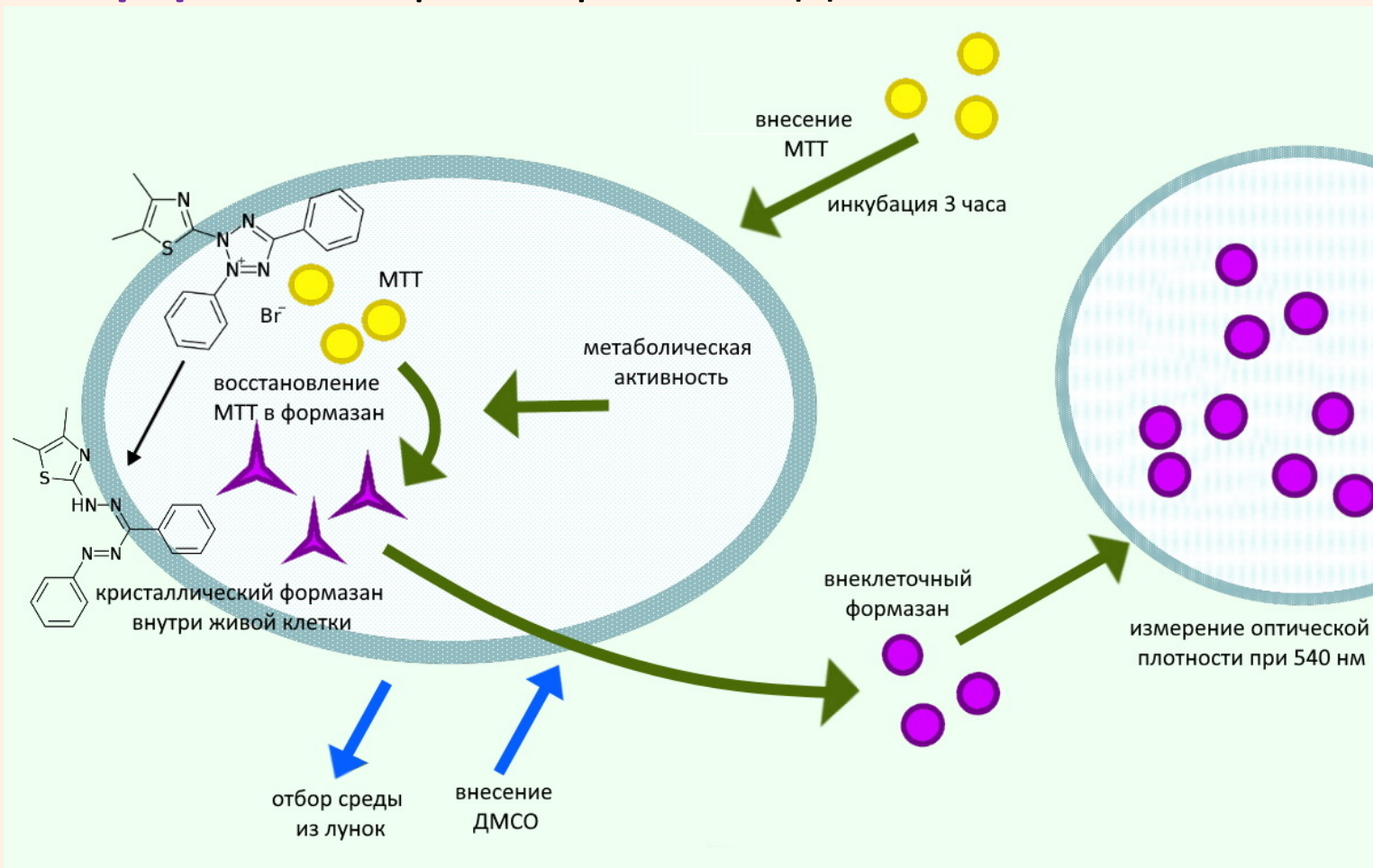
**Приложение стандарта ISO 10993-5:2009 - ANSI/AAMI/ISO 10993-5:2009**

Качественные тесты на цитотоксичность (прямой контакт, элюирование мембран, диффузия агара) подходят для целей скрининга, и что **количественная оценка предпочтительнее.**

**МТТ-тест**

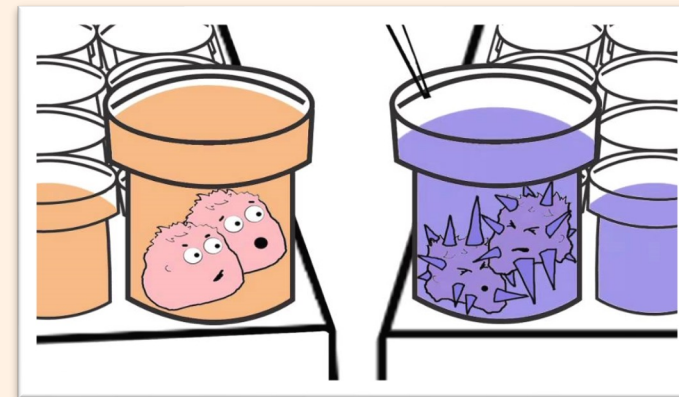
# МТТ-тест

- **МТТ тест** – это колориметрический анализ, в основе которого лежит реакция восстановления **тетразолиевого красителя (МТТ)** митохондриальной сукцинатдегидрогеназой в **пурпурно-синие внутриклеточные кристаллы МТТ-формаза** растворимые в ДМСО.

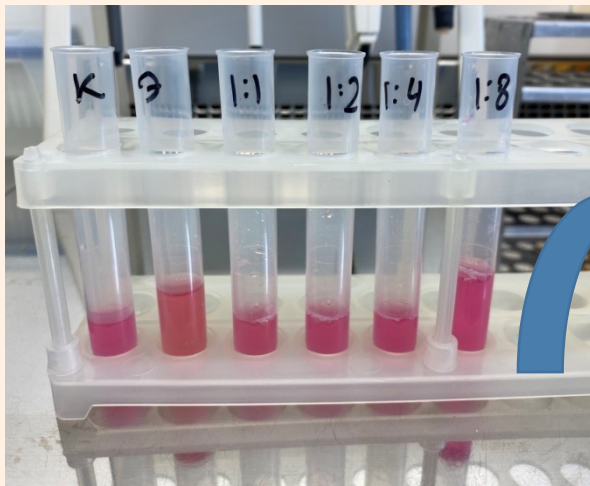


**реакция катализируется  
ТОЛЬКО ЖИВЫМИ КЛЕТКАМИ**

**МОЖНО КОЛИЧЕСТВЕННО  
определить процент  
ЖИВЫХ КЛЕТОК**



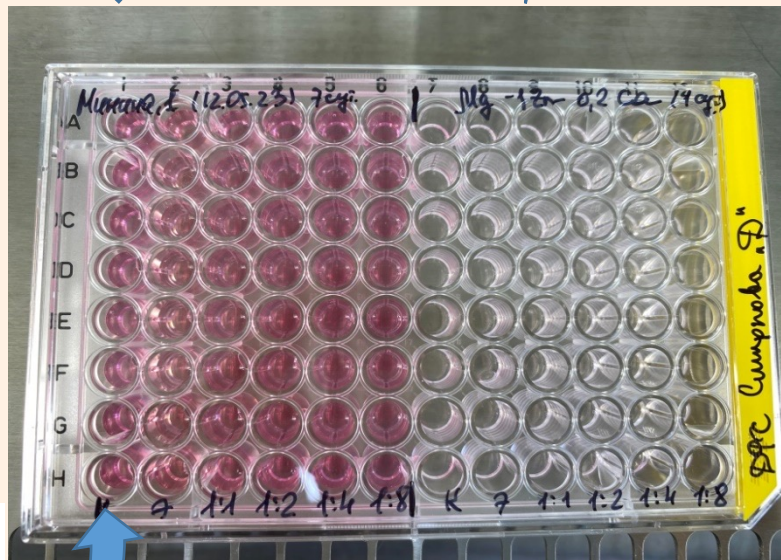
# MTT-тест



- Жидкие образцы
- Экстракты (1 и 7 суток) от твердых образцов

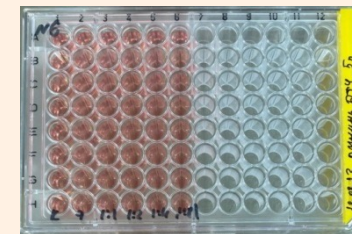
- ✓ контроль
- ✓ экстракт
- ✓ разведения экстракта

каждый в 8 повторностях

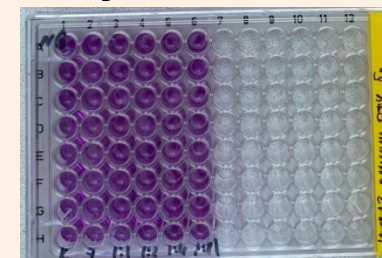


культивирование 72 часа

внесение раствора МТТ



инкубация 3 часа



измерение оптической плотности при 540 нм



## Культура клеток

ДФЧ 4-6 пассажа  
МСК 3-4 пассажа  
Жизнеспособность более 95%



# МТТ-тест - анализ полученных результатов

- Относительную интенсивность роста определяют по следующей формуле: 
$$\text{ОИР}(\%) = \frac{\text{средняя ОП в тестовой культуре}}{\text{средняя ОП в контроле}} \times 100$$

