



УДК 616.314	http://dx.doi.org/10.26787/nydha-2226-7425-2018-20-9-70-78
<p>РАЗРАБОТКА ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ГИБРИДНОЙ КОНСТРУКЦИИ ИЗ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА С ГИДРОКСИАПАТИТОМ, ЗАПОЛНЕННОЙ АЛЬГИНАТНЫМ ГИДРОГЕЛЕМ, СОДЕРЖАЩИМ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ</p> <p><i>Стамболиев¹ И.А., Бонарцев^{1,3,4} А.П., Жаркова³ И.И., Акулина^{3,4} Е.А., Гажва² Ю.В., Бонарцева⁴ Г.А., Мураев¹ А.А., Рябова² В.М., Волков¹ А.В., Златев¹ Л.Х.</i></p> <p>¹ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», г. Москва, Российская Федерация ²ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет», г. Нижний Новгород, Российская Федерация ³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», г. Москва, Российская Федерация ⁴НИИ Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, г. Москва, Российская Федерация</p> <p>Аннотация. Целью данного исследования явилась разработка трёхмерных гибридных тканеинженерных конструкций (ТИК) на основе поли-3-оксибутирата (ПОБ) и мезенхимальных стволовых клеток (МСК) для замещения костных дефектов. Регенерацию костных дефектов изучали на модели критического костного дефекта свода черепа у крыс. Для их восстановления были изготовлены трехмерные тканеинженерные конструкции на основе композита поли-3-оксибутирата и наноразмерного гидроксиапатита (ГАП): при помощи 3D-принтера была напечатана пресс-форма, в которой методом двойного выщелачивания из композита ПОБ/ГАП был сформирован скаффолд. На основе полученного скаффолда сформировали ТИК, наполнив ее раствором альгината натрия (АЛГ) и суспензированными в нем мезенхимальными стволовыми клетками с последующим его гелированием. ТИК помещали в критический костный дефект и исследовали динамику, а также параметры регенерации. Результаты имплантации, а именно остеогенную активность определяли через месяц с использованием конусно-лучевой томографии и методом гистоморфометрии. Проведенные исследования показали, что разработанная нами ТИК обладает остеогенными свойствами и способствует регенерации плоских костей черепа у крыс. Имплантация ТИК обеспечивает закрытие критического костного дефекта свода черепа у крысы до 92% его площади в</p>	<p>THE CREATION OF TISSUE-ENGINEERED THERAPEUTIC SYSTEM BASED ON HYBRID CONSTRUCTION FROM POLY-3-OXYBUXYRATE WITH HYDROXYAPATHITIS COMPLETED WITH ALGINATE HYDROGEL AND MESENCHIMAL STEM CELLS</p> <p><i>Stamboliev I.A.¹, Bonartsev A.P.^{1,3,4}, Zharkova I.I.³, Akulina E.A.^{3,4}, Gazhva Yu.V.², Bonartseva G.A.⁴, Muraev A.A.⁴, Riabova V.M.², Volkov A.V.¹, Zlatev¹ L.Kh.</i></p> <p>¹RUDN University, Moscow, Russian Federation ²Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russian Federation ³Lomonosov Moscow state university, Moscow, Russian Federation ⁴A.N. Bach Institute of Biochemistry Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation</p> <p>Annotation. The purpose of this study was the development of three-dimensional hybrid tissue-engineered construct based on poly-3-oxybutyrate and mesenchymal stem cells for the replacement of bone defects. Regeneration of bone defects was studied on the model of the critical bone defect of the cranial vault in rats. To restore them, three-dimensional tissue-engineered construct (TEC) were manufactured on the basis of a composite of poly-3-oxybutyrate (POB) and nanosized hydroxyapatite (HAp): with a 3D printer a mold was printed, where a scaffold was formed using a double leaching method from a POB / HAp composite. On the basis of the obtained scaffold, TEC was formed by filling it with sodium alginate solution (ALG) and mesenchymal stem cells (MSC) suspended therein, followed by its gelation. After TEC was placed in a critical bone defect, the dynamics and the parameters of regeneration was studied. After one month implantation results, namely, osteogenic activity, were determined using cone-beam tomography and histomorphometry. The conducted studies showed that the developed by us TEC has osteogenic properties and promotes the regeneration of flat bones of the rats skulls. Implantation of TEC provides closure of the critical bone defect of the cranial vault in the rat to 92% of its area during 1 month of observation, presumably due to the introduced scaffold into the design of MSCs and biomaterials, capable of stimulating bone growth.</p>

течение 1 месяца наблюдений, по-видимому, благодаря введенным в конструкцию МСК и биоматериалам скаффолда, способным к стимуляции роста костной ткани.

