

УДК 001.1+575+576.52

БІОМІН — ПОТЕНЦІЙНИЙ МАТРИКС ДЛЯ СТВОРЕННЯ ІМПЛАНТАТІВ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ НОВОГО ПОКОЛІННЯ

І. О. СУЛІКОВСЬКА¹, В. В. БАЛАЦЬКИЙ², Т. О. КОЧУБЕЙ², Т. П. РУБАН²,
 Н. В. УЛЬЯНЧИЧ³, О. О. ПІВЕНЬ²

¹Національний технічний університет України
 «Київський політехнічний інститут ім. Ігоря Сікорського»
 Україна, 03056, м. Київ, вул. Янгеля, 16/2

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
 Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150

³Інститут проблем матеріалознавства ім. І. Н. Францевича НАН України
 Україна, 03680, Київ, вул. Кржижановського, 3
 e-mail: o.o.piven@imbg.org.ua

Створення імплантатів нового покоління або комбінованих імплантатів — є надзвичайно перспективним напрямком регенеративної медицини. Такі імплантати є поєднанням досягнень сучасного матеріалознавства та клітинної біології. Метою нашої роботи було проаналізувати біосумісність біоактивної кераміки різного хімічного складу та визначити найбільш оптимальні композити для подальшої розробки імплантатів із застосуванням синтетичних аналогів кісткової тканини та МСК пацієнта. Матеріали і методи. Роботу проводили із застосуванням первинних культур клітин МСК та ембріональних фібробластоподібних клітин GFP мишей. Методами клітинної біології аналізували цитотоксичність та біосумісність 6 композитів Біоміну. Метаболічну активність МСК визначали за допомогою МТТ-тесту. Результати. Нами було відібрано 3 композити які не є токсичними для фібробластоподібних клітин мишей: БіомінГ ТлС-500, Біомін ГТє-1, Біомін Т-500, однак аналіз темпу проліферації клітин показав що лише Біомін ГТє-1 та Біомін Т-500 здатні слугувати матриксом не обмежуючи ростовий потенціал клітин. Було показано що МСКCD73 + мали дещо нижчий рівень метаболізму на зазначених композитах кераміки порівняно із контролем, однак у системі із Біомін Т-500 МСК демонстрували кращі ростові показники. Висновки. Найбільш придатним та перспективним матеріалом для створення комбінованих імплантатів є Біомін Т-500, що складається із β-трикальційфосфату з розміром гранул 0,4–0,6 мм.

Ключові слова: Біомін, біоактивна кераміка, культура клітин, МСК, імплантат.

Вступ. Відновлення пошкодженої кісткової тканини є однією з нагальних проблем сучасної реконструктивної медицини. Нині для вирішення цієї проблеми існує ціла низка як традиційних так і більш сучасних методологічних підходів. Золотим стандартом можна вважати використання аутотрансплантатів кісткової тканини, однак можливість їхнього застосування досить часто є лімітованою через стан пацієнта та характер ураження кісткової тканини і доступність, власне, тканини для трансплантації [1, 2, 3].

Проте розвиток медичної та біологічної науки з одного боку і поширеність травм кісткової тканини різної етіології обумовлюють розвиток досліджень у цьому напрямку. І останнім часом окрім використання матеріалів алогенного або ксеногенного походження [4] все частіше пропонуються до використання і матеріали штучного походження: біоактивна кераміка на основі фосфатів кальцію, що за своїм складом аналогічна мінеральному компоненту кісткової тканини [5, 6]. Окрім того, інтенсивно розвивається і напрямок регенеративної біології і медицини, що пропонує до використання мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) самого пацієнта [7–9]. Варто зауважити що застосування МСК виділених із жирової тканини або кісткового мозку пацієнта є надзвичайно актуальним і цікавим напрямком, і, з точки зору регенерації тканин, цей підхід, мабуть, має найбільші перспективи.