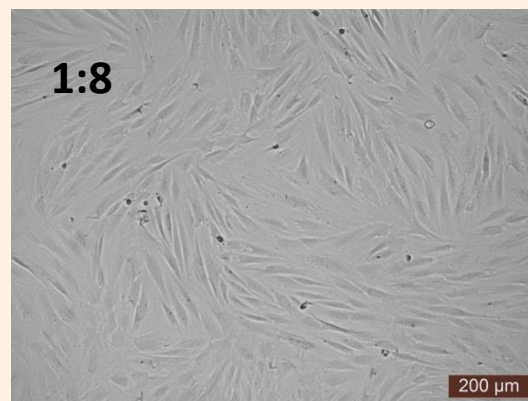
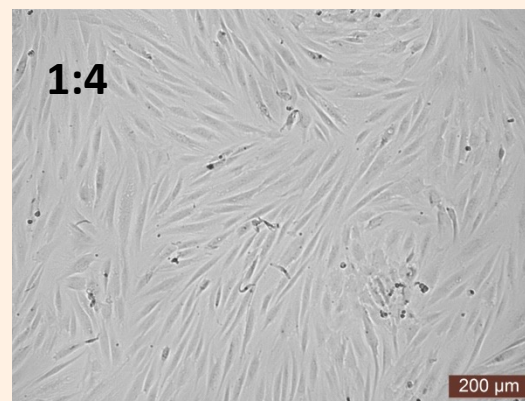
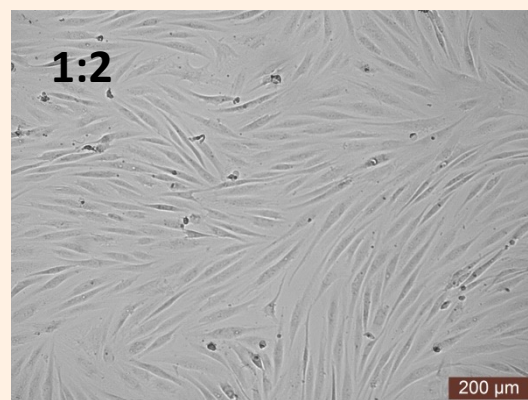
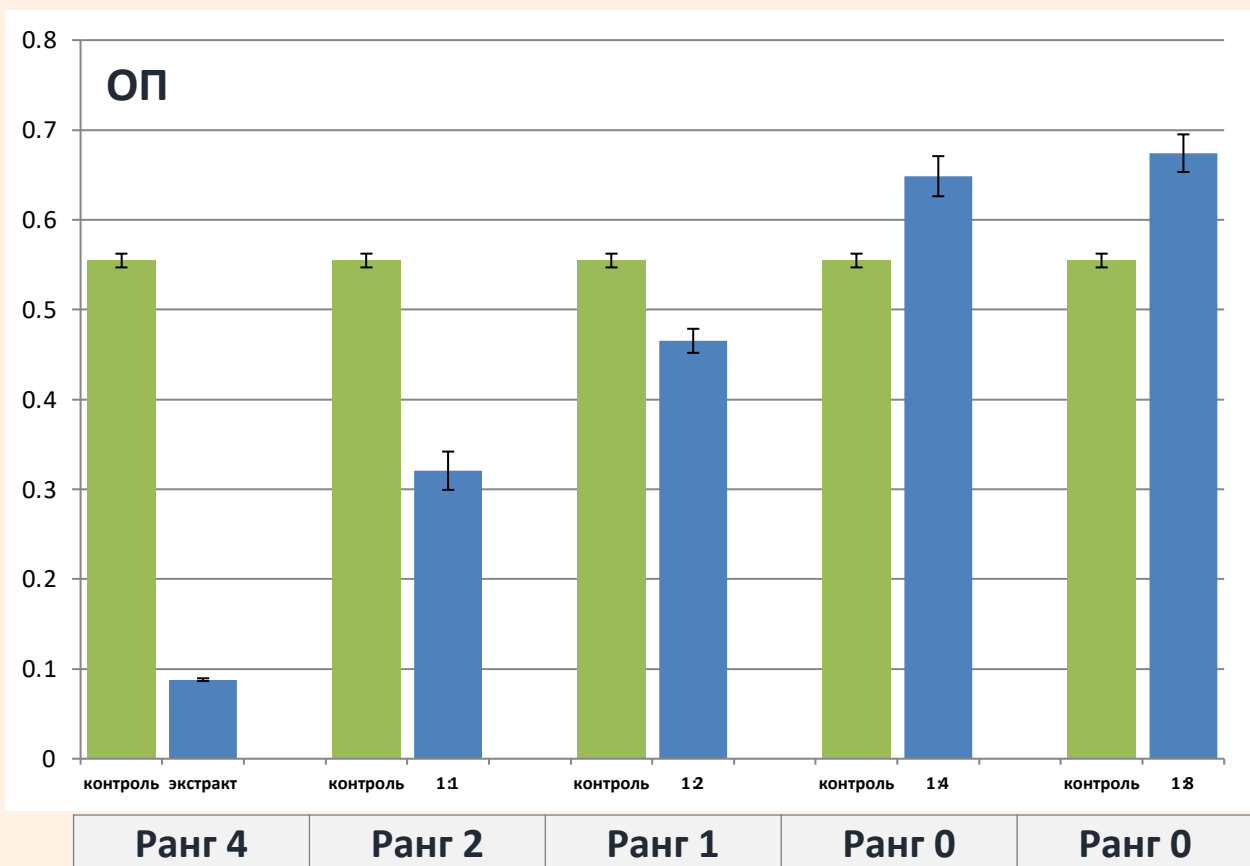
## Шкала оценки цитотоксичности

Относительная интенсивность роста (ОИР)	Ранг цитотоксичности	Характеристика
100	0	Отсутствие цитотоксичности
75 – 99	1	Отсутствие цитотоксичности
50 – 74	2	Легкая степень цитотоксичности
25 – 49	3	Средняя степень цитотоксичности
1 – 24	4	Выраженная цитотоксичность
0	5	Выраженная цитотоксичность

**Нужен ли  
микроскопический  
контроль состояния  
клеток???**

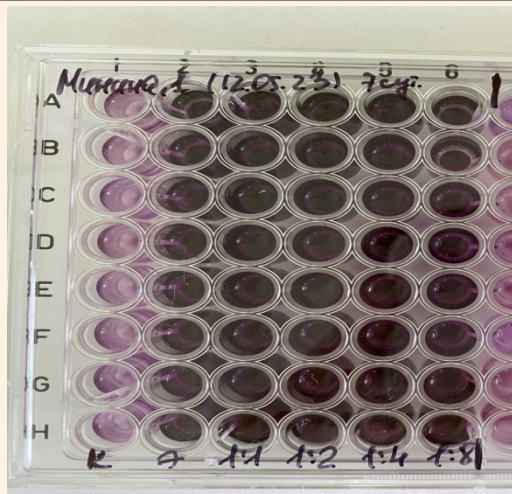
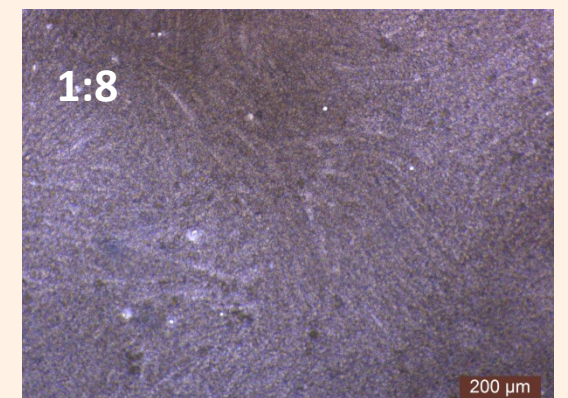
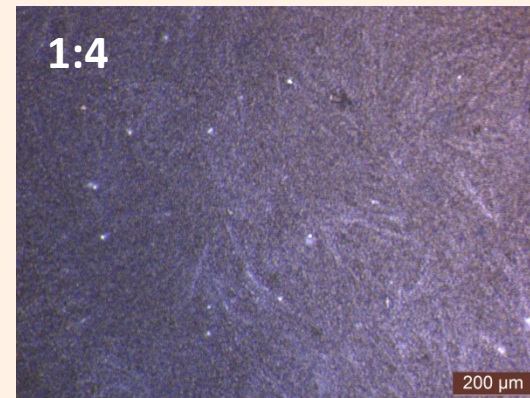
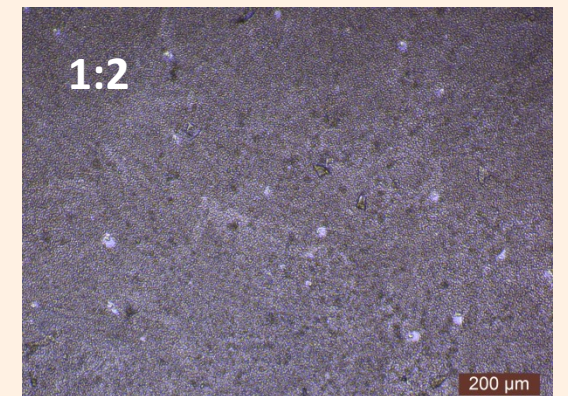
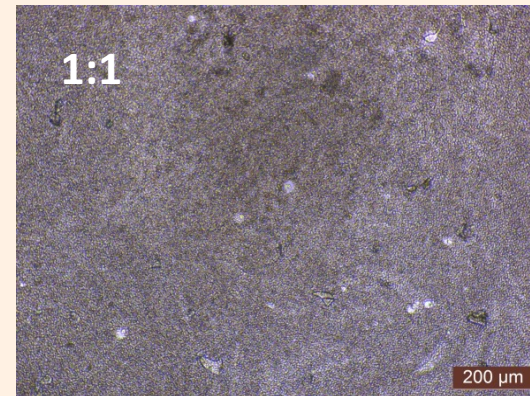
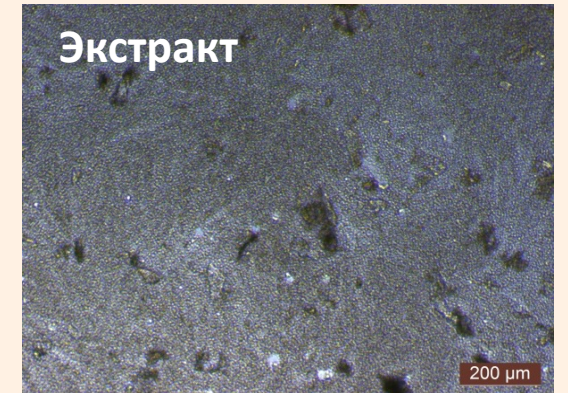
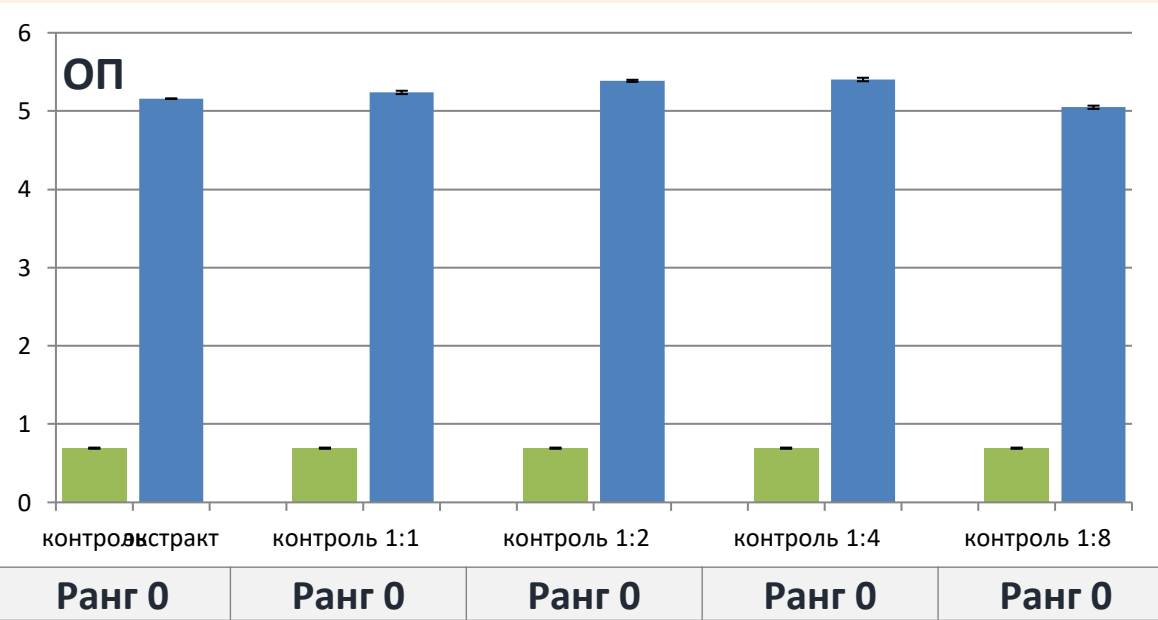
# МТТ-тест - анализ полученных результатов