Таким образом, разработанная тканеинженерная конструкция обладает остеогенными свойствами, потенцируя регенерацию критических костных дефектов свода черепа крыс.

Ключевые слова: костные имплантаты, поли-3-оксибутират, гидроксипатит, альгинат натрия, мезенхимальные стволовые клетки, регенерация костной ткани.

Thus, the developed tissue-engineered construct possesses osteogenic properties, potentiating the regeneration of critical bone defects of the cranium of rat skull.

Key words: bone implants, poly(3-hydroxybutyrate), hydroxyapatite, sodium alginate, mesenchymal stromal cells, bone tissue regeneration.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- [1] Martin V., Bettencourt A. Bone regeneration: Biomaterials as local delivery systems with improved osteoinductive properties // *Materials Science and Engineering*. 2018. № 82. P. 363-37. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.038>
- [2] Волова Л.Т., Трунин Д.М., Пономарева Ю.Я., Попов Н.В. Исследование биосовместимости и цитотоксичности персонализированных костных имплантатов с применением клеточных технологии // *Вестник медицинского института «РЕАВИЗ»: реабилитация, врач и здоровье*. 2017. №5. С. 32-39.
- [3] Azizeh-MitraYousefi, Paul F. James, Rosa Akbarzadeh, Aswati Subramanian, Conor Flavin, Hassane Oudadesse. Prospect of Stem Cells in Bone Tissue Engineering: A Review // *Stem Cells International*. 2016. №10. P. 1-13. <https://doi.org/10.1155/2016/6180487>
- [4] Тепляшин А.С., Шарифуллина С.З., Чупикова Н.И., Сепиашвили Р.И. Перспективы использования мультипотентных стволовых клеток костного мозга и жировой ткани в регуляции регенерации опорных тканей // *Журнал Аллергология и Иммунология*. 2015. Т.1. №16. С.138-148.
- [5] Hang Lin, Jihee Sohn, He Shen, Mart T. Langhans. Bone marrow mesenchymal stem cells: Aging and tissue engineering applications to enhance bone healing // *Biomaterials*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.06.026>
- [6] López N.I., Pettinari M.J., Nikel P.I., Méndez B.S. Polyhydroxyalkanoates: Much More than Biodegradable Plastics // *Advances in Applied Microbiology*. 2015. №13. P. 73-106. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2015.06.001>
- [7] Venkatesan J, Bhatnagar I, Manivasagan P, Kang KH, Kim SK. Alginate composites for bone tissue engineering: a review // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015. №72. P. 269-281. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.008>
- [8] Rezwan K., Chen Q.Z., Blaker J.J., Boccaccini A.R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering // *Biomaterials*. 2006. №27(18). P. 3413-3431 <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.039>
- [9] Разработка и доклинические исследования ортотопических костных имплантатов на основе гибридной конструкции из поли-3-оксибутирата и альгината натрия. / А.А. Мураев, А. П. Бонарцев, Ю. В. Гажва [и др.] // *Современные технологии в медицине*. 2016. № 8(4). С. 42-50. <http://doi.org/10.17691/stm2016.8.4.06>