© І. О. СУЛІКОВСЬКА, В. В. БАЛАЦЬКИЙ, Т. О. КОЧУБЕЙ, Т. П. РУБАН, Н. В. УЛЬЯНЧИЧ, О. О. ПІВЕНЬ, 2016

Саме цей підхід дає змогу уникнути запальних реакцій організму та дає змогу прискорити темпи реконструкції ушкодженої кістки. З іншого боку видається досить цікавим підходом об'єднати досягнення матеріалознавства та клітинної біології для створення оптимального імплантату, який би задовольняв вимоги регенеративної медицини, а саме: біосумісність, не токсичність, не інфекційність, не імуногенність, міцність, доступність та економічна доцільність застосування [10]. Створення імплантатів нового покоління або комбінованих імплантатів стає можливим із використанням якісних матриксів, що характеризуються максимальною біосумісністю та не токсичністю. Такі імплантати складаються з синтетичної біосумісної та розчинної основи і клітин пацієнтів, для їхнього подальшого використання в принципово новій технології — інженерії кісткової тканини (bone tissue engineering), яка дуже активно розвивається за кордоном. Суть методу полягає в тому, що в організмі створюють умови для відновлення ушкодженої тканини, а саме: у пористому сумісному з організмом матриксі необхідної форми культивують аутоклітини пацієнта, а потім такий імплантат поміщають у дефектну ділянку кістки після чого відбувається нарощення повноцінної кістки. Перспективним основним компонентом цих імплантатів є біоактивна кераміка, одним із таких матеріалів є Біомін [6].

Біомін, комерційна назва біоактивної кераміки на основі фосфатів кальцію, яка є аналогом мінерального компоненту кісткової тканини за своїм кристалохімічним та хімічним складом, він досить добре описаний і навіть вже застосовується для відновлення кісткової тканин, окрім того його використовують і у якості носія лікарських препаратів [11]. Процес виготовлення Біоміну дає змогу отримувати кристали різної геометрії та розміру а також легувати їх сріблом та інше. Доступність та відносно низька собівартість цього матеріалу робить його досить привабливим і для створення імплантатів із застосування МСК.

Тож метою нашої роботи було проаналізувати біосумісність біоактивної кераміки різного фазового складу та визначити найбільш оптимальні композити кераміки для подальшої розробки технології створення комбінованих імплантатів із застосування синтетичних аналогів кісткової тканин та МСК пацієнта.

Матеріали і методи

У роботі використовували біоактивну кераміку «Біомін», комерційна назва гідроксилапатиту (ГАП), цей матеріал має високу ступінь гомології до мінерального компоненту кісткової тканини, добре описаний та є запатентованим [6]. Гранули Біоміну різного складу та розміру отримувались як було описано раніше [6, 11]. У роботі використовували 6 видів біоактивної кераміки (Біоміну) різної за розмірами гранул та фазовим складом (Табл. 1). Біоактивна кераміка перед нанесенням клітин стерилізувалась автоклавуванням.

Для виділення ембріональних фібробластоподібних та мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку (МСК) використовували трансгенних мишей, які містять в своєму геномі ген GFP, що дозволяє легко візуалізувати клітини за флюоресценцією. Трансгенні тварини були отримані із Джексон лабораторії (Jackson Laboratories, USA).

Для отримання первинної культури фібробластоподібних клітин миші м'якої тканини ембріонів миші (E16-E18) промивали в десятикратному розчині пеніциліну та стрептоміцину. Шматочки тканини переносили в розчин трипсину з Версеном (0,25 % та 1 мМ відповідно) та інкубували в протягом 12 год при +4°C, після чого тканину ресуспендували та висівали на чашки Петрі (d = 3,5 см) і вирощували протягом 2–3 днів в середовищі DMEM з 10 % ембріональної сироватки ВРХ за стандартних умов (5 % CO₂, 37 °C), після чого отримані культури використовували на 1 пасажі для дослідження цитотоксичності та біосумісності біоактивної кераміки. Аналіз живих клітин проводили із застосуванням забарвлення трипановим синім. Для аналізу темпу проліферації клітин на носіях, клітини висівались у кількості 37 000 клітин на варіант та у контроль без Біоміну, після чого на 3 добу культивування проводили обрахунок живих клітин у камері Горяєва.

