

6. *Gonkowski S., Całka J.* Changes in the somatostatin (SOM)-like immunoreactivity within nervous structures of the porcine descending colon under various pathological factors. *Exp. Mol. Pathol.* 2010; 88:416–423. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2010.01.011>.
7. *Huang T., Hu J., Wang B., Nie Y., Geng J., Cheng L.* Tlx3 controls cholinergic transmitter and Peptide phenotypes in a subset of prenatal sympathetic neurons. *J Neurosci.* 2013; 33(26):10667–10675. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0192-13.2013>.
8. *Маслюков П. М., Ноздрачев А. Д., Тиммерманс Дж. П.* Возрастные особенности нейротрансмиттерного состава нейронов звездчатого узла // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. 2006. Т. 92(2). С. 214–221.
9. *Roudenok V., Kuhnel W.* Distribution of vasoactive intestinal polypeptide-, calcitonin gene-related peptide-, somatostatin- and neurofilament-immunoreactivities in sympathetic ganglia of human fetuses and premature neonates. *Ann Anat.* 2001; 183:213–216.
10. *Емануйлов А. И., Порсева В. В., Павлов А. В., Маслюков П. М.* Возрастное развитие соматостатинергических нейронов симпатических превертебральных узлов // Сеченовский вестник. 2023. Т. 14(3). С. 28–36. DOI: <https://doi.org/10.47093/2218-7332.2023.14.3.28-36>
11. *Маслюков П. М., Будник А. Ф., Ноздрачев А. Д.* Нейрохимические особенности узлов метасимпатической системы в онтогенезе // Успехи геронтологии. — 2017. Т. 30. № 3. С. 347–355.
12. *Masliukov P. M., Moiseev K., Budnik A. F., Nozdrachev A. D., Timmermans J. P.* Development of calbindin- and calretinin-immunopositive neurons in the enteric ganglia of rats. *Cell Mol. Neurobiol.* 2017; 37(7):1257–1267. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0457-x>
13. *Van Op den Bosch J., Adriaensen D., Van Nassauw L., Timmermans J. P.* The role(s) of somatostatin, structurally related peptides and somatostatin receptors in the gastrointestinal tract: a review. *Regul Pept.* 2009; 156(1-3):1–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2009.04.003>
14. *Masliukov P. M., Emanuilov A. I., Budnik A. F.* Sympathetic innervation of the development, maturity, and aging of the gastrointestinal tract. *Anat Rec (Hoboken).* 2023; 306(9):2249–2263. DOI: <https://doi.org/10.1002/ar.25015>

УДК [572.776:616.71-001.5]-089

<sup>1</sup>Матчин А. А., <sup>1</sup>Стадников А. А., <sup>1</sup>Носов Е. В., <sup>2</sup>Клевцов Г. В., <sup>2</sup>Растегаев И. А.

## КОНФОКАЛЬНАЯ ЛАЗЕРНАЯ СКАНИРУЮЩАЯ МИКРОСКОПИЯ КАК МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ ОСТЕОИНТЕГРАЦИОННЫХ СВОЙСТВ ТИТАНОВЫХ МАТЕРИАЛОВ

<sup>1</sup>Оренбургский государственный медицинский университет, Оренбург,  
Российская Федерация

<sup>2</sup>Тольяттинский государственный университет, Тольятти, Российская Федерация

---

*Аннотация.* Цель работы — продемонстрировать возможности использования конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) для оценки остеointegrационных свойств медицинских изделий, применяемых в челюстно-лицевой хирургии.

Методика работы заключается в изучении с помощью КЛСМ поверхности минипластин и минивинтов из наноструктурированного титана марки Grade 4 и аналогичных изделий фирмы ООО «Конмет» в области контакта с костной тканью после экспериментального остеосинтеза челюсти кроликов.

Основные результаты работы показали возможности метода конфокальной лазерной сканирующей микроскопии для исследования механизмов остеоинтеграции в челюстно-лицевой хирургии.

*Ключевые слова:* конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, наноструктурированный титан, экспериментальный перелом, остеоинтеграция.

<sup>1</sup>Matchin A. A., <sup>1</sup>Stadnikov A. A., <sup>1</sup>Nosov E. V., <sup>2</sup>Klevtsov G. V., <sup>2</sup>Rastegaev I. A.

## CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY AS A METHOD OF STUDYING THE OSSEOINTEGRATION PROPERTIES OF TITANIUM MATERIALS

<sup>1</sup>Orenburg State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Orenburg, Russian Federation

<sup>2</sup>Togliatti State University, Togliatti, Russian Federation

---

*Abstract.* The aim of the work is to demonstrate the possibilities of using confocal laser scanning microscopy (CLSM) to assess the osseointegration properties of medical devices used in maxillofacial surgery.

The methodology of the work consists in the studying the surface of mini-plates and mini-screws made of Grade 4 nanostructured titanium and similar products of Konmet LLC in the area of contact with bone tissue after experimental osteosynthesis of the jaw of rabbits with the help of KLSM.

The main results of the work showed the possibilities of the KLSM method for studying the mechanisms of osseointegration in maxillofacial surgery.

*Keywords:* confocal laser scanning microscopy, nanostructured titanium, experimental fracture, osseointegration.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время при изготовлении изделий для челюстно-лицевой хирургии в большинстве случаев применяют титан и титановые сплавы за счет их преимуществ — сочетания механической прочности, коррозионной стойкости и биосовместимости [1–4]. Современные способы обработки материалов, в частности, один из наиболее перспективных методов интенсивной пластической деформации (ИПД) — равноканальное угловое прессование по схеме «Конформ» (РКУП-Конформ) — позволили в 1,5 раза увеличить прочностные свойства технически чистого титана за счет наноструктурирования [5], что демонстрирует его преимущества перед используемыми в настоящий момент сплавами титана. Это позволяет миниатюризировать медицинские изделия [6], что чрезвычайно актуально для челюстно-лицевой хирургии с целью уменьшения инвазивности операции.

Однако на сегодняшний момент биомедицинские свойства нанотитана еще не до конца изучены, так как преимущественно исследования проводились в условиях *in vitro*. Кроме того, недостаточное внимание уделяется исследованию поверхности готовых изделий и взаимосвязи между качеством поверхности го-

товых изделий, процессом остеоинтеграции и последующей реабилитации пациента.

Изучение зоны контакта титановой конструкции с костью и окружающими ее мягкими тканями осложняется выбором применения тех или иных методов. Например, для мягких и костных тканей подходят световая микроскопия, иммуногистохимические (ИГХ) методы, морфометрия [7]. Для титановых же изделий возможно изучение их поверхности с извлечением из тканей либо путем изготовления шлифов из блока костной ткани, что ведет к изменению кости в ходе термического воздействия в результате трения. Изготовление шлифов из миниатюрных изделий может привести к механическому разобщению тканей.

При решении ряда задач в области биотехнологий часто возникает необходимость получения данных об объекте исследования в трехмерном объеме (3D). Для решения таких задач идеально подходит появившийся сравнительно недавно новый класс приборов – конфокальный лазерный сканирующий микроскоп (КЛСМ) [8]. В основе данного метода лежит применение специальной конфокальной оптической схемы, позволяющей отсеять внефокусные лучи света и таким образом существенно увеличить контрастность изображения. Применение лазера в качестве источника света совместно с высокоточной системой сканирования поверхности объекта позволяет получать изображения с разрешающей способностью до 120 нм в горизонтальной плоскости XY и до 10 нм вдоль вертикальной оси Z.

Основным преимуществом КЛСМ является возможность получения точных трехмерных моделей поверхностей исследуемых объектов за счет перемещения объектива вдоль оси Z. Кроме того, благодаря сканированию объекта лучом лазера, не требуется его электрическая проводимость, что обычно достигается напылением частиц благородных металлов в вакууме, а отсутствие необходимости в вакуумной системе позволяет снизить требования к чистоте поверхности образца. Также использование напыления металлами искажает цветовую характеристику поверхности, например, при использовании сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). По сравнению с получившей широкое распространение атомно-силовой микроскопией КЛСМ имеет большой диапазон сканирования вдоль оси Z, что позволяет исследовать образцы, поверхность которых имеет большие перепады высот.

Наибольшую популярность метод КЛСМ получил в биологических исследованиях, для которых, собственно, он и был изначально разработан. В то же время его применение в материаловедении менее распространено, несмотря на то что с помощью КЛСМ можно проводить точные 3D измерения элементов поверхности [8, 9]. Данное исследование демонстрирует возможности метода КЛСМ на конкретных примерах использования прибора LEXT 0LS4000 (Olimpus).

Целью работы явилось исследование поверхности минипластин и минивинтов, изготовленных из наноструктурированного технически чистого титана, со стандартными минипластинами и минивинтами заводского производства из титанового сплава, применяемых в настоящее время в челюстно-лицевой хирургии, а также проведение сравнительного испытания *in vivo* обоих видов конструкций на кроликах.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментально-морфологические исследования проводились на 53 половозрелых кроликах-самцах породы Шиншилла массой 2,5–3 кг. Содержание,

кормление, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии со строгим соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (Страсбург, Франция, 1986) и согласно Правилам надлежащей лабораторной практики Российской Федерации (приказ Минздрава РФ № 199н от 01.04.2016).

В 1-й серии исследования (25 животных) была разработана экспериментальная модель открытого перелома нижней челюсти, зафиксированного с помощью наноструктурированных минипластин и минивинтов (обработка титана марки Grade 4 методом РКУП-Конформ). Во 2-й серии (25 животных) фиксация отломков осуществлялась стандартными минипластинами и минивинтами ООО «Конмет».

Кроликам под внутримышечным наркозом раствором Телазола и инфильтрационной анестезией раствором Артикаина выполнялся разрез мягких тканей параллельно телу нижней челюсти, перевязывались и пересекались лицевые сосуды, скелетировалось тело нижней челюсти до передней границы жевательной мышцы, с помощью стоматологической фрезы на прямом наконечнике с применением водяного охлаждения выполнялась остеотомия кортикальной пластинки перпендикулярно к нижнему краю нижней челюсти. Далее с помощью прямого долота и молотка создавалась модель полного перелома нижней челюсти. Отломки закреплялись с помощью пластин и винтов по 2 винта на каждом отломке с достижением постоянной иммобилизации. Ткани ушивались послойно с использованием материала Викрил 4-0.

Контролем служила группа из трех животных, у которых под внутримышечным наркозом раствором Телазола и инфильтрационной анестезией раствором Артикаина были взяты мягкие ткани и фрагмент нижней челюсти после создания экспериментального травматического перелома без фиксации отломков.

Все животные операцию перенесли удовлетворительно, осложнений в послеоперационном периоде во время остеосинтеза не зафиксировано. По 5 животных первой и второй серии путем ингаляции летальной дозы эфира выводили из опыта на 7-е, 14-е, 21-е, 28-е, 40-е сутки после операции.

Объектом исследования во всех сериях служила экстерпированная нижняя челюсть в зоне перелома, а также мягкие ткани, окружающие область хирургического вмешательства.

Для светооптических исследований материал фиксировали в 10%-ном водном растворе нейтрального формалина, спирт-формоле, затем проводили декальцинацию костных объектов в 4%-ном растворе ЭДТА (трилона В) в течение 10 суток и дофиксировали вновь в 10%-ном растворе нейтрального формалина. После фиксации материал обезживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в целлоидин-парафин. Приготовление серийных срезов толщиной 5–6 мкм осуществлялось на ротационном микротоме МПС-2. Депарафинированные срезы были окрашены гематоксилином Майера и эозином. Для идентификации клеток с признаками пролиферации (синтезирующих протеин Ki-67), для оценки экспрессии синтеза протеинов p53, caspasa 3 и антиапоптотического белка bcl-2 использовали метод иммуногистохимии. Для этого срезы инкубировали с соответствующими моноклональными антителами (наборы «Kit» фирмы ДАКО, Дания) в рабочем разведении 1:50. Докрашивание ядер клеток проводили 0,5%-ным раствором метиленового зеленого на 0.1 М ацетатном буфере. Для визуализации структур использовали стрептавидин-биотинный пероксидазный

метод. Подсчет окрашенных иммунопозитивных клеток (в процентах) осуществляли при просмотре не менее 1000 клеток в различных полях зрения микроскопа МБИ — 15.25 мм<sup>2</sup>, об. 90, ок. 10 [7].

Для оценки достоверности различий между двумя группами экспериментальных животных при нормальном распределении количественных данных использовали t-критерий Стьюдента.

Макропрепарат челюсти исследовался в Тольяттинском государственном университете с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LEXT OLS4000 (Olimpus) при различном увеличении.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Светооптические исследования показали восстановление целостности поврежденной нижней челюсти после закрепления отломков вследствие пролиферации клеток камбиального слоя надкостницы и малодифференцированных мезенхимальных стромальных костномозговых клеток.

Исследования позволили выявить высокий пролиферативный и апоптотический потенциал остеобластов в зоне контакта как с наноструктурированной поверхностью титанового имплантата, так и имплантатов ООО «Конмет». Однако в последнем случае отмечена экспрессия гена Ki-67 у остеобластов и эндотелиоцитов сосудов, что свидетельствовало об активации их пролиферативного потенциала.

Для проведения исследований на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе экстерпированная нижняя челюсть с вживленным винтом и фиксированной пластиной разрезалась вдоль винта с сохранением фрагмента титановой пластины медицинской фрезой с водяным охлаждением. Это позволило минимизировать локальный перегрев челюсти и винта. Разрез проходил вдоль центральной части винта, и одна из частей тканевого блока механически отделялась с сохранением в нем интегрированного винта с оголением его резьбы для визуализации контакта.

Были изучены костные блоки в контакте с винтами наноструктурированного титана и винтами производства ООО «Конмет», извлеченные из костных блоков (на наличие интегрированных костных структур на их резьбовой части), а также поверхность фрагмента пластины, контактировавшей с нижней челюстью (на наличие интегрированных костных структур). При большем увеличении резьбовой части блока с наноструктурным титановым винтом визуализируется плотный контакт поверхности резьбы с костной тканью, которая выросла в область между витками резьбы.

Были изучены костные блоки в контакте с винтами производства ООО «Конмет», извлеченные из костных блоков винты на наличие интегрированных костных структур на их резьбовой части. На поверхности резьбовой части винта «Конмет» визуализируется плотное соединение тканей с поверхностью резьбы, но с преобладанием волокнистых структур в виде менее минерализованной «темной» ткани. При исследовании извлеченного из костного блока винта «Конмет» на резьбовой поверхности сохранились фрагменты интегрированной костной ткани, также с преобладанием менее минерализованных структур. При исследовании поверхности пластины из наноструктурного титана, которая контактировала с поверхностью кости, обнаружены множественные фрагменты интегрированной костной ткани вида «снежных шапок», в 3D формате визуализируется

сложный рельеф поверхности (рис. 1). На аналогичной поверхности пластин «Конмет» фрагментов интегрированной кости не обнаружено (рис. 2).

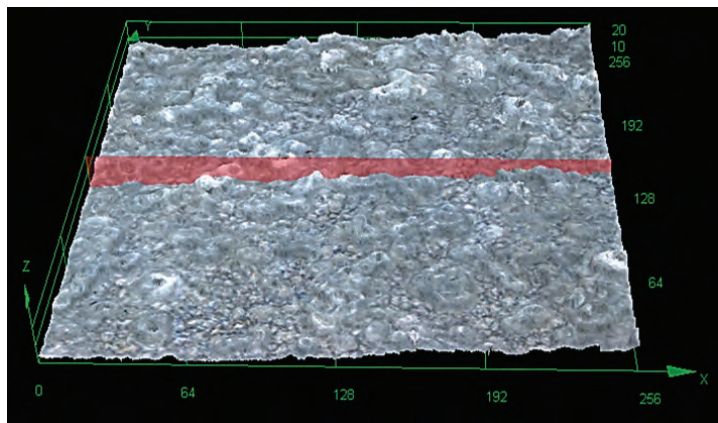


Рис. 1. Поверхность наноструктурированной титановой минипластины в 3D формате (КЛСМ)

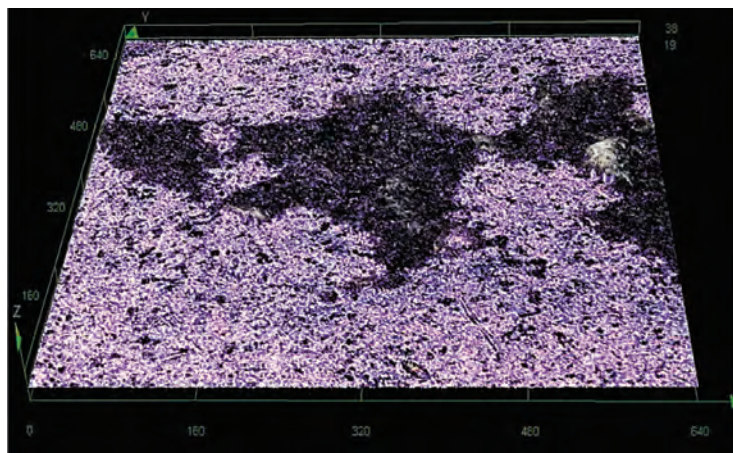


Рис. 2. Поверхность минипластины фирмы ООО «Конмет» в 3D формате (КЛСМ)

Возможности КЛСМ позволяют измерить шероховатость поверхности пластин, прилегающей к кости. Так, параметр шероховатости ( $R_z$ ) поверхности пластин «Конмет» составляет в среднем  $3,4 \mu\text{m}$ , а наноструктурированных пластин —  $9 \mu\text{m}$ . Интерпретация значений шероховатости поверхности изделий после их эксплуатации позволяет судить о шероховатости исходных изделий и наличии на их поверхности интегрированных биологических структур, о чем свидетельствует повышение значений у наноструктурированных изделий.

Таким образом, использование сканирующей электронной микроскопии зоны контакта винтов из наноструктурного титана и стандартных винтов заводского изготовления позволило выявить высокий интеграционный потенциал данных медицинских изделий.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование КЛСМ в экспериментальных исследованиях позволяет исследовать остеоинтеграционные свойства титановых изделий за счет визуализации интегрированных структур на поверхности металла и в контакте с тканевым блоком с сохранением их цвето-оптических характеристик. При этом сохраняется возможность измерения объективных материаловедческих характеристик материала, такого как шероховатость, что является одной из важнейших характеристик для металлов с остеоинтеграционными свойствами.

Применение КЛСМ вместе с другими морфологическими методами подтверждает целесообразность использования наноструктурированного титана в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии в сравнении с аналогичными изделиями заводского производства.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (междисциплинарный проект № 20-69-47059 и частично проект № 20-63-47027).*

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Semenova I. P., Klevtsov G. V., Klevtsova N. A., Dyakonov G. S., Matchin A. A., Valiev R. Z.* Nanostructured Titanium for Maxillofacial Mini-implants. *Advanced Engineering Materials*. 2016; 18(7):1216–1224.
2. *Klevtsov G. V., Valiev R. Z., Klevtsova N. A., Fesenyuk M. V., Tyurkov M. N., Poluyakov A. V.* Strength and torsion fracture mechanism of commercially pure titanium with ultrafine-grained structure. *Letters on Materials*. 2021; 11(3):273–278. DOI: 10.22226/2410-3535-2021-3-273-278
3. *Klevtsov G. V., Valiev R. Z., Rezyapova L. R., Klevtsova N. A., Tyurkov M. N., et al.* Strength of products made of ultrafine-grained titanium for bone osteosynthesis. *Materials*. 2022; 15:8403. DOI: <https://doi.org/10.3390/ma15238403>
4. *Матчин А. А., Носов Е. В., Клевицов Г. В., Стадников А. А.* Разработка и исследование медицинских изделий нового поколения из высокопрочного наноструктурированного материала // Збірник центру наукових публікацій «Велес» за матеріалами VIII міжнародної науково-практичної конференції: «Літні наукові читання» м. Київ. К.: Центр наукових публікацій, 2020. — С. 57–64.
5. *Valiev R. Z., Zhilyaev A. P., Langdon T. G.* Bulk Nanostructured Materials: Fundamentals and Applications. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2014. 440 p.
6. *Матчин А. А., Стадников А. А., Носов Е. В., Клевицов Г. В.* Экспериментально-морфологическое обоснование использования титановых мини-пластин для остеосинтеза переломов нижней челюсти, изготовленных из высокопрочного наноструктурированного материала // Актуальные вопросы стоматологии: сб. науч. трудов, посв. 55-летию стоматологического образования в СамГМУ / Под ред. Колсанова А. В., Котельникова Г. П., Трунина Д. А., Столяренко П. Ю. Самара: ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2021. С. 169–173.
7. *Чудаков О. П., Се С., Юдина О. А., Бутько Л. В.* Морфологические особенности остеоинтеграции при возмещении травматических дефектов костей лицевого и мозгового черепа с помощью чистого титана в условиях эксперимента // *Новости хирургии*. 2018. Т. 26. № 6. С. 645–654.

8. Клевцов Г. В., Мерсон Е. Д. О возможности использования конфокального лазерного сканирующего микроскопа для исследования микрорельефа поверхности разрушения металлических материалов // *Фундаментальные исследования*. 2012. № 11(5). С. 1185–1189.
9. Мерсон Д. Л., Мерсон Е. Д., Данилов В. А. Уникальные возможности конфокальной лазерной сканирующей микроскопии для решения задач физического материаловедения / *Перспективные материалы и технологии: матер. междуна-род. симпозиума*. В 2 ч. / Под ред. В. В. Рубаника. Ч. 2. Витебск, Беларусь: Витебский государственный технологический университет, 2017. С. 240–242.

УДК 618.19

<sup>1,2</sup>Могиленских А. С., <sup>1,2</sup>Сазонов С. В., <sup>1,2</sup>Демидов С. М.

## ВЛИЯНИЕ ФЕТАЛЬНОЙ БЫЧЬЕЙ СЫВОРОТКИ НА РОСТ КЛЕТОК КУЛЬТУРЫ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

<sup>1</sup>*Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Российская Федерация*

<sup>2</sup>*Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Российская Федерация*

---

*Аннотация.* Целью работы является определение влияния фетальной бычьей сыворотки (FBS) на рост и морфологию клеток культуры рака молочной железы.

*Методика работы:* анализ характеристик клеток первичной культуры рака молочной железы осуществляли с помощью проточной цитометрии: определяли экспрессию к эстрогену, Ki-67, панцитокератину и виментину.

*Основные результаты работы:* использование FBS при культивировании клеток рака молочной железы увеличивает общее количество жизнеспособных клеток, меняет их морфологию, а также количество клеток с экспрессией эстрогена и белка клеточной пролиферации Ki-67.

*Ключевые слова:* культура клеток рака молочной железы, фетальная бычья сыворотка, рецепторный аппарат клеток.

<sup>1,2</sup>Mogilenskikh A. S., <sup>1,2</sup>Sazonov S. V., <sup>1,2</sup>Demidov S. M.

## THE EFFECT OF FETAL BOVINE SERUM ON THE GROWTH AND MORPHOLOGY OF BREAST CANCER CULTURE CELLS

<sup>1</sup>*Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg, Russian Federation*

<sup>2</sup>*Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation*

---

*Abstract.* The aim of the work is to determine the effect of fetal bovine serum (FBS) on the growth and morphology of breast cancer culture cells.

*The methodology of the work* of work analysis of the receptor apparatus of primary breast cancer cells using flow cytometry: expression to estrogen, Ki-67, pancytokeratin and vimentin.