REFERENCES

- [1] Martin V., Bettencourt A. Bone regeneration: Biomaterials as local delivery systems with improved osteoinductive properties. *Materials Science and Engineering*. 2018. № 82. P. 363-37. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.038>
- [2] Volova L.T., Trunin D.A., Ponomareva Ju.V., Popov N.V. Assessment of biocompatibility and cytotoxicity of personalized bone implants using cell cultures. *Bulletin of Medical Institute «REAVIZ»: Rehabilitation, Physician and Health*. 2017. №5. С. 32-39.
- [3] Azizeh-MitraYousefi, Paul F. James, Rosa Akbarzadeh, Aswati Subramanian, Conor Flavin, Hassane Oudadesse. Prospect of Stem Cells in Bone Tissue Engineering: A Review. *Stem Cells International*. 2016. №10. P. 1-13. <https://doi.org/10.1155/2016/6180487>
- [4] Teplyashin A.S., Sharifullina S.Z., Chupikova N.I., Sepiashvili R.I. Perspektivy ispol'zovaniya mul'tipotentnykh stvolovykh kletok kostnogo mozga i zhirovoj tkani v regulyatsii regeneratsii opornykh tkanej. *J. Allergology and Immunology*. 2015. Vol. 1. №16. С.138-148.
- [5] Hang Lin, Jihee Sohn, He Shen, Mart T. Langhans. Bone marrow mesenchymal stem cells: Aging and tissue engineering applications to enhance bone healing. *Biomaterials*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.06.026>
- [6] López N.I., Pettinari M.J., Nikel P.I., Méndez B.S. Polyhydroxyalkanoates: Much More than Biodegradable Plastics. *Advances in Applied Microbiology*. 2015. №13. P. 73-106. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2015.06.001>
- [7] Venkatesan J, Bhatnagar I, Manivasagan P, Kang KH, Kim SK. Alginate composites for bone tissue engineering: a review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015. №72. P. 269-281. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.008>
- [8] Rezwan K., Chen Q.Z., Blaker J.J., Boccaccini A.R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006. №27(18). P. 3413-3431 <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.039>
- [9] Development and Preclinical Studies of Orthotopic Bone Implants Based on a Hybrid Construction from Poly(3-Hydroxybutyrate) and Sodium Alginate. Muraev A.A., Bonartsev A.P., Gazhva Yu.V., Riabova V.M., Volkov A.V. [et al.]. *Modern Technologies in Medicine*. 2016. № 8(4). С. 42-50. <http://doi.org/10.17691/stm2016.8.4.06>

- | | |
|--|---|
| <p>[10] Jardini A.L., Larosa M.A., Maciel Filho R., Zavaglia C. Ad. C., Bernardes L.F., Lambert C.S., Calderoni D.R., Kharmandayan P, Cranial reconstruction: 3D biomodel and custom-built implant created using additive manufacturing // Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery. 2014. №42(8): P. 1877-84. https://doi.org/10.1016/j.jcms.2014.07.006</p> <p>[11] Poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ethylene glycol) scaffolds with different microstructure: the effect on growth of mesenchymal stem cells / Bonartsev A.P., Zharkova I.I., Voinova V.V. [et al.] // 3 Biotech. 2018. №8(8). P. 328, https://doi.org/10.1007/s13205-018-1350-8</p> <p>[12] Разработка и доклинические исследования изолирующей мембраны на основе сополимера поли-3-оксибутирата-со-3-оксивалерата для направленной костной регенерации / С.Ю. Иванов, А. П. Бонарцев, Ю. В. Гажва, А. А. Мураев [и др.] // Биомедицинская химия. 2015. № 61(6), С. 717-723. http://dx.doi.org/10.18097/PBMC20156106717</p> <p>[13] Kundu J., Pati F., Hun Jeong Y., Cho D-W. Biomaterials for biofabrication of 3D tissue scaffolds // Biofabrication. Micro- and nano-fabrication, printing, patterning and assemblies. 2013. P. 23-46. https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2852-7.00002-0.</p> <p>[14] Кузнецова Д.С., Тимашев П.С., Баграташвили В.Н., Загайнова Е.В. Костные имплантаты на основе скаффолдов и клеточных систем в тканевой инженерии (Обзор) // Современные технологии в медицине. 2014. № 6(4). С. 201-212.</p> <p>[15] Pre-clinical models for oral and periodontal reconstructive therapies / Pellegrini G., Seol Y. J., Gruber R.[et al.] // Journal of Dental Research. 2009. №88 (12). P. 1065-76. https://doi.org/10.1177/0022034509349748</p> <p>[16] Effect of Dual Treatment with SDF-1 and BMP-2 on Ectopic and Orthotopic Bone Formation / Lee Chang-Hwan, Jin Myoung Uk, Jung Hong-Moon [et al.] // Plos One. 2015. №10(3). P. 1-15. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120051</p> <p>[17] Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect / P.P. Spicer, J.D. Kretlow, S. Young [et al.] // Nature Protocols. 2012. №7(10). P. 1918-29. https://doi.org/10.1038/nprot.2012.113</p> <p>[18] Burr D.B., Allen M.R. Basic and Applied Bone Biology. Academic Press. 2013. P. 390.</p> | <p>[10] Jardini A.L., Larosa M.A., Maciel Filho R., Zavaglia C.Ad.C., Bernardes L.F., Lambert C.S., Calderoni D.R., Kharmandayan P, Cranial reconstruction: 3D biomodel and custom-built implant created using additive manufacturing. Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery. 2014. №42(8): P. 1877-84. https://doi.org/10.1016/j.jcms.2014.07.006</p> <p>[11] Poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ethylene glycol) scaffolds with different microstructure: the effect on growth of mesenchymal stem cells. Bonartsev A.P., Zharkova I.I., Voinova V.V. [et al.]. 3 Biotech. 2018. №8(8). P. 328, https://doi.org/10.1007/s13205-018-1350-8</p> <p>[12] Development and preclinical studies of insulating membranes based on poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate for guided bone regeneration. S. Yu. Ivanov, A. P. Bonartsev, Yu. V. Gzhva, A. A. Murav [et al.]. Biomeditsinskaya Khimiya. 2015. № 61(6), С. 717-723. http://dx.doi.org/10.18097/PBMC20156106717</p> <p>[13] Kundu J., Pati F., Hun Jeong Y., Cho D-W. Biomaterials for biofabrication of 3D tissue scaffolds. Biofabrication. Micro- and nano-fabrication, printing, patterning and assemblies. 2013. P. 23-46. https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2852-7.00002-0.</p> <p>[14] Kuznetsova D.S., Timashev P.S., Bagratashvili V.N., Zagaynova E.V. Scaffold- and Cell System-Based Bone Grafts in Tissue Engineering (Review). Modern Technologies in Medicine. 2014. № 6(4). С. 201-212.</p> <p>[15] Pre-clinical models for oral and periodontal reconstructive therapies / Pellegrini G., Seol Y. J., Gruber R.[et al.]. Journal of Dental Research. 2009. №88 (12). P. 1065-76. https://doi.org/10.1177/0022034509349748</p> <p>[16] Effect of Dual Treatment with SDF-1 and BMP-2 on Ectopic and Orthotopic Bone Formation. Lee Chang-Hwan, Jin Myoung Uk, Jung Hong-Moon [et al.]. Plos One. 2015. №10(3). P. 1-15. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120051</p> <p>[17] Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. P.P. Spicer, J.D. Kretlow, S. Young [et al.]. Nature Protocols. 2012. №7(10). P. 1918-29. https://doi.org/10.1038/nprot.2012.113</p> <p>[18] Burr D.B., Allen M.R. Basic and Applied Bone Biology. Academic Press. 2013. P. 390.</p> |
|--|---|