Для отримання первинної культури МСК використовували препаровані стегові та гомілкові кістки дорослих GFP трансгенних мишей. Кістки промивались у 10^x розчині антибіотиків (пеніцилін та стрептоміцин), після чого клітини кісткового мозку вимивались середовищем DMEM [12]. Первинні культури МСК вирощували як описано вище та розсівались у кількості 16–20 000 на носії для проведення МТТ тесту та аналізу метаболічної активності МСК на Біоміні. Для перевірки «стовбуровості» отриманих МСК

проводили аналіз експресії гену CD73 — маркеру мезенхімальних стовбурових клітин [13].

Виділення тотальної РНК, синтез кДНК, полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі проводили згідно зі стандартними протоколами [14]. Для аналізу експресії гену із виділених МСК виділяли тотальну РНК за допомогою UltraClean[®] Tissue&Cells RNA IsolationKit (MO BIO) згідно рекомендацій виробника. Отриману РНК обробляли ДНКазою I та використовували для синтезу кДНК. Синтез кДНК здійснювали за допомогою FirstStrand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) згідно рекомендацій виробника. Експресію гену CD73 визначали за допомогою пари праймерів:

F-GGACTGATTGATCCCCTCCT і R-TTGTCCCTGGATTTGAGAGG; у якості негативних маркерів застосовували праймери до генів маркерів остеобластів: osteonectin (ON): F- GCTCCACCTGGACTACATCG і R- CCAGGCGTTTCTATTCTCA; osteopontin (OP): F- CCCTACAGTCGATGTCCCCA і R- CATCCGACTGATCGGCACTC; як внутрішній контроль виділення РНК, синтезу кДНК та ПЛР використовували ген GAPDH: F- CCACTCTCCACCTTCGATG3 і R- TCCACCACCCTGTTGCTGTA.

Для дослідження фізіологічної активності МСК застосовували класичну методику МТТ-тесту [11]. Отримані суспензії клітин розсівали на 96-лункові планшети і вирощували за стандартних умов (0,5 % CO₂, 37 °C) в середовищі DMEM з 10 % ембріональної сироватки ВРХ протягом 2 діб. Клітин культивували на гранулах Біоміну та без них, останні слугували контролем для оцінки фізіологічної активності клітин. Кристали формазану розчиняли в DMSO і вимірювали поглинання на довжині хвилі 620 нм на приладі ELX 800 (BioTekInstruments).

Морфологічний аналіз МСК та ембріональних фібробластів проводили на мікроскопі Leika DM4000B.

Статистичну обробку даних проводили з використанням пакету STATISTICA 8.0.

Результати та обговорення

Біоактивна кераміка Біомін складається із фізіологічних іонів а її кристалохімічний та хімічний склад є надзвичайно близьким до кісткової тканини [6]. Усе це робить цей матеріал досить перспективним не лише у реконструктивній медицині а й дозволяє його розглядати у якості носія лікарських препаратів при терапії певних патологій [11]. Однак із розвитком клітинної біології та інженерії біоактивна кераміка починає привертати увагу дослідників і у новій якості, а саме, у якості біосумісного та нетоксичного матриксу для розробки та створення імплантатів нового покоління. Оскільки для розробки таких імплантантів важливою умовою є їхня біосумісність із кістковою тканиною та не токсичність для клітин, ми зосередились на аналізі цілої низки композитів Біоміну різного складу та розміру (Табл. 1).

На першому етапі із використанням ембріональних фібробластоподібних клітин, отриманих із м'яких тканин ембріонів трансгенних GFP мишей, ми дослідили можливість цитотоксичності біоактивної кераміки. У результаті, ми виявили, що з усіх протестованих композитів лише кристали № 1, 2 і 4 не мали цитотоксичної дії (табл. 1). Аналіз темпу проліферації клітин показав що, незважаючи на відсутність токсичності композиту Біомін ГТлС-500, ембріональні фібробластоподібні клітини проліферують набагато гірше в цій системі культивування порівняно з двома іншими препаратами (рис. 1А). У системі Біомін ГТг-1 та Біомін Т-500 клітини миші демонстрували набагато кращу адгезію та формували типові для фібробластів структури вже на 3-тю добу культивування (рис. 1А, Б).

Таблиця 1. Фізичні характеристики та результати аналізу цитотоксичності композитів Біоміна

№	Біомін	Склад	Розмір, мм	Цитотоксичність
1	Біомін ГТлС-500	ДФК (ГАП, β-ТКФ лігований сріблом)	0,4–0,6	ні
2	Біомін ГТг-1	ДФК (ГАП, β-ТКФ)	0,8–1,0	ні
3	Біомін ГТ-500	ДФК (ГАП, β-ТКФ)	0,4–0,6	так
4	Біомін Т-500	β-ТКФ	0,4–0,6	ні
5	Біомін ТГ-500	ДФК (ГАП, β-ТКФ)	0,4–0,6	так
6	Біомін ТГг-2	ДФК (ГАП, β-ТКФ)	1,0–2,0	так

Примітка: ДФК — двохфазний фосфат кальцію ГАП — гідроксилапатит, β-ТКФ — β-трикальційфосфат.

Тож для подальшої роботи ми використовували лише Біомін ГТГ-1 та Біомін ТГ-500 як не токсичні та біосумісні матрикси для культивування МСК із кісткового мозку в умовах *in vitro*. Для проведення цієї роботи ми використовували МСК кісткового мозку дорослих трансгенних GFP мишей як описано. Клітини після виділення мали типову для МСК округлу морфологію, а також експресували ген CD73 — маркер мезенхімальних стовбурових клітин і не експресували маркери остеобластів — OP і ON (рис. 2Б). Для оцінки стану МСК у системі культивування із гранулами Біоміну ми застосували МТТ тест та

проаналізували їхню фізіологічну активність на 2-гу добу культивування. У результаті нами показано, що фізіологічна активність клітин на гранулах відібраних препаратів, незважаючи на відсутню їхню токсичність дещо нижча ніж у контролі, де клітини культивувалися за стандартних умов без додавання носіїв (рис. 2А). Однак зважаючи на морфологічний аналіз живих клітин на кристалах обох препаратів Біоміну можемо зауважити, що препарат Біомін Т-500 є кращим субстратом для адгезії клітин та їхнього росту і метаболізму (рис. 2Г).

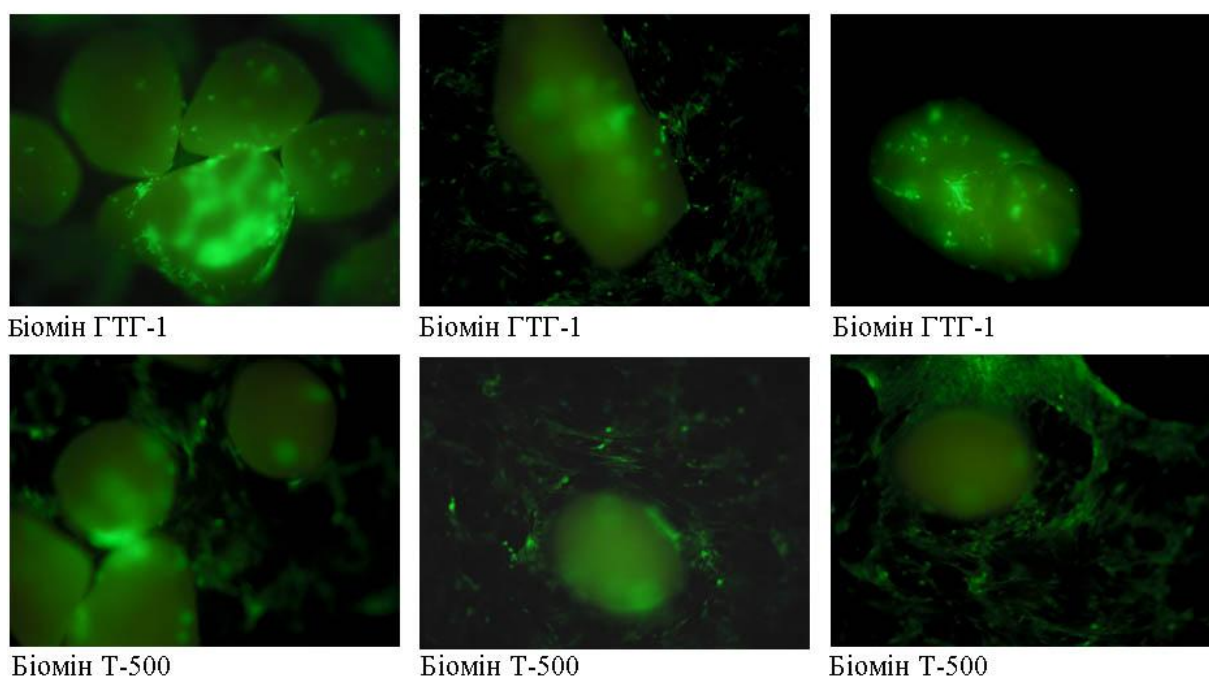
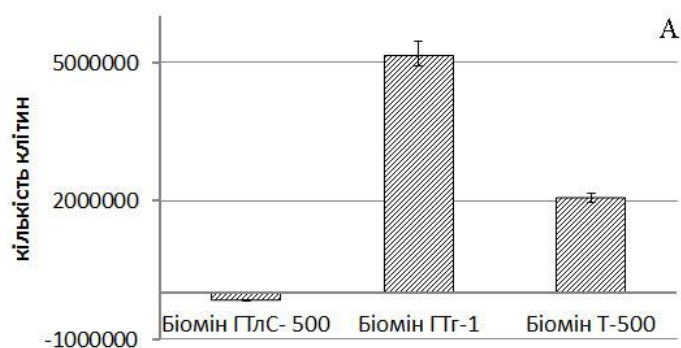


Рис. 1. Аналіз проліферації первинної культури ембріональних фібробластоподібних клітин в умовах спільного культивування із кристалами Біоміну: А — Темпи проліферації ембріональних фібробластів на гранулах Біоміну; Б — Типові конгломерати фібробластів на гранулах (LeikaDM4000B).

Висновки

Біоактивна кераміка Біомін є досить цікавим матеріалом для створення імплантатів нового покоління, що складаються із синтетичного аналога кісткової тканини, у якості матриксу, та МСК пацієнта. Зважаючи на дані метаболічної

активності клітин МСК та характеру їхнього росту у системі культивування із гранулами Біоміну найбільш придатним та перспективним матеріалом для створення комбінованих імплантатів є Біомін Т-500, що має розміри гранул 0,4–0,6 мм та складається із β -трикальційфосфату.

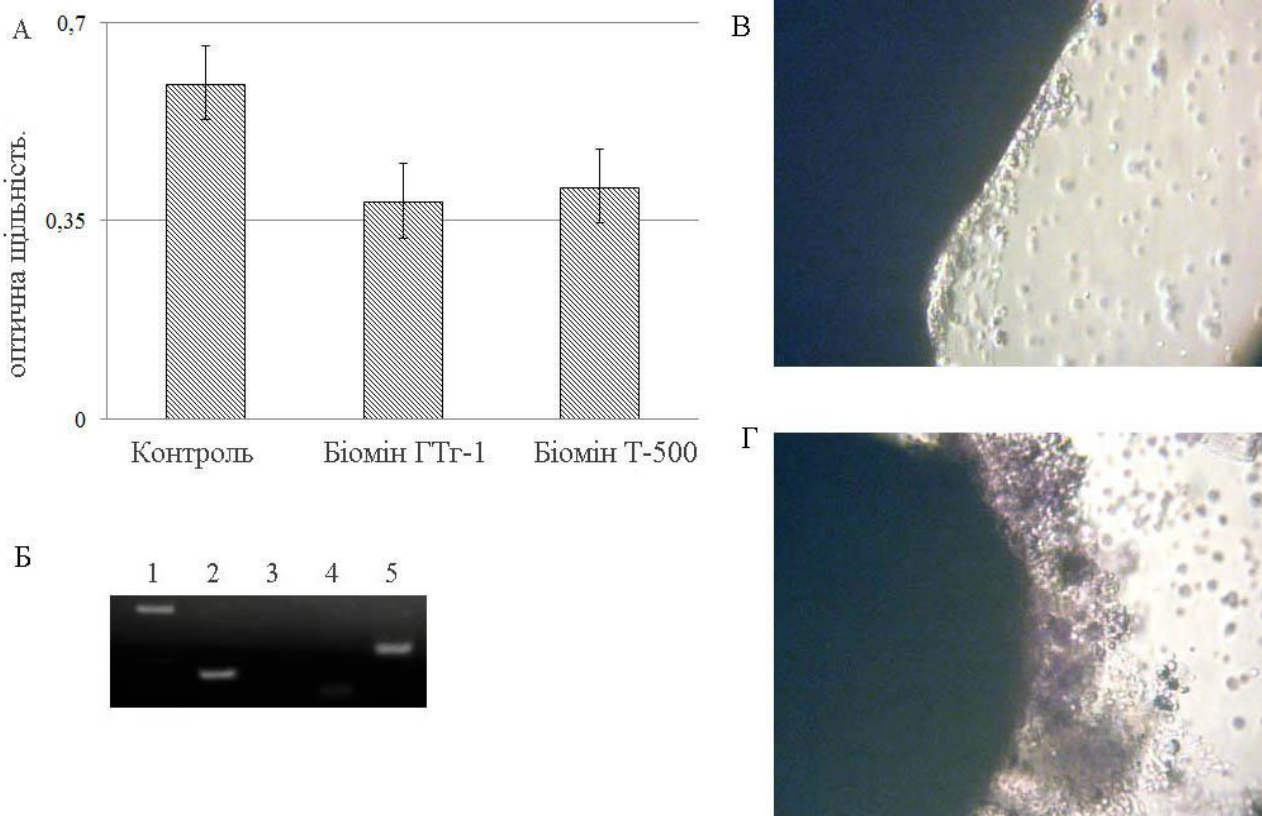


Рис. 2. Аналіз фізіологічної активності та росту МСК у системі культивування з Біоміном: А — результати МТТ тесту виявили нижчий рівень метаболізму у клітин МСК на 2-добу культивування із гранулами Біоміну; Б — ПЛР аналіз експресії маркерів мезенхімальних стовбурових клітин (CD73) та остеобластів (OPі ON) у МСК: 1 Маркер Молекулярної ваги (300bp), 2) продукт ПЛР ген CD73, 3) продукт ПЛР ген OP, 4) продукт ПЛР ген ON, 5) — внутрішній контроль вділення РНК, синтезу кДНК та ПЛР GAPDH; В — морфологія МСК на гранулах БіомінГТг-1; Г — морфологія МСК на гранулах Біомін Т-500.

Перелік літератури

1. Regis J. O'Keefe, Jeremy Mao Bone. Tissue Engineering and Regeneration: From Discovery to the Clinic — An Overview // TISSUE ENGINEERING. — 2011. — Vol. 17, № 6. — P. 389–392.
2. Georg N. Duda Bone Repair and Regeneration // Clin-OrthopRelat Res. — 2011. — Vol. 469, № 11. — P. 3070–3071.
3. Григорьян А. С. Проблемы интеграции имплантатов в костную ткань (теоретические аспекты) / А. С. Григорьян, А. К. Топоркова. — М. : Техносфера, 2007. — 128 с.
4. О. В. Кореньков. Морфологічні особливості загоєння експериментального дефекту коркового шару довгої кістки за умов імплантації β -трикальційфосфату // Ортопедия, травматология и протезирование. — 2015. — № 3. — С. 46–50.
5. Арсеньев И. Г. Экспериментально-морфологическое обоснование клинического применения деградируемых биоимплантатов в комплексном лечении переломов и ложных суставов длинных трубчатых костей : дис.... канд. мед. наук: 14.00.22, 14.00.15 / Игорь Геннадьевич Арсеньев. — М., 2007. — 200 с.
6. Ulianchych N., Mishchenko O., Kondratets I., Zaitseva N. Controlled Properties of Osteotropic Biomimetic Implant Material for Various Clinical Applications // Russian Journal of Biological Research. — 2014. — Vol. 2, № 2. — P. 100–112.
7. Kon E., Filardo G., Roffi A., Di Martino A., Hamdan M., De Pasqual L., Merli M. L., Marcacci M. Bone regeneration

- with mesenchymal stem cells // *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*. — 2012. — Vol. 9, № 1. — P. 24–27.
8. Davies G., Cooper P. R., Shelton R. M., Smith A. J., Scheven B. A. Isolation of adipose and bone marrow mesenchymal stem cells using CD29 and CD90 modifies their capacity for osteogenic and adipogenic differentiation // *Journal of Tissue Engineering*. — 2015. — Vol. 6. — P. 1–10.
9. Grottkau B. E., Lin Y. Osteogenesis of Adipose-Derived Stem Cells // *Bone Research*. — 2013. — № 2. — P. 133–145.
10. Rhijn M. R., Khairoun M., Skorevaar S. et al. Human Bone Marrow- and Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stromal Cells are Immunosuppressive *In vitro* and in a Humanized Allograft Rejection Model // *J. Stem Cell Res Ther*. — 2013. — № 6.
<http://dx.doi.org/10.4172/2157-7633.S6-001>
11. Ульянович Н. В., Иващенко Е. А., Уварова И. В. и др. Возможность использования кальцийфосфатной керамики в качестве носителя лекарственных средств // *Український морфологічний альманах*. — 2010. — Том 8, № 2. — С. 44–48.
12. Huang S., Xu L., Sun Y., Wu T., Wang K., Li G. An improved prot^oCol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow // *Journal of Orthopaedic Translation*. — 2015. — № 3. — P. 26–33.
13. Mantovani C., Raimondo S., Haneef M. S., Geuna S., Terenghi G., Shawcross S. G., Wiberg M. Morphological, molecular and functional differences of adult bonemarrow and adipose-derived stem cells isolated from rats of different ages // *ExpCellRes*. — 2012. — № 318. — P. 2034–2048.
14. Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K., Behringer R. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003. — 814 p.

Представлена Кордюмом В. А.
Надійшла 30.11.2016

BIOMIN IS PROMISING MATRIX FOR DEVELOPING OF NEW GENERATION OF BONE TISSUE GRAFTS

I. A. Sulikovska¹, V. V. Balatsky², T. A. Kochubei², T. A. Ruban², N. V. Ulianchych³, O. A. Piven²

¹National Technical University of Ukraine «Igor Sikorsky KPI», Kyiv, Ukraine

²Institute of Molecular biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

³Frantsevich Institute for Problems of Materials Sciences of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: o.o.piven@imbg.org.ua

Developing of new transplants generation or «living» grafts are extremely promising area of regenerative medicine. Such transplants are a combination of achievements of modern materials science and cell biology and consist of synthetic analogues of bone and MSK patient. **The aim** of our study was to analyze the biocompatibility of bioactive ceramics of different chemical composition and determine the optimal composites for further development of «living» grafts. **Materials and Methods.** The work was carried out with primary cell cultures using MSCs and embryonic fibroblasts were obtained from GFP mice. With cells biology methods using we have analyzed the cytotoxicity and biocompatibility of 6 Biomin composites. Metabolic activity of MSCs was determined by MTT test. **Results.** We selected 3 composites are not toxic to the embryonic fibroblasts: BiominGTIC-500 Biomin GTG-1, Biomin T-500, but analysis of the cell proliferation showed that only Biomin TG-1 and Biomin T-500 doesn't limit cells growth. It has been shown that MSC CD73 + cultivated with Biomin has lower level of metabolism compared to control, but Biomin T-500 is more promising for future application. **Conclusions.** The most suitable and promising material for bone graft developing is Biomin T-500 which has a size of granules 0,4–0,6 mm and consists of β-tricalcium phosphate

Keywords: Biomin, bioactiveceramics, cell culture, MSCs, graft.