Образец №1 – коммерческое раневое покрытие  
(экстракт 7 суток)



# Артефакты при постановке МТТ-теста

Образец №2 – сополимер ДМА и ПЛА (экстракт 24 часа)

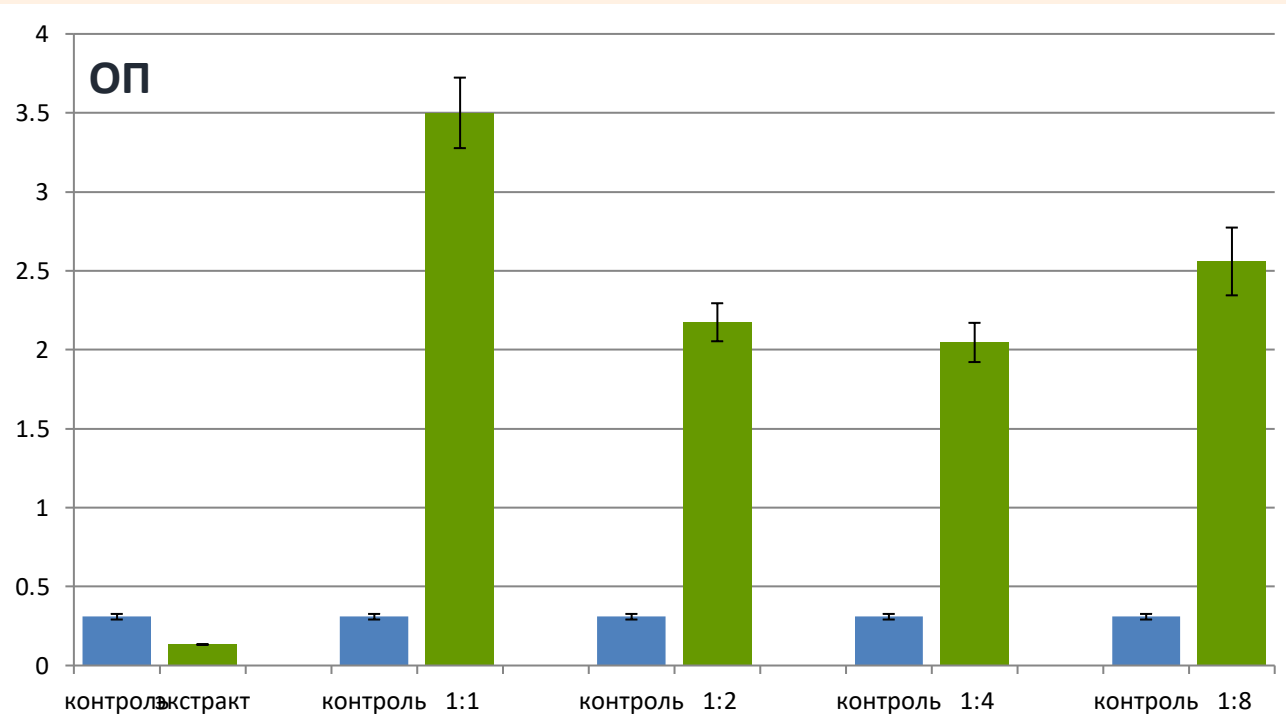


**Наличие микрочастиц вступающих в реакцию с МТТ**

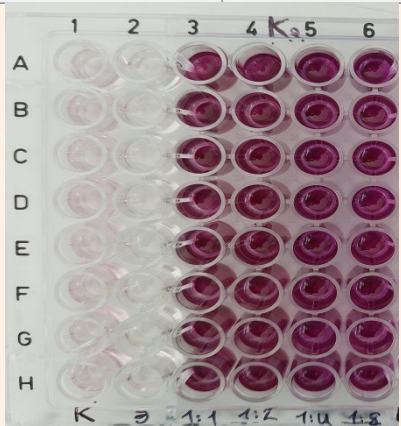


# Артефакты при постановке МТТ-теста

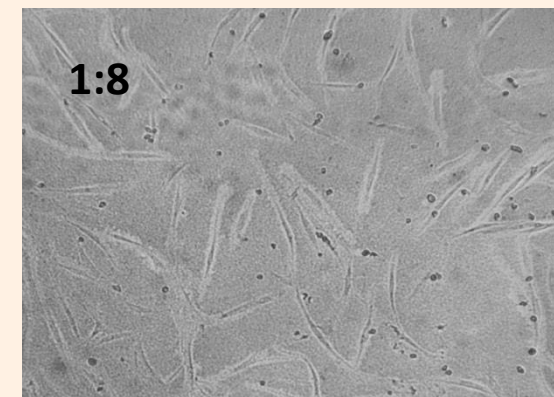
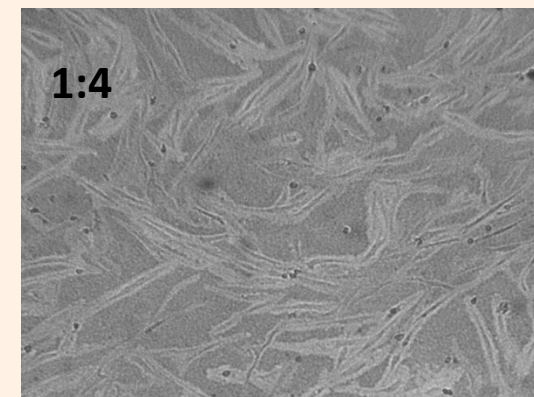
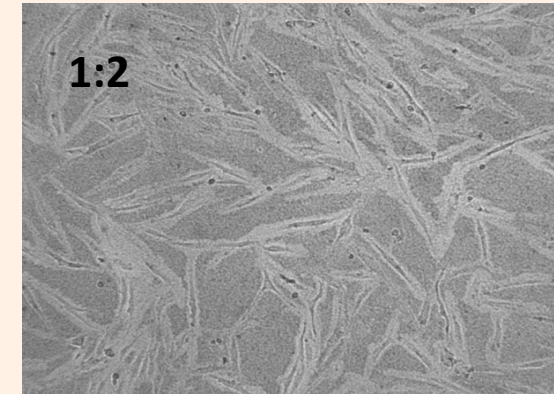
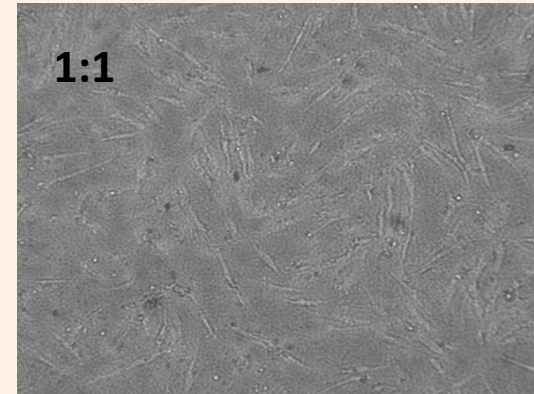
Образец №3 – биосинтетический сополимер (раствор)



Ранг 3      Ранг 0      Ранг 0      Ранг 0      Ранг 0

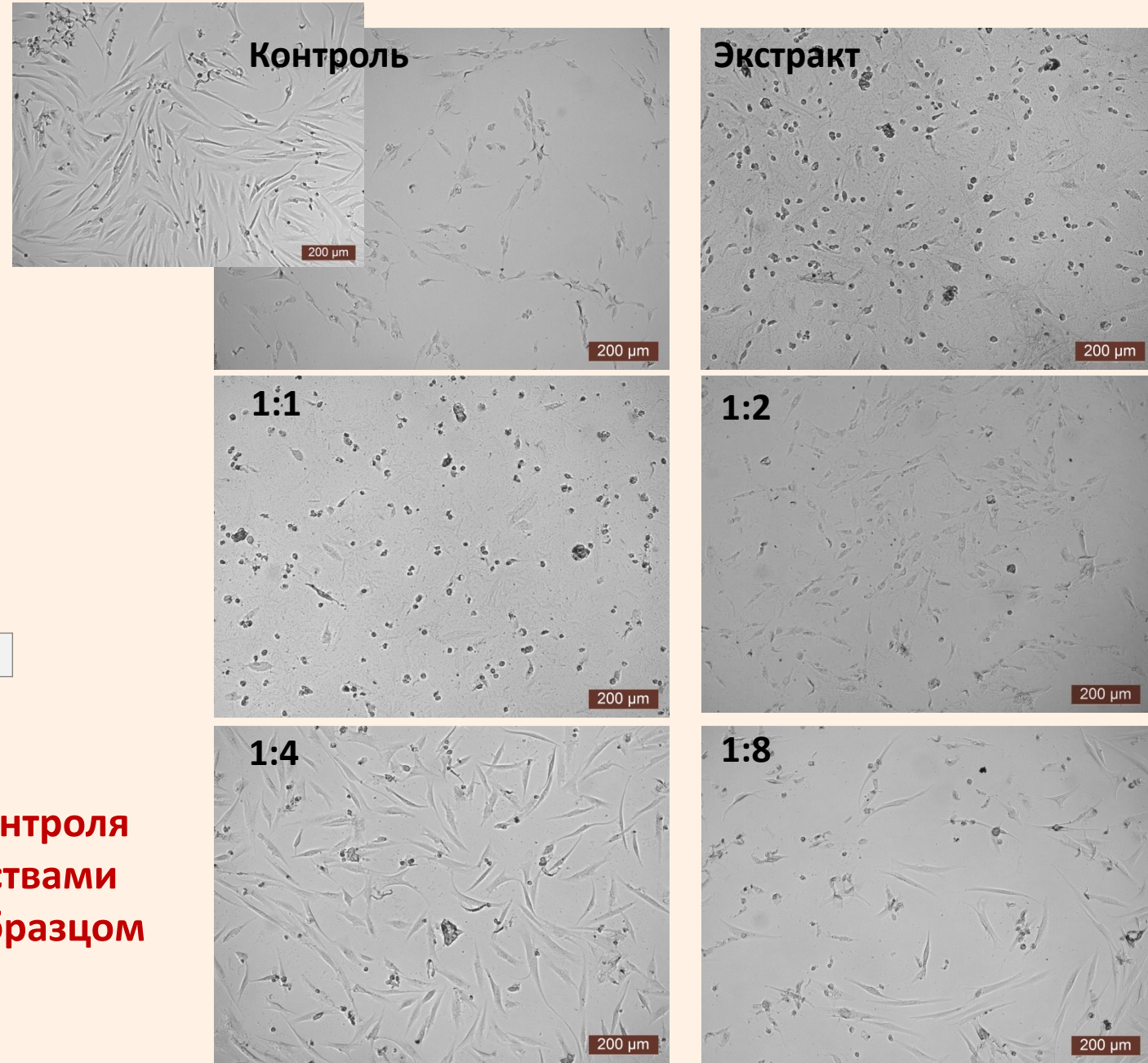
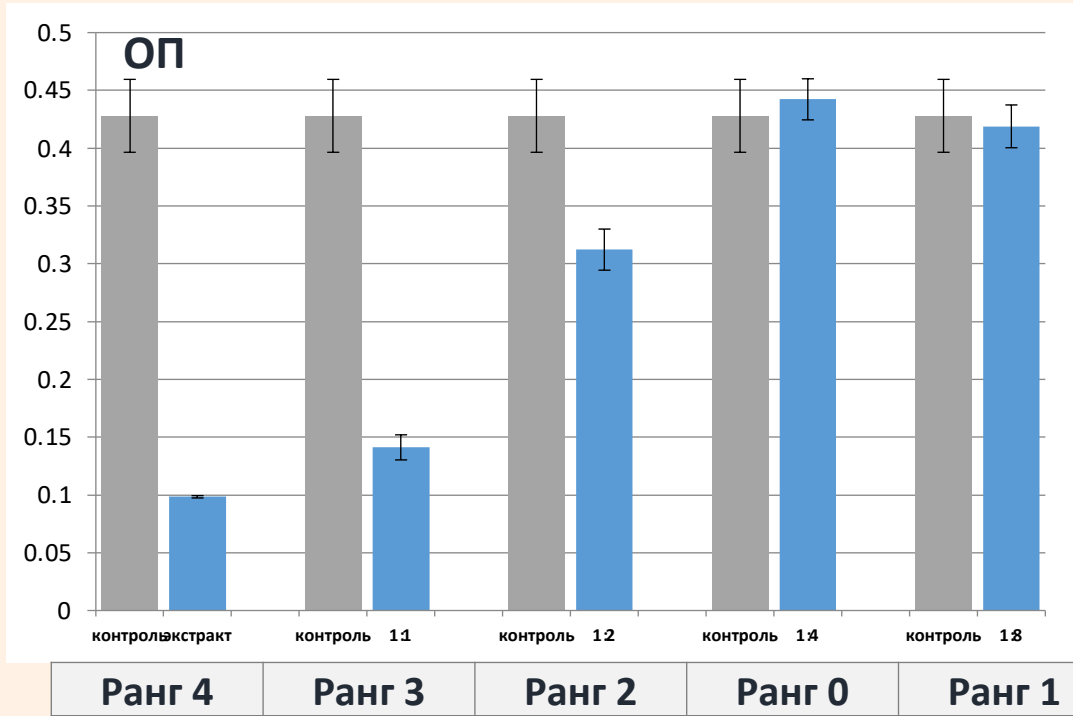


**Наличие микрочастиц вступающих в реакцию с МТТ оседающих на клетки**



# Артефакты при постановке МТТ-теста

Образец №4– полимер (раствор)



Контроль до введения образца

**Токсирование контроля летучими веществами выделяемыми образцом**

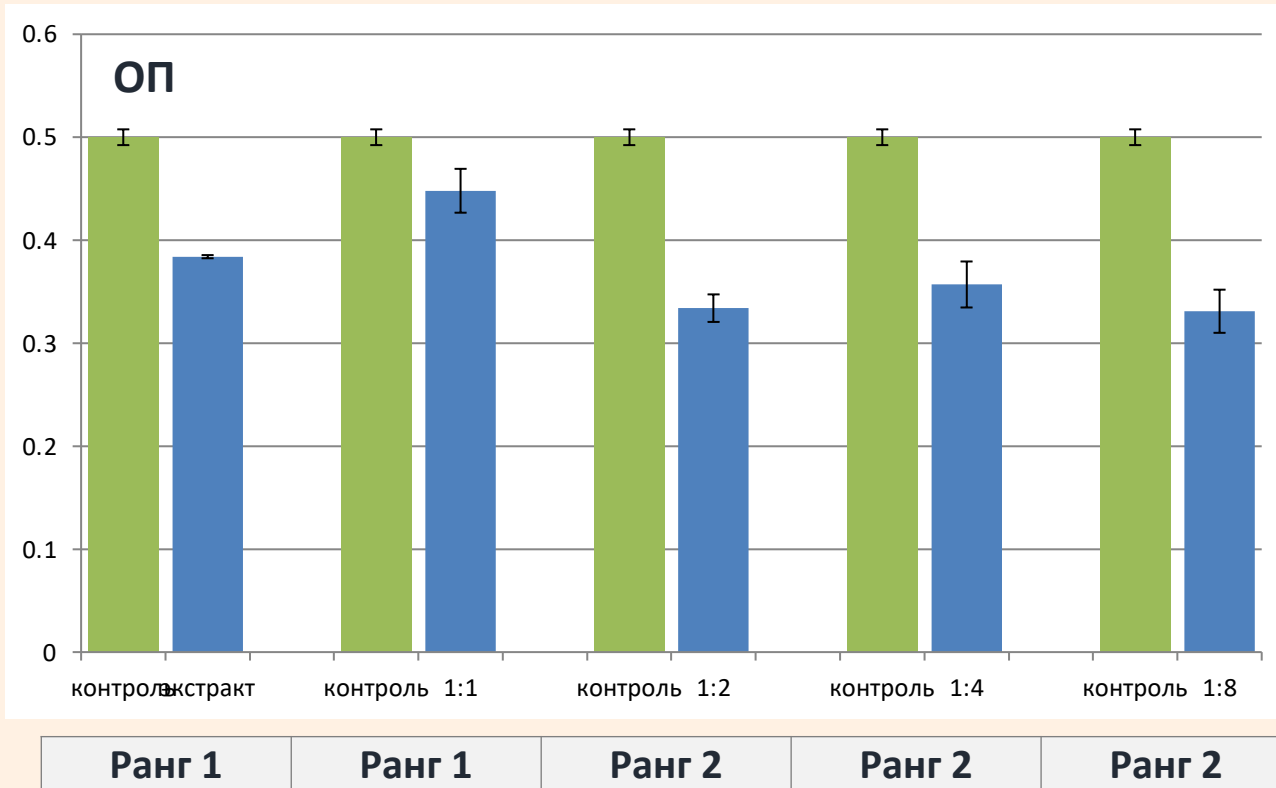
200 µm

200 µm

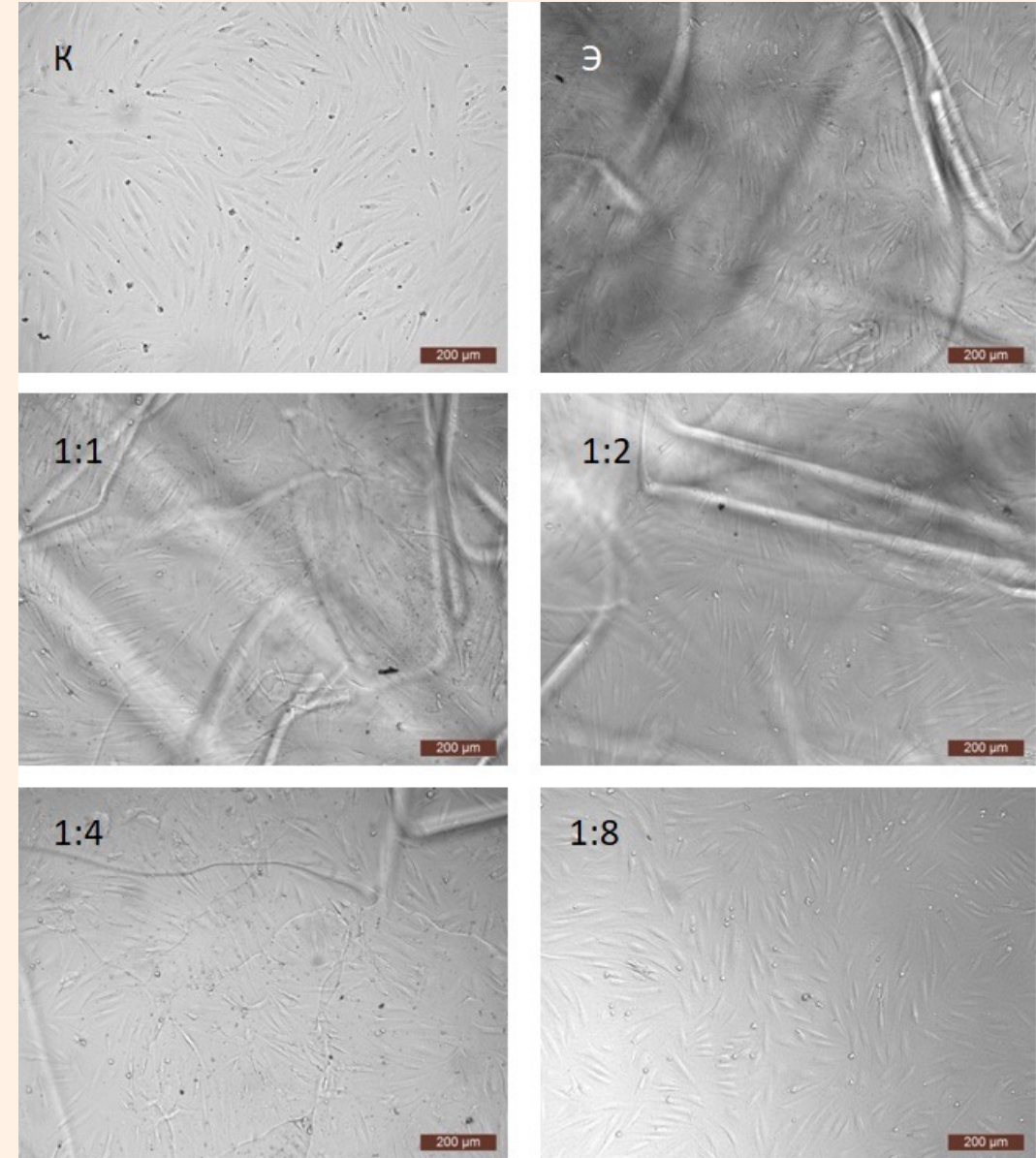
200 µm

# Артефакты при постановке МТТ-теста

## Образец №5 – полимер (раствор)



**Образование полимерной пленки в приклеточном слое**

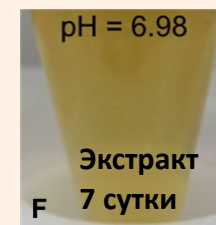
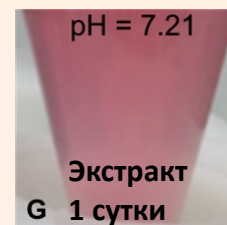


# МТТ-тест

1. При проведении МТТ-теста обязательно необходимо микроскопический контроль за состоянием клеток!!!

✓ Необходимо визуальное наблюдение за изменением pH среды и окрашиванием лунок

2. Часто могут наблюдаться артефакты



3. **Артефакты не всегда плохо!** – они могут дать дополнительные характеристики образца, например :

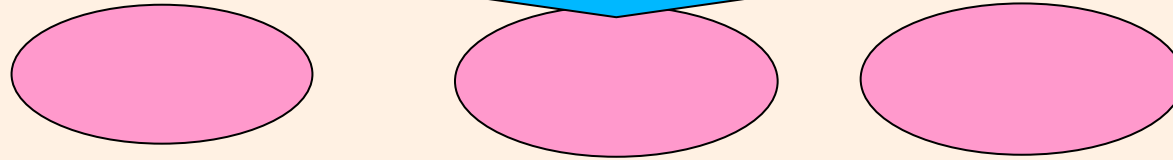
- ✓ Биodeградационные свойства - выделение частиц
- ✓ Выделение веществ изменяющих pH среды
- ✓ Спонтанная полимеризация
- и др.

# Исследования биосовместимости *in vitro*

Анализ взаимодействия поверхностно зависимых клеток с материалом

**МСК, ДФЧ**

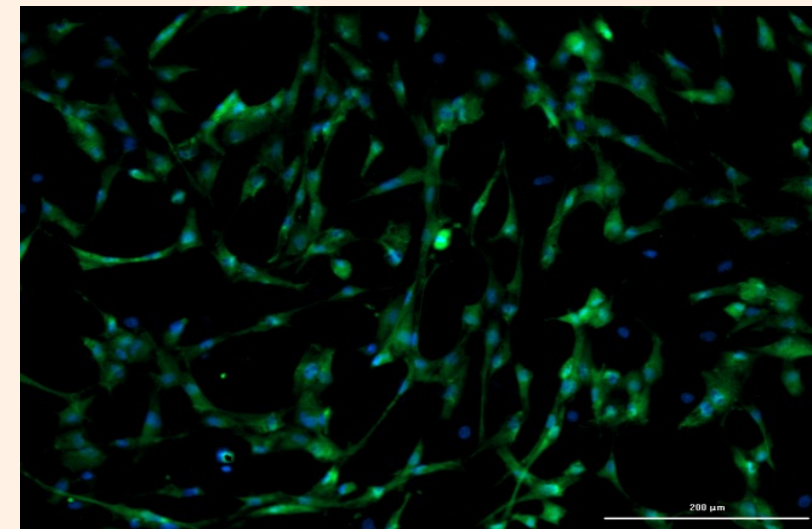
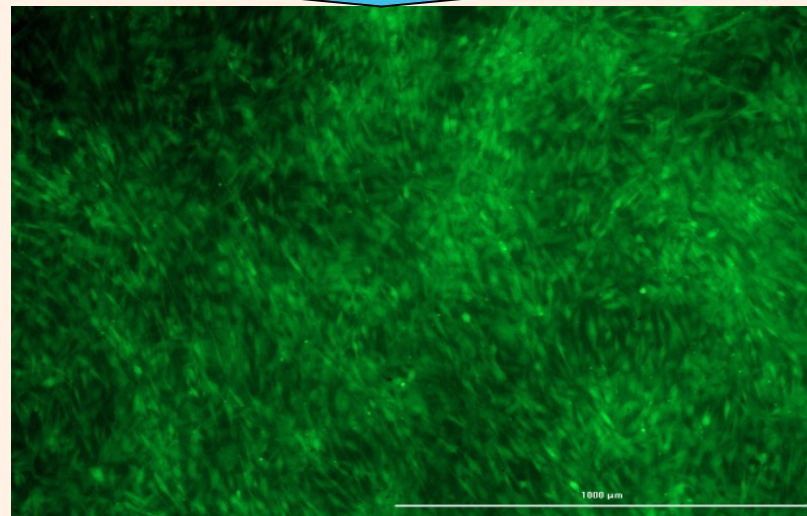
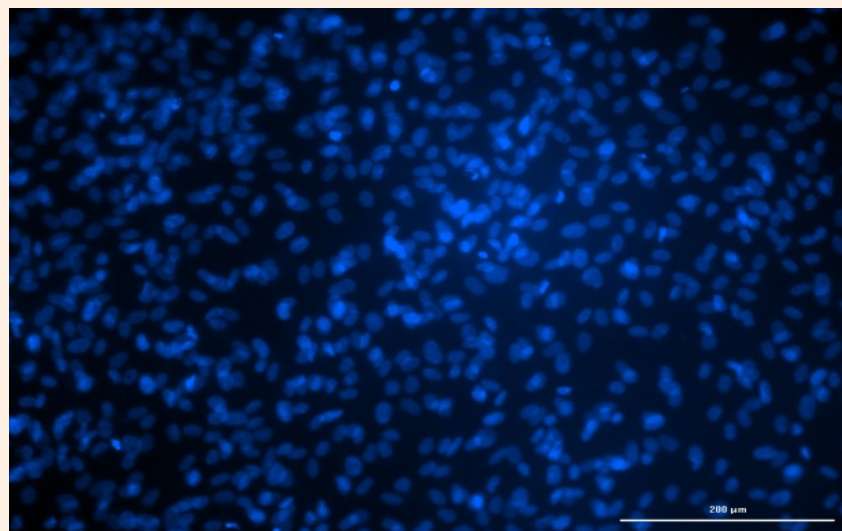
Образцы  
материала



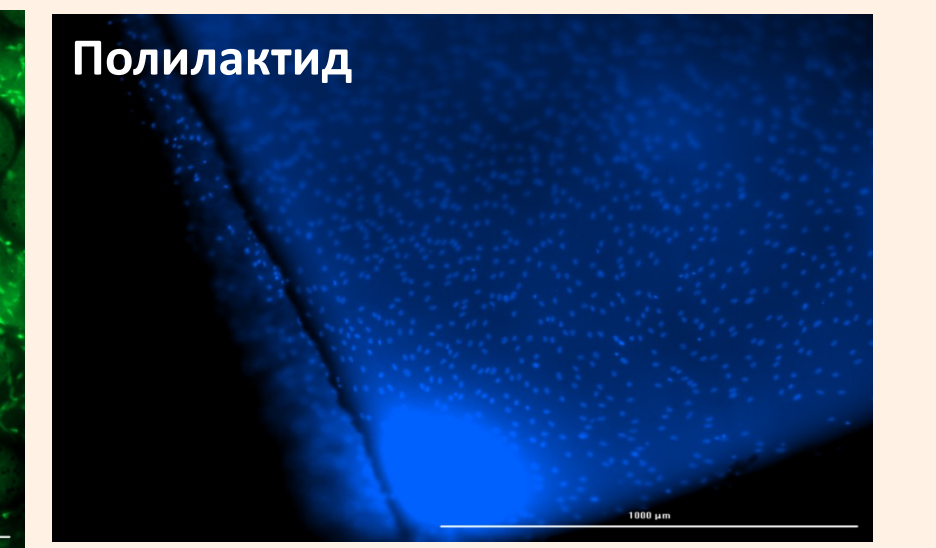
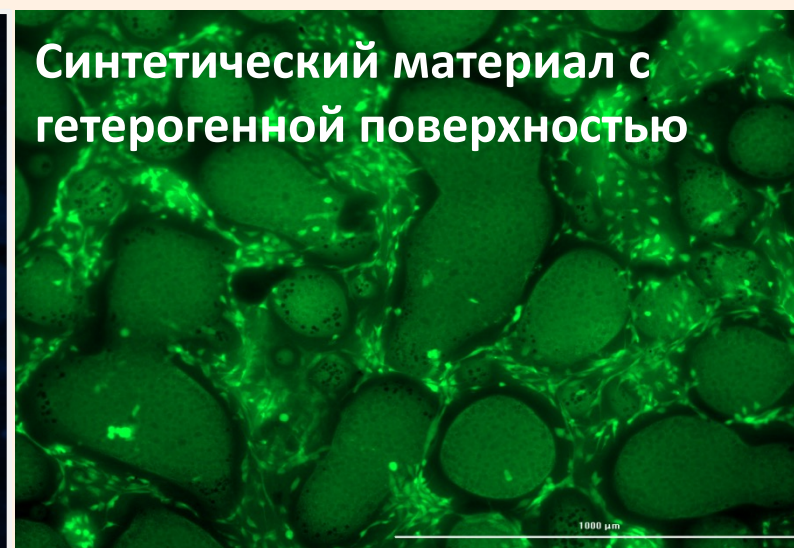
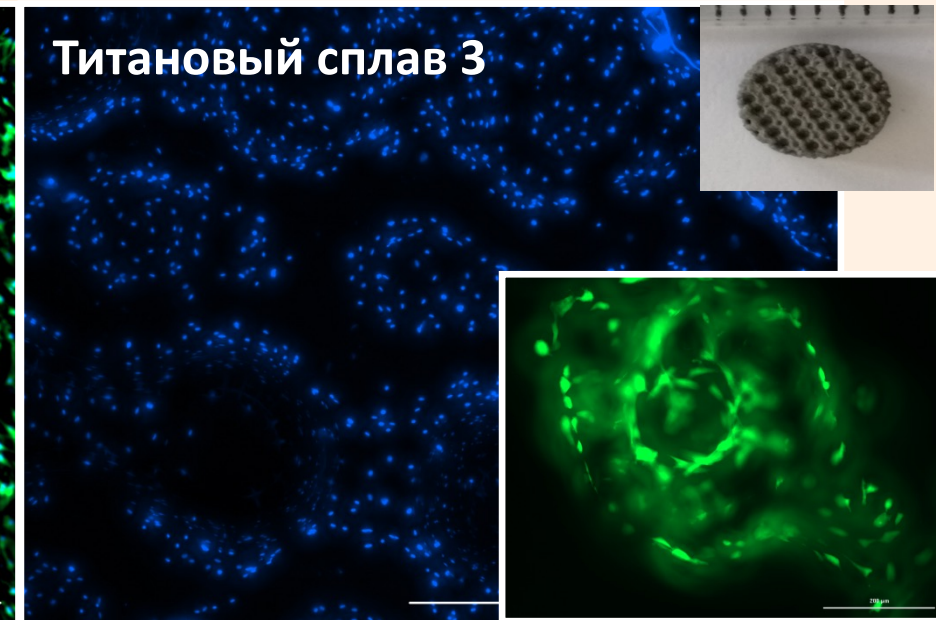
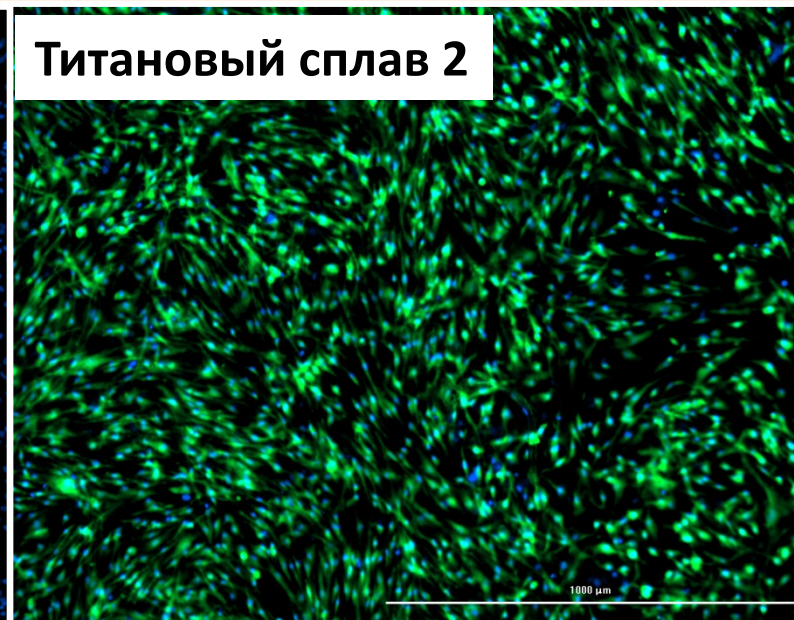
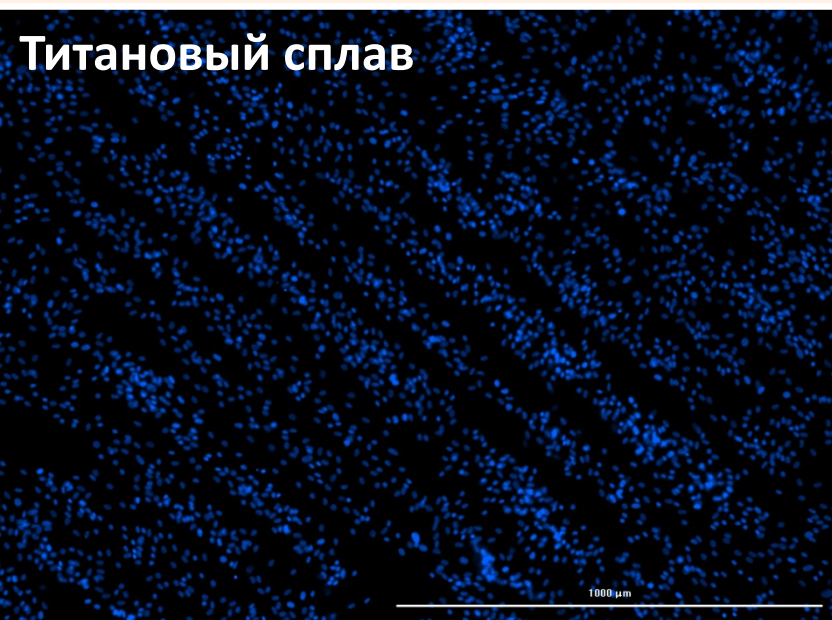
Контрольные сроки: например, 24, 48, 72, 96 часов

**окрашивание, визуализация  
количественный анализ**

Полная ростовая среда: среда  
20 % телячьей эмбриональной  
сыворотки,  
глутамин, антибиотики  
(пенициллин/ стрептомицин)

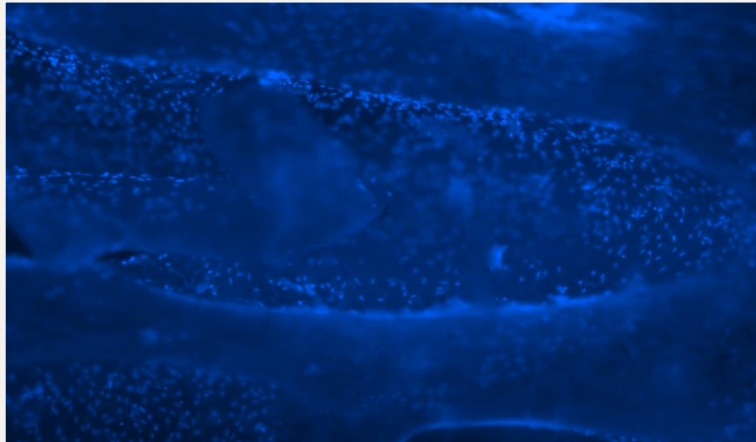


# Анализ адгезионных свойств поверхности с качественной оценкой жизнеспособности

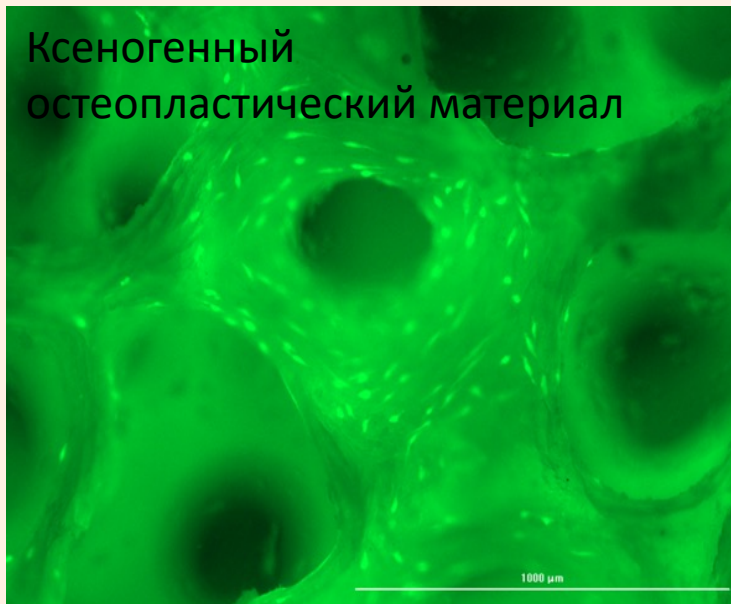
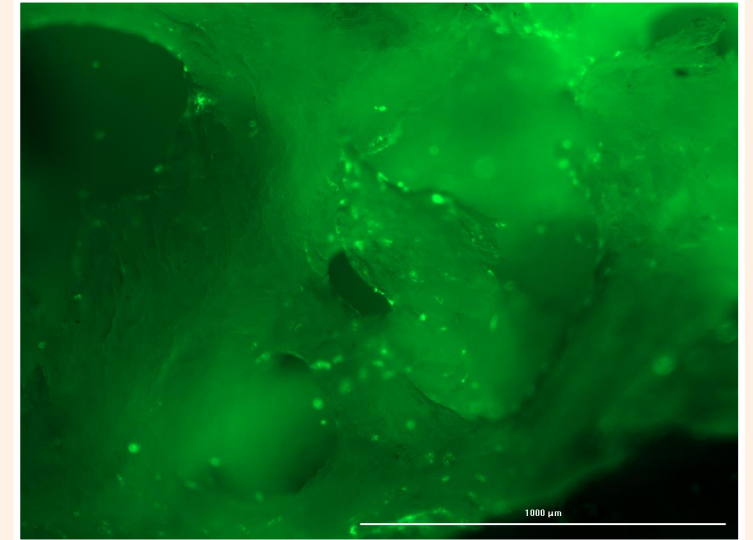
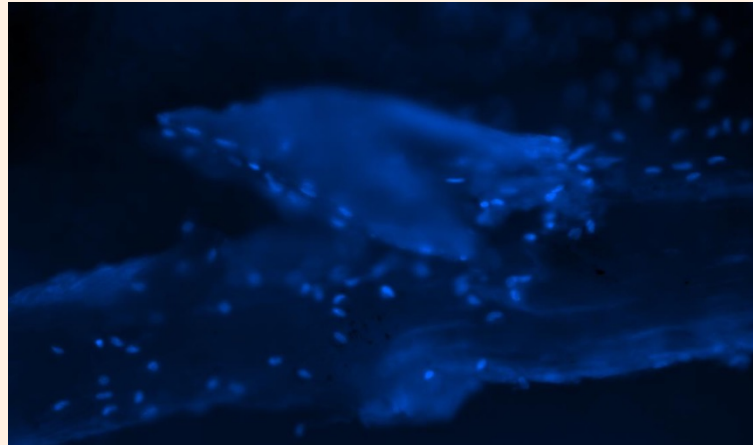


Прижизненное окрашивание: зеленый - Calcein AM 564061(США) – маркер живых клеток; синий -ядра клеток Hoechst 3334 (США)

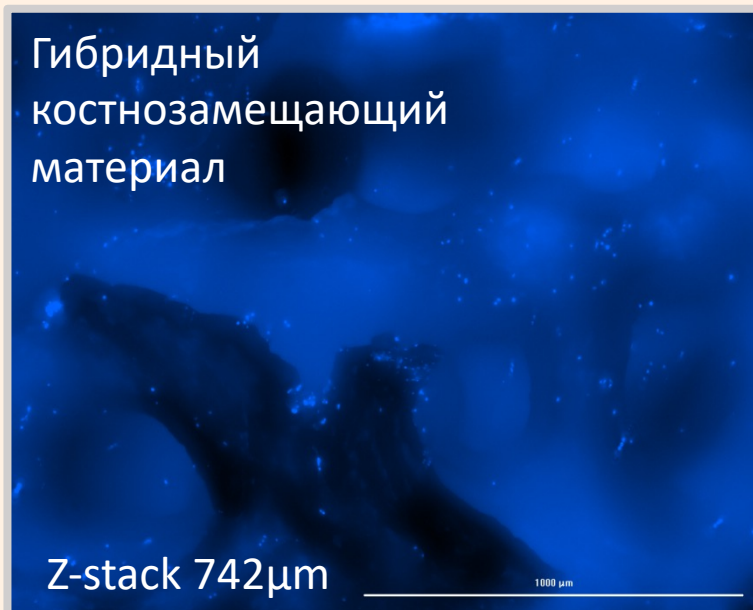
# Оценка заселения клетками структурных элементов пористых материалов



Аллогенный депротенинизированный костнозамещающий материал



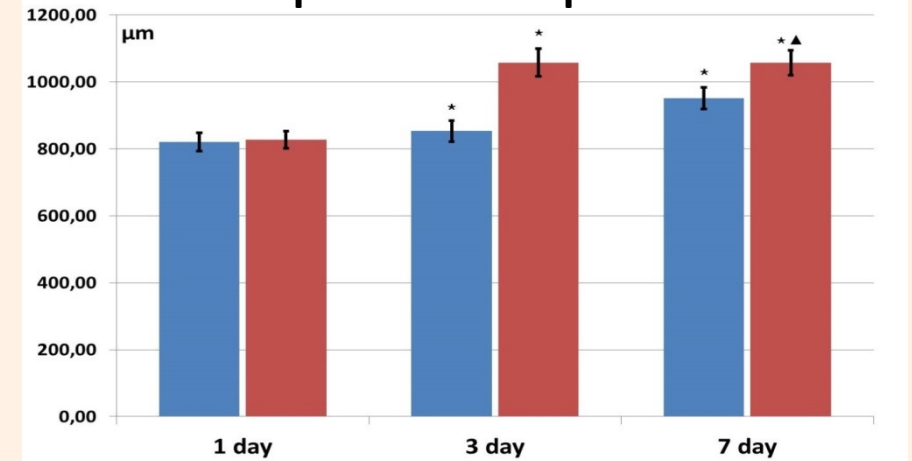
Ксеногенный остеопластический материал



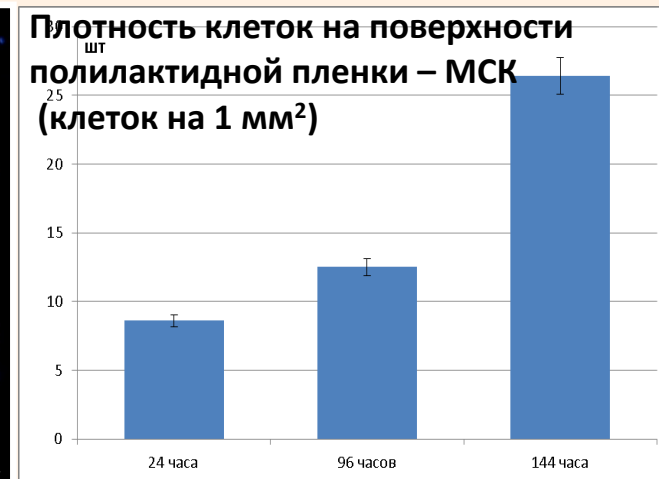
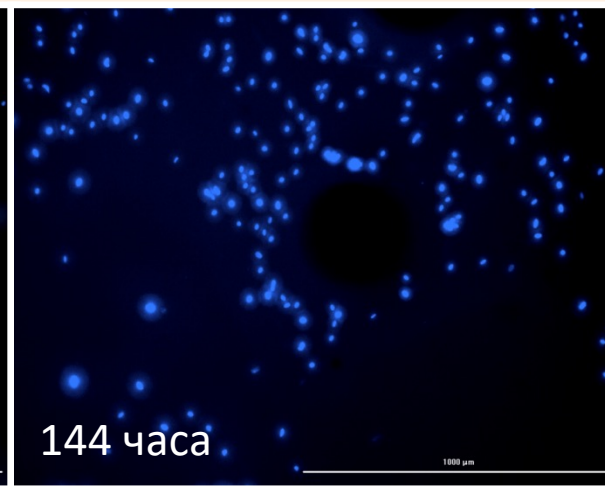
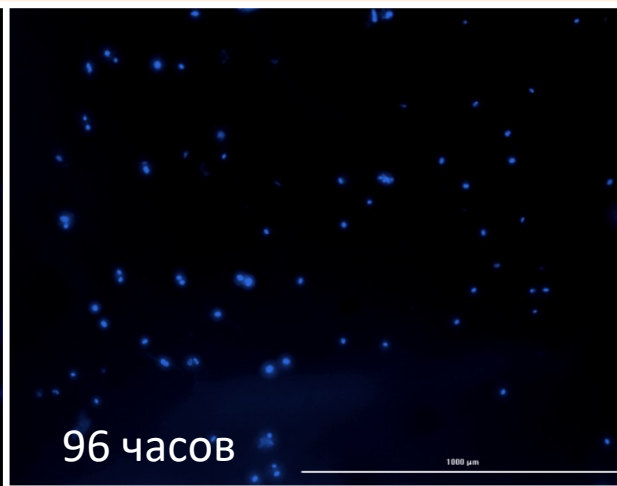
Гибридный костнозамещающий материал

Z-stack 742μm

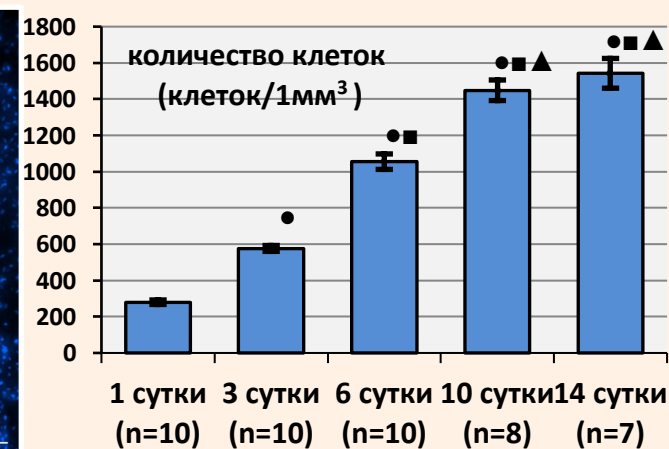
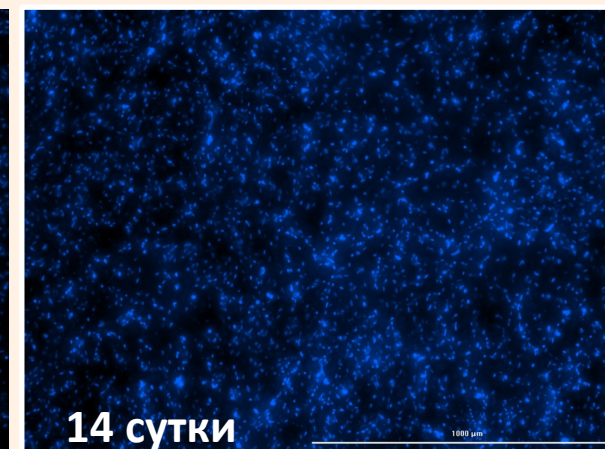
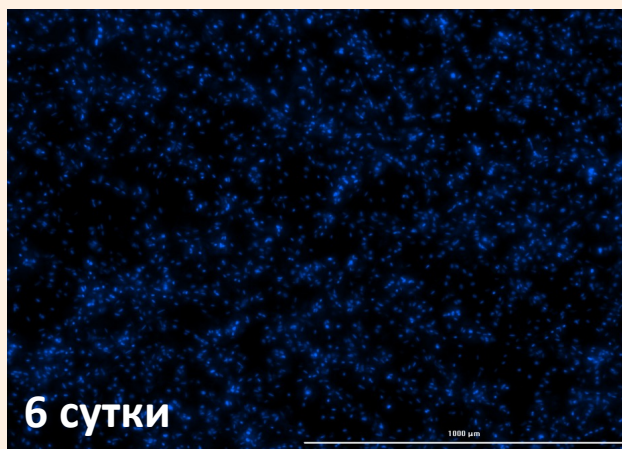
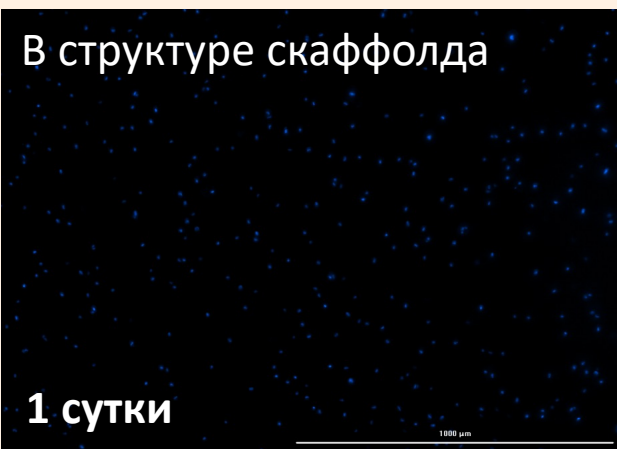
Оценка миграции клеток в структуру пористого материала



# Исследование пролиферативной активности МСК высеянных на образцы



## Динамика роста МСК в гидрогелевом скаффолде





# Исследование пролиферативной активности с оценкой жизнеспособности

Образец раневого покрытия №1

1 сутки

200 μm

Образец раневого покрытия №1

7 сутки

200 μm

	Общее количество клеток (шт./мм <sup>2</sup> )	% мертвых клеток
1 сутки	111,66±18,61	единичные или отсутствуют в поле зрения
3 сутки	287,08±52,64	единичные или отсутствуют в поле зрения
7 сутки	508,93±40,71	единичные или отсутствуют в поле зрения

Образец раневого покрытия №2

1 сутки

200 μm

Образец раневого покрытия №2

7 сутки

200 μm

	Общее количество клеток (шт./мм <sup>2</sup> )	% мертвых клеток
1 сутки	61,39±10,39	единичные или отсутствуют в поле зрения
3 сутки	23,46±5,98	17%
7 сутки	13,49±3,03	6,69% + деструкция ядер погибших клеток

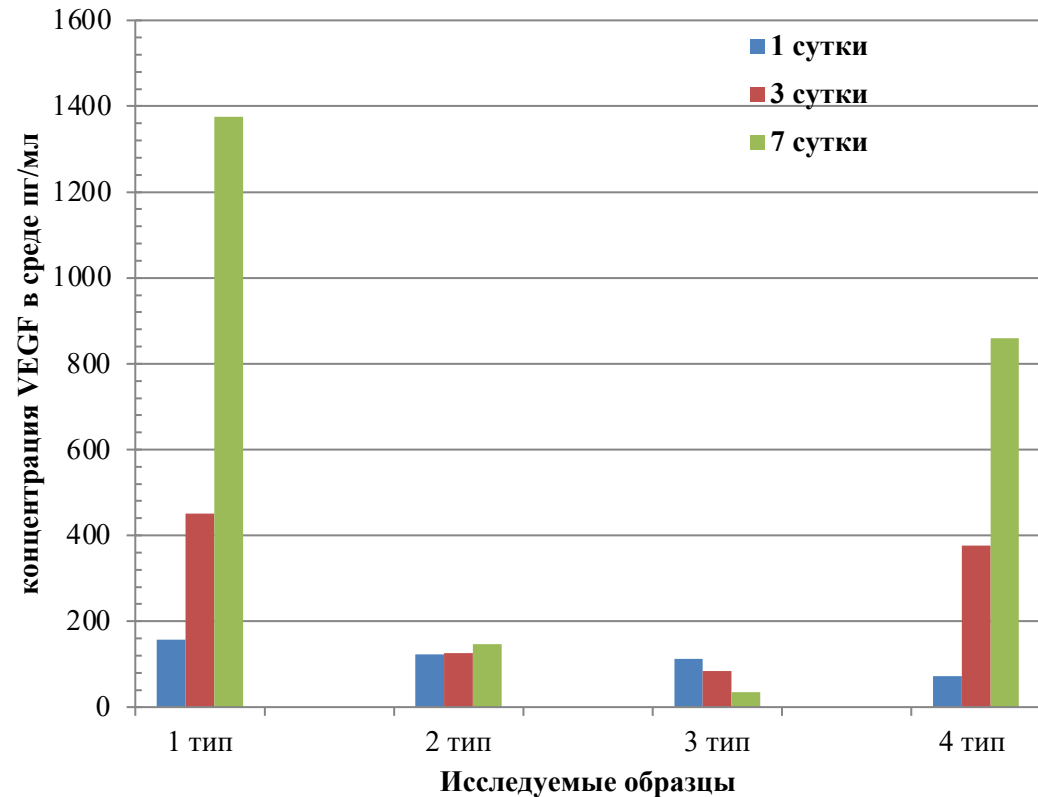
# Оценка секреторной активности клеток культивируемых на / в образцах

Культивирование клеток на / в образцах

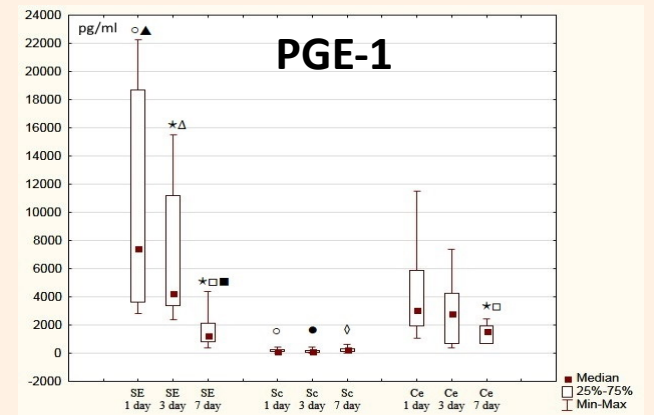
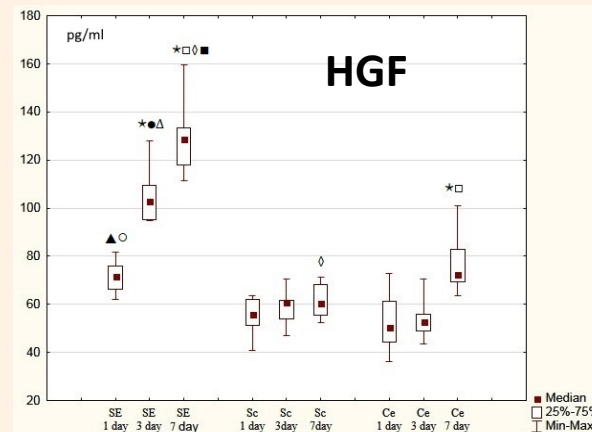
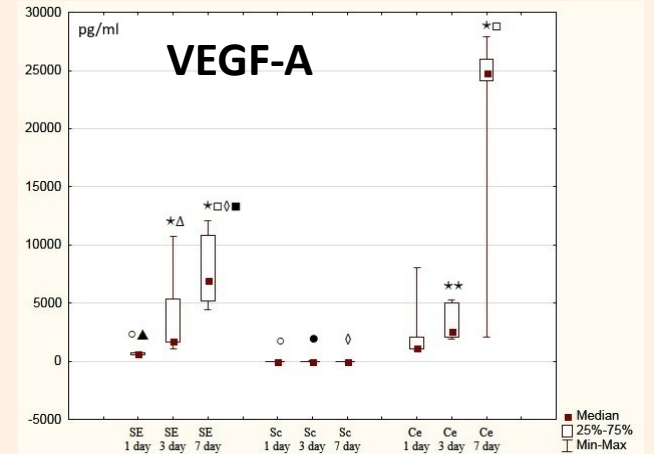
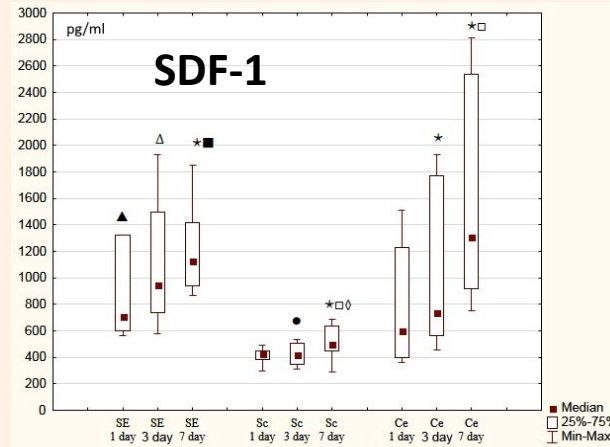
отбор кондиционной среды в контрольные сроки

определение концентрации белков секрета клеток

Динамика изменения VEGF-A в ростовой среде при культивировании клеток на образцах коммерческих раневых покрытий



Сравнительное исследование секреторной активности МСК при культивировании в культуре и биологически активном скаффолде



# Алгоритм исследования материалов биомедицинского назначения

## Скрининг – МТТ-тест

*компоненты материалов, непосредственно образцы материалов*

### *Твердые аппликационные и имплантируемые материалы*

✓ Оценка адгезивных свойств поверхности + качественная оценка жизнеспособности

✓ Оценка пролиферативной активности при культивировании клеток на / в материале

✓ Оценка жизнеспособности при культивировании клеток на / в материале

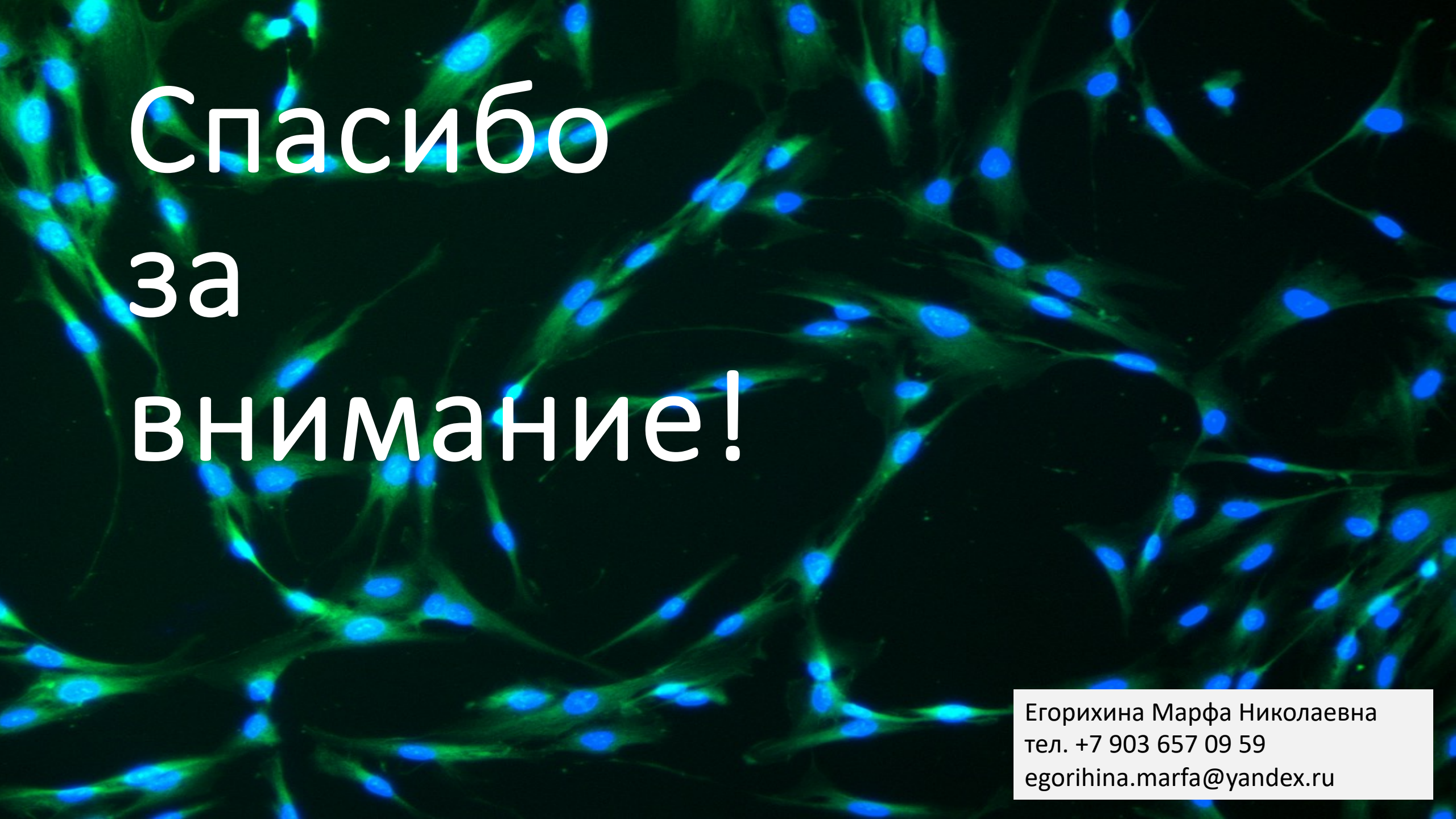
✓ Оценка секреторной активности клеток культивируемых на / в материале

### *Материалы с пористой структурой*

✓ Оценка распределения клеток относительно внутренней структуры материала

✓ Оценка миграционной активности

**Прогнозирование поведения материала в условиях *in vivo***



Спасибо  
за  
внимание!

Егорихина Марфа Николаевна  
тел. +7 903 657 09 59  
egorihina.marfa@yandex.ru