Оптимизация процессов репаративной регенерации костной ткани остаётся актуальной задачей экспериментальной и клинической медицины. Традиционные остеопластические материалы, применяемые для заполнения костных дефектов и обеспечения лучших условий для регенерации, обладают остеокондуктивными и/или остеоиндуктивными свойствами [1]. В любом случае при их использовании успех регенерации зависит от репаративных возможностей костной ткани макроорганизма [1]. Клеточные технологии активно применяются в репаративной медицине, для выращивания искусственных и восстановления поврежденных тканей [2, 3]. В частности, в научной литературе растёт

количество публикаций по использованию различных видов стволовых клеток, в том числе мезенхимальных стволовых клеток, в составе остеопластических материалов [4, 5].

В тканевой инженерии активно используется подход создания гибридных конструкций с использованием различных биополимеров и минеральных веществ. Одними из наиболее используемых полимеров для биоинженерии твердой соединительной ткани являются поли-3-оксибутират (ПОБ) с его сополимерами и альгинаты (АЛГ), которые по своим свойствам сильно различаются [6, 7, 8]. ПОБ относится к полиэфирам, является гидрофобным, механически

прочным, биodeградируемым с низкой скоростью, тогда как АЛГ – это полисахарид, гидрофильный, образующий гидрогели, механически непрочный, растворимый в тканях. Образование композитов из полимеров этих двух классов позволяет регулировать свойства полученного композитного материала в самых широких пределах. АЛГ широко используются для изготовления матриксов для инженерии костной, хрящевой, мягкой соединительной и мышечной тканей [7], тогда как матриксы на основе ПОБ используются преимущественно для регенерации костной ткани [6].

Авторами разработана технология изготовления комбинированных объёмных скаффолдов на основе ПОБ, насыщенного наноразмерным гидроксиапатитом (ГАП) [9]. Предложенный метод позволяет изготавливать скаффолды произвольной формы, повторяющей форму восстанавливаемого дефекта [10]. В данной статье описан метод изготовления тканеинженерных конструкций на основе скаффолдов из композита ПОБ с ГАП, насыщенных альгинатным гидрогелем, содержащим МСК, и в эксперименте изучены их биологические свойства в отношении костной регенерации.

Цель исследования. Разработка трёхмерных гибридных тканеинженерных конструкций на основе поли-3-оксибутирата и мезенхимальных стволовых клеток для замещения костных дефектов.

Материалы и методы. Изготовление скаффолдов и их характеристика. Для проведения исследования были изготовлены сложные тканеинженерные конструкции (ТИК) на основе скаффолда из композита ПОБ, наноразмерного ГАП и насыщенные гидрогелем АЛГ с введенными в него МСК. Технология получения самих скаффолдов ПОБ/ГАП/АЛГ, разработана ранее и описана в статье [9].

Для получения скаффолдов был использован ПОБ (ММ=130 кДа), полученный по оригинальной методике контролируемого биосинтеза с использованием штамма-продуцента *Azotobacter chroococcum* 7Б [11]. Помимо ПОБ в работе были использованы следующие материалы и реактивы: гидроксиапатит (Сигма-Алдрич, Германия), альгинат натрия (Сигма-Алдрич, Германия), МСК выделены из костного мозга 3-х дневных крысят, трихлорметан (ЕКOS-1, Russia), карбонат аммония (Химмед, Россия), сахароза (Химмед, Россия), пруток из полилактида диаметром 1,75 мм 3D для печати прессформ методом послойного наплавления (температура плавления 200-255°C, плотность 1,2-1,08 кг/м³, FDPlast, Россия), Золетил 100 (Virbac, Франция), доксициклин (Бинергия ЗАО (Россия), тетрациклин (Биохимик ОАО, Россия), ализариновый красный (ХимМедСервис, Россия).

Метод введения МСК в скаффолды для получения ТИК. На стадии заполнения пористых скаффолдов из

ПОБ/ГА/АЛГ, в них вводили МСК, предварительно помещенные в 1% альгинат натрия. Порошок альгината натрия, стерилизованный в спирте и под ультрафиолетом, растворяли 6 часов при перемешивании на магнитной мешалке в физиологическом растворе с концентрацией 1,5% в стерильных условиях в ламинарном шкафу. Затем готовили суспензию АЛГ с клетками в концентрации 200 000 клеток в 1 мл суспензии (итоговая концентрация альгината составила 1,0%). Полученной суспензией с помощью автоматической пипетки пропитывали полученные на первой стадии скаффолды ПОБ/ГА по 100 мкл (20 000 клеток) суспензии на один образец. После пропитки удаляли лишний альгинат и заливали стерильным 50 мМ раствором СаСl₂ для полимеризации альгинатного гидрогеля, содержащего клетки. После инкубации в течение 3 минут в хлориде кальция, скаффолды промывали в фосфатном буфере и затем помещали в среду для дальнейшего эксперимента.

Исследование роста МСК в скаффолдах. Для исследования роста МСК на биополимерных композитах и биокомпозитных скаффолдах *in vitro* были использованы МСК крыс, выделенные из костного мозга 3-х дневных крысят. Клетки культивировали в среде ДМЕМ в стандартных условиях [11]. Все эксперименты были проведены согласно правилам гуманного обращения с лабораторными животными по ГОСТ ISO 10993-1-2011.

Для исследования роста МСК в скаффолдах, содержащих АЛГ, сначала готовили суспензию АЛГ соответствующей концентрации с клетками в концентрации 200 000 клеток в 1 мл суспензии. Полученной суспензией с помощью автоматической пипетки пропитывали скаффолды на основе ПОБ/ГА из расчета 2000 клеток на один образец скаффолда для исследования. После пропитки удаляли лишний альгинат и заливали стерильным 50 мМ раствором СаСl₂ для полимеризации альгинатного гидрогеля, содержащего клетки. После инкубации в течение 3 минут в хлориде кальция, скаффолды промывали в фосфатном буфере и затем помещали в среду для дальнейшего эксперимента. Учет пролиферации клеток исследовали с помощью метода ХТТ с использованием набора реактивов (Сигма-Алдрич, Германия). Данная методика основана на том, что живые клетки преобразуют соли тетразолия в окрашенные соединения формазана. Её биохимические механизмы основаны на активности митохондриальных ферментов, которые инактивируются вскоре после гибели клетки. Этот подход оказался очень эффективным при оценке жизнеспособности клеток. Планшеты инкубировали 24, 72 и 120 часов в случае теста на цитотоксичность, а в случае теста на биосовместимость - 24, 72, 120 и 168 часов. По прошествии экспериментального времени в случае теста на

цитотоксичность, скаффолды извлекали из лунок, а затем добавляли по 50 мкл смеси ХТТ в каждую лунку; в случае же теста на биосовместимость, скаффолды переносили в лунки с 100 мкл свежей среды и инкубировали при 37°C в течение 2,5 часов, после чего скаффолды извлекали из лунок и растворяли SDS (натриевая соль лаурилсерной кислоты). Измерения проводили на планшетном спектрофотометре Zenyth 3100 Microplate Multimode Detector (Anthos Labtec Instruments GmbH, Австрия) [11].

Оценивали относительное количество прикрепленных клеток на первые сутки, а также увеличение их количества к 5 или 7 суткам. Численно выражали через число клеточных делений, рассчитанных по формуле: $n = \lg N - \lg N_0 / \lg 2$.

Где n - число клеточных делений, N - конечное количество клеток, N_0 - изначальное количество. Количество клеток определяли по калибровочной кривой. Затем рассчитывали относительное количество клеток в процентах от начального их количества, добавленного к образцу скаффолда [11].

Перед имплантацией ТИК заполняли 1% раствором альгината натрия до полного насыщения и затем помещали в 5% раствор $CaCl_2$ до полного гелирования альгината в скаффолде, после чего полученный гибридный скаффолд промывали ФБС.

Подобная гибридная конструкция из скаффолда на основе ПОБ, заполненного альгинатом натрия была разработана с учетом ранее полученных данных. Нами было показано, что барьерная мембрана из ПОБ и паста для заполнения костных дефектов на основе микросфер из ПОБ в альгинатном геле обладает остеокондуктивными свойствами [9, 12].



А



Б

Рис. 1. Этапы операции: А – сформирован критический костный дефект, Б – дефект закрыт костным ТИК и подшит к надкостнице

Флюоресцентные метки для изучения скорости регенерации костных дефектов. Для оценки динамики неоостеогенеза на разных сроках проводили прижизненное тройное мечение новообразованной костной ткани. Во всех экспериментальных группах крысам внутрибрюшинно вводили раствора доксицилина на 8-й, 9-й и 10-й день после операции, этот срок

In vivo исследования разработанных ТИК. Для исследования регенерации костей черепа наиболее показательной является модель критического костного дефекта свода черепа (теменной кости) у крысы [17], позволяющая получить воспроизводимые данные и сравнить их с результатами других исследований [12, 13, 16]. Данную модель используют для изучения эффективности и безопасности различных костезамещающих материалов, в том числе скаффолдов с факторами роста и клетками [15, 16].

Методика операции. Исследование проводили на 30 самцах крыс линии Wistar массой тела 400 г., которые распределили на 2 группы: опытную и контрольную. В контрольной группе, которую составили 10 животных дефект оставался незаполненным. Эксперимент соответствовал рекомендациям локального биоэтического комитета НижГМА (Протокол № 8а от 10.11.2015г.), при его постановке руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» в соответствии с приказами МЗ СССР № 755 от 12.08.1977г. и № 701 от 24.07.1978г. и «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» от 2003г.

Под внутрибрюшинным наркозом «Золетил 100» (Франция) в дозировке 125 мкг/кг крысам производили поперечный и вертикальный латерально-смещённый разрез кожи головы, формируя треугольный лоскут, обнажали теменные кости. Посередине сагиттального шва на теменных костях формировали круглое отверстие с помощью трепана C-reamer диаметром 8 мм и высотой 1,5 мм из набора Neobiotech SLA (Корея), избегая перфорации сагиттального венозного синуса. Рану послойно ушивали. (Рисунок 1 А, Б).

соответствовал началу активной минерализации остеоида. На 15-й, 16-й и 17-й день эксперимента вводили раствор тетрациулин, который, включаясь в новообразованную костную ткань, образует новую меченую область. На 22-й, 23-й и 24-й день вводили ализарин красный С для полного окрашивания краёв минерализованного регенерата. Метки вводили в дозировке 25 мг/кг

массы тела. Таким образом, мечение осуществляли по схеме 7-3-4-3-4-3-4 (три дня введения чередовались с четырехдневными перерывами).

На 28-й день, что соответствовало окончанию процессов первичного остеогенеза [18], крыс выводили из эксперимента передозировкой наркотика Золетил/Рометар. Скелетировали свод черепа, область регенерата выделяли с использованием хирургических цилиндрических боров и физиодиспенсера. Полученные образцы свода черепа фиксировали в 40% этиловом спирте в течение 24 часов. Такой способ фиксации широко употребляется для сохранения флуоресцентных меток и хорошей пропитки костной ткани.

Гистологическое исследование. Образцы фиксировали в 70% этаноле в течение 24-72 часов. Затем промывали, обