

615.46/.47

АДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА ПРИРОДНОГО И ИСКУССТВЕННЫХ ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

А. В. ЕРЕМИН¹, Г. В. СОРОКИН¹, А. А. ГОРКУН², В. Н. БОРОВКОВ¹,
И. Н. САБУРИНА², А. А. ОРЛОВ²

¹Городская клиническая больница № 71, г. Москва
²НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, г. Москва

В статье представлены результаты исследования способности матриц chronOS, БАК-1000 и коралла Acropora к адгезии стромальных клеток жировой ткани из микросфер после культивирования их в 3D-культуре. Намечены тенденции дальнейшего их использования как биоматериалов в травматологии и ортопедии.

Ключевые слова: костная ткань, репаративная регенерация, биоматериалы, стволовые клетки, 3D-культура, адгезивные свойства.

ADHESIVE PROPERTIES OF NATURAL AND ARTIFICIAL OSTEOPLASTIC MATERIALS

A. V. EREMIN¹, G. V. SOROKIN¹, A. A. GORKUN², V. N. BOROVKOV¹,
I. N. SABURINA², A. A. ORLOV²

¹City clinical hospital № 71, Moscow
²Institute of General pathology and pathophysiology RAMS, Moscow

Results of research of ability of matrixes of chronOS, BAK-1000 and coral of Acropora to adhesion the stromal cells of fatty tissue from microspheres after their cultivation in 3D culture are presented in article. Tendency of their further use as biomaterials in traumatology and orthopedics are planned.

Key words: bone tissue, reparative regeneration, biomaterials, stem cells, 3D culture, adhesive properties.

Введение

Для ускорения процессов остеоинтеграции в последние годы стали использовать остеопластический материал, заселенный мезенхимальными стволовыми клетками (МСК). Эксперименты *in vitro* по использованию мезенхимальных стволовых клеток показали, что они обладают большим потенциалом для лечения дефектов тканей. Последние данные убедительно доказывают, что МСК могут с успехом применяться в оперативной ортопедии и травматологии, особенно для лечения костных дефектов. К сожалению, по-прежнему существует огромный разрыв между множеством данных исследований на животных и клиническими испытаниями. Это отчасти объясняется наличием сложных правовых условий для проведения таких исследований.

Для того чтобы обобщить опыт исследований по использованию стволовых клеток, накопленный различными научными группами Германии, и разработать единую концепцию дальнейшего развития этой перспективной отрасли медицины под

руководством профессора К. Гюнтера и профессора Г. Цвиппа в 2010 году был организован и проведен в Мюнхене семинар, в работе которого приняли участие Немецкое общество травматологии и ортопедии (DGOU), центр восстановительной терапии (Дрезден), центр восстановительного лечения (Берлин). Во время семинара рассматривались не только клинические аспекты использования МСК, но также правовые рамки подобных исследований.

Подобные открытое моноцентровое контролируемое исследование проводилось и в ФГУ «Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена Росздрава» совместно с Санкт-Петербургским Государственным Медицинским Университетом им. академика И.П. Павлова и ООО «Транс-Технологии», Санкт-Петербург, Россия. В данном исследовании для замещения ограниченных костных дефектов применялась костная пластика деминерализованными костными трансплантатами, заселенными аутологичными мезенхимными стволовыми клетками (МСК). Иссле-

дование утверждено Ученым советом и разрешено Этическим комитетом РНИИТО им. Р.Р. Вредена. Таким образом, данный метод перспективен для дальнейшего изучения и клинического использования.

Наше исследование основывается на применении биокомпозиционного материала, изготавливаемого по системе CAD-CAM и заселенного аутологичными МСК в виде сфероидов; создании из него биокомпозиций с протеканием в них процессов остеогенеза и ангиогенеза, что в конечном итоге приведет к формированию аутокости идентичной по гено- и фенотипу.

Создание объекта для устранения дефекта и деформации кости в виде 3D-композиции по системе CAD-CAM и заселением её аутологичными МСК в виде сфероидов дает возможность называть этот биологический материал по гено- и фенотипическому признаку «собственной костью» соответствующего больного.

Для реализации поставленной цели необходимо изучить формирование остеопластического процесса регенерации кости, поэтому одной из задач является выбор материала для создания 3D-композиций и заселения аутологичными МСК.

Насыщенный материал стволовыми клетками или группами клеток (сфероиды), как показали эксперименты *in vitro*, формируют собственную систему микроциркуляторного русла. А наличие аутоиммунных МСК самого пациента в искусственном материале говорит о том, что данная кость по генетическому и фенотипическому типу принадлежит этому пациенту. Такие структурные пластические процессы начинаются с 5–7 суток, а процессы остеointegrации начинаются практически с момента фиксации сфероидов на поверхности остеопластического материала [2].

В НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН проведено доклиническое исследование эффективности и безопасности остеопластического материала chronOSTM, в ходе которого выявлены существенные преимущества этого материала перед другими остеопластическими материалами, используемыми в настоящее время в стоматологии.

Остеопластический материал с торговой маркой chronOSTM появился в 1999 году. Разработчиками материала является фирма «Mathys Medical Ltd» совместно с АО/ASIF и Институтом М.Е. Мюллера. Основой материала является β -Трикальций фосфат, который имеет пористую структуру и представляет собой систему сообщающихся ячеек. В ячейки активно мигрируют сосуды, клетки окружающих тканей. В ячейках формируется *de novo* образованная костная ткань, а кальциевый матрикс резорбируется за счет деятельности гигантских многоядерных клеток.

Однако использование этого материала в травматологии и ортопедии, по нашему мнению, не всегда возможно в связи с его резорбируемостью. Основной задачей при реконструкции любой кости является то, что она должна быть восстановлена по анатомическому и физиологическому соответствию, особенно в местах диастаза. В связи с чем предполагается дальнейшее изучение процесса остеointegrации с использованием

нерезорбируемого остеопластического материала с заселением его аутологичными МСК.

В МОНИКИ в течение 10 лет проводились клинические испытания имплантатов из нерезорбируемого остеопластического материала «БАК-1000» для передней стабилизации шейного отдела позвоночника при травматических повреждениях. Имплантаты были изготовлены из силикатной матрицы и ГА с высокой степенью пористости и возможностью легкого моделирования. Материал разрабатывался на основе матрицы из стеклопатита с объемной массой от 600 до 1200 кг/см³ с введением в ячеистую структуру ГА в количестве 60% массы. Изделия можно многократно стерилизовать сухожаровым способом, они не теряют от этого своих свойств и могут храниться в обычных условиях. В работе материал удобен, обладает достаточной прочностью и легко обрабатывается. Имплантат рентгеноконтрастен. В процессе проведения клинических испытаний выявлено, что он пропитывается трансудатом и в последующем прорастает сосудами, соединительной и костной тканью [1].

Предложенные материалы относятся к синтетическим. Для сравнения результата мы использовали природный биоматериал. К таким материалам относится коралл Асгорога, адгезивные свойства которого хорошо исследованы.

Цель нашего исследования: изучить способность матриц chronOS, БАК-1000 и коралла Асгорога к адгезии стромальных клеток жировой ткани из микросфер после культивирования их в 3D-культуре.

Материалы и методы

Исследование было проведено на трех типах остеопластических материалов: резорбируемом искусственном материале chronOS granules (SYNTHES GmbH, Германия) и нерезорбируемых материалах искусственного – БАК-1000 (РХТУ им. Д.И. Менделеева) и природного происхождения – коралле Асгорога.

Выделение стромальных клеток жировой ткани крыс (СКЖТ).

Клетки стромально-сосудистой фракции выделяли у 36 крыс по стандартному протоколу из ткани подкожного жира [5, 6]. Для этого, под общей анестезией (кетамин, 8 мг/100 г) рассекали кожу, отделяли гиподерму от мышц брюшной стенки, отрезали фрагмент подкожного жира, кожу зашивали. Извлеченный фрагмент жира помещали в стерильный транспортный контейнер в среду DMEM/F12 (Биолот) с добавлением глутамина (2 мМ L-глутамин, Биолот) и гентамицина (50 мкг/мл, ПанЭко). Полученные образцы ткани отмывали от сгустков крови и волосяного покрова в растворе Хенкса, содержащем антибиотики (1% пенициллин-стрептомицин, 400 ед/мл гентамицин, ПанЭко). Далее образцы ткани механически измельчали и ферментативно обрабатывали в растворе коллагеназы I типа (0,07%, ПанЭко) и диспазы (0,025%, ПанЭко) в течение 25 минут. После окончания инкубации в раствор с ферментами и тканью добавляли полную среду культивирования и центрифугировали в течение 5 мин. при 1000 об/мин. Полученный

осадок ресуспендировали в полной среде и пропускали через нейлоновый фильтр для того, чтобы избавиться от крупных фрагментов ткани. Далее выделенные клетки вместе с ферментированными кусочками тканей помещали на новые чашки Петри в полную ростовую среду.

2D-культивирование СКЖТ.

Культивировали клетки в стандартных условиях (37°C; 5% CO₂) в полной ростовой среде, состоящей из смеси базовых сред ДМЕМ/F-12 (1:1, Биолот), дополненной 2 мМ L-глутамин, 100 ед/мл антибиотика (гентамицин, ПанЭко) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone). Замену среды производили каждые 3 суток. Когда клетки достигали монослоя, осуществляли пассирование 2D-культуры с помощью раствора версена (Биолот) и 0,25% раствора трипсина (Биолот). После третьего пассажа выращивание в монослойной культуре СКЖТ переводили в условия 3D культивирования.

3D-культивирование СКЖТ.

Для получения микросфер клетки каждого образца ткани из монослойной культуры помещали в 12 неадгезивных 256-луночных агарозных планшетов (3D Petri Dishes, Microtissue, США) в количестве 2000 клеток в 1 микролунку (1 мкл). При этом использовали бессывороточную ростовую среду: ДМЕМ/F12 (1:1, Биолот) с добавлением 2 мМ L-глутамин, 100 ед/мл гентамицина (ПанЭко), 1% 100X раствора ИТС (инсулин-трансферрин-селенит, Биолот), bFGF (10 нг/мл, ПанЭко) и гепарина (7,5 ед/мл, Синтез). Замену среды осуществляли каждые 2 суток. Через 7 суток культивирования микросферы вымывали из агарозных планшетов и осаждали с помощью центрифугирования (5 мин., 600 об/мин, 60 g). Далее микросферы в количестве 3000 шт. помещали на остеопластический материал и культивировали в полной ростовой среде в течение 7 суток. Замену среды осуществляли каждые 24 часа.

Визуализацию морфологии клеток и микросфер осуществляли с помощью фазово-контрастного микроскопа СКХ41 (Olympus, Япония), фоторегистрацию производили цифровой камерой Invenio3S (Olympus, Япония) в программе DeltaPix (Olympus, Япония).

Растровая электронная микроскопия.

Фиксацию образцов осуществляли раствором глутарового альдегида (2,5%, 2 часа, Sigma), постфиксацию – 1% раствором OsO₄ (2 часа), далее образцы обезвоживали в спиртах восходящей концентрации (2 смены по 5 мин. в каждой) и ацетоне (3 смены по 10 мин. в каждой). Затем образцы высушивали в критической точке и перед сеансом напыляли в вакууме мелкодисперсными частицами золота, получая реплику, повторяющую контуры образца, которую впоследствии сканировали с использованием сканирующего электронного микроскопа CamScan (Япония). Часть работы с использованием методов сканирующей электронной микроскопии была выполнена на оборудовании лаборатории электронной микроскопии ЦКП Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Иммуноцитохимический анализ.

Клетки, мигрировавшие с остеопластических материалов на поверхность культурального планшета, трижды промыва-

ли фосфатно-солевым буфером (рН=7,4) и фиксировали в 4% растворе параформальдегида (Sigma, США) в течение 20 минут при +4°C. Далее клетки отмывали от фиксатора и инкубировали с первичными антителами к остеокальцину, а затем с видоспецифичными вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом FITC (Thermo Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя. Ядра докрашивали флуоресцентным красителем бис-бензимида – Hoechst 33258 (Invitrogen, США). Полученные препараты анализировали в видимом и ультрафиолетовом световых диапазонах под флуоресцентным микроскопом Olympus СКХ41 (Olympus, Япония).

Результаты

Для настоящего исследования была выбрана культура стромальных клеток жировой ткани (СКЖТ), так как данные клетки представляют собой аутологичную быстро пролиферирующую гомогенную фракцию и обладают свойствами мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга: способны дифференцироваться в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлениях. В первичной культуре клеток в основном присутствовали крупные стромальные клетки и адипоциты, несущие жировые капли (рис. 1, А). Но уже после пересева (пассирования) количественно преобладали эпителиоподобные быстроразмножающиеся прогениторные клетки (рис. 1, Б), которые к третьему пассажу приобретали морфологию мезенхимных клеток – соотношение ядра к цитоплазме больше 1, тело клетки удлинненное (рис. 1, В).

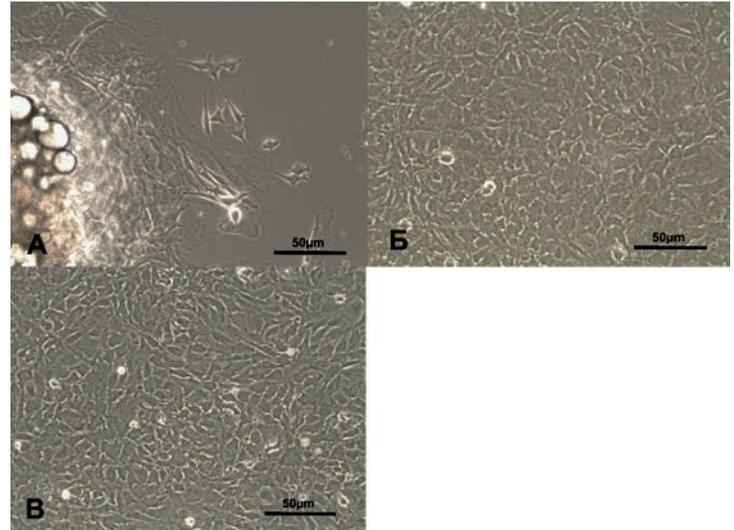


Рис. 1. Культура мультипотентных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани. А. Пассаж 0: прикрепление стромальных клеток к субстрату, и миграция стромальных клеток из ферментированной ткани. Б. Пассаж 1: монослойная культура, клетки имеют эпителиоподобную морфологию. В. Пассаж 3: монослойная культура, клетки имеют мезенхимную морфологию. Фазово-контрастная световая микроскопия

После третьего пассажа клетки переносили в агарозные планшеты, где через 7 суток культивирования стромальные клетки формировали компактные микросферы (рис. 2). Все микросферы были одинакового размера, получены из одной

культуры клеток, что позволяет считать их идентичными друг другу. Форму микросферы имели сферическую с округлыми клетками на поверхности (рис. 2, Б). Для каждого животного и каждого образца остеопластического материала было получено 3000 микросфер.

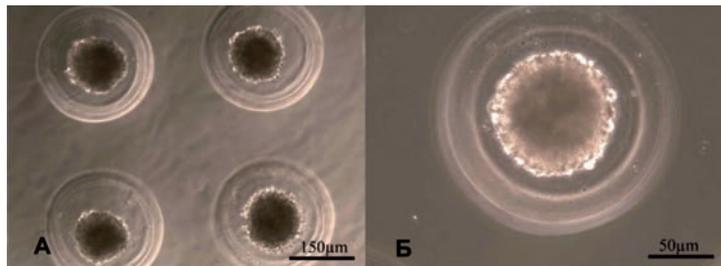


Рис. 2. Формирование микросфер из стромальных клеток жировой ткани (СКЖТ). А. 7 сутки 3D-культивирования, компактные микросферы в микролунках агарозного планшета. Б. Общий вид отдельной микросферы, 7 сутки. Фазово-контрастная световая микроскопия

Прикрепление микросфер происходило в течение первого часа сокультивирования с матрицами. Полную миграцию клеток из микросфер и формирование монослоя на поверхности остеопластического материала наблюдали на 7 сутки сокультивирования. С помощью фазово-контрастной микроскопии возможно косвенно оценить, что все представленные в данном исследовании матрицы были адгезивны для клеток (рис. 3). Данные результаты были подтверждены и с помощью растровой электронной микроскопии (рис. 4). Кроме того, было установлено, что ни один из остеопластических материалов не влияет на морфологию прикрепившихся клеток: все клетки одинакового размера и имеют вытянутое веретеновидное тело.

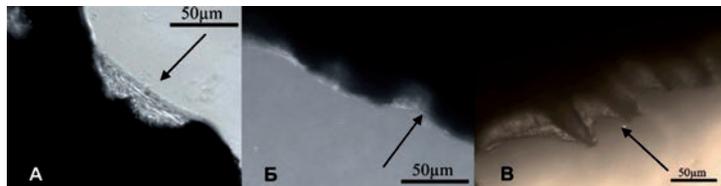


Рис. 3. Адгезия СКЖТ (черные стрелки) к матрицам chronOS (А), БАК-1000 (Б) и кораллу Асгорога (В) на 7 сутки сокультивирования. Фазово-контрастная световая микроскопия

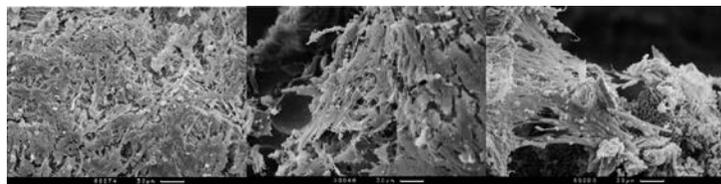


Рис. 4. Морфология стромальных клеток на поверхности матриц chronOS (А), БАК-1000 (Б) и коралле Асгорога (В) на 7 сутки сокультивирования. Растровая электронная микроскопия

Все представленные в работе остеопластические материалы обладали остеоиндуктивными свойствами: с помощью иммуноцитохимического анализа в отдельных клетках на 7 сутки сокультивирования с матрицами была установлена экспрессия маркера остеогенной дифференцировки остеокальцина (рис. 5).

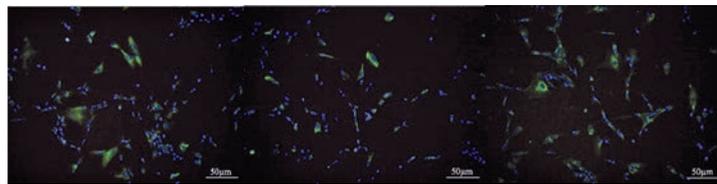


Рис. 5. Экспрессия остеокальцина (зеленый) в СКЖТ на 7 сутки сокультивирования с матрицами chronOS (А), БАК-1000 (Б) и кораллом Асгорога (В). Ядра докрашены Hoechst 33258 (синий). Флуоресцентная микроскопия

Обсуждение

Культура стромальных клеток жировой ткани является наиболее распространенной для исследования токсичности, биобезопасности и биосовместимости различных матриксов и медицинских биоматериалов [3]. В настоящем исследовании мы показали возможность использования аутологичной культуры СКЖТ для заселения остеопластических матриц после предварительного 3D-культивирования клеток в микросферах, что может быть использовано в дальнейшем при клинической практике. Микросферы представляют собой новый подход к подготовке клеток к трансплантации, так как именно в 3D-культуре клетки претерпевают мезенхимо-эпителиальный переход, приобретают устойчивость к гипоксии и формируют популяции клеток, способные к коллективному поведению [4], что значительно улучшает эффективность клеточной терапии [7]. Все исследуемые материалы – chronOS, БАК-1000 и коралл Асгорога – оказались адгезивны для клеток, мигрировавших из микросфер, и обладали свойствами остеоиндукции – индуцировали остеогенную дифференцировку в отдельных клетках. Вышеперечисленные результаты позволяют сделать вывод, что данные остеопластические материалы, несмотря на различие в физических свойствах и способе получения, могут быть успешно применены в клинической практике, в том числе в сочетании с клеточной терапией, и использованы как костная основа для тканеинженерных конструкций, направленных на устранение костных дефектов.

Список литературы

1. Кедров А.В., Рамирез Л.А., Белецкий Б.И. и др. Внутрикостные остеокондуктивные имплантаты для передней стабилизации шейного отдела позвоночника при его повреждениях // Хирургия позвоночника. 2007. № 2. С. 16–22.
2. Орлов А.А., Ипполитов В.П., Сабурова И.Н., Репин В.С. и др. Экспериментальное моделирование 3D заданного остеогенеза костной ткани на базе аутологичных культур плюрипотентных мезенхимальных стромальных клеток крыс и остеопластических материалов для устранения дефектов кости // Маэстро стоматологии. 2008. № 1(27). С. 6–12.
3. Сабурова И.Н., Колокольцова Т.Д., Кошелева Н.В., Зурина И.М., Горкун А.А., Орлов А.А., Ольховцев А.Н., Юдин Д.А. Исследование цитотоксичности стоматоло-

- гических имплантов Easy Fast S (Ti) и Easy Kon (ZrO₂) in vitro // Новое в стоматологии. 2014. №1. С. 48–52.
4. **Сабурина И.Н., Репин В.С.** 3D-культивирование: от отдельных клеток к регенерационной ткани (к вопросу о феномене эпителио-мезенхимальной пластичности) // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2010. Т.5, №2. С. 75–86.
 5. **Dubois S.G., Floyd E.Z., Zvonic S., Kilroy G., Wu X., Carling S., Halvorsen Y.D., Ravussin E., Gimble J.M.** Isolation of human adipose-derived stem cells from biopsies and liposuction specimens // *Methods Mol. Biol.* 2008. Vol. 449. P. 69–79.
 6. **Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J.I., Futrell W.J., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H.** Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell based therapies // *Tissue Eng.* 2001. Vol. 7. P. 211–226.
 7. **Bhang S., Cho S., La W., Lee T., Yang H., Sun A., Baek S., Rhie J., Kim B.** Angiogenesis in ischemic tissue produced by spheroid grafting of human adipose-derived stromal cells // *Biomaterials.* 2011. Vol. 32, №11. P. 2734–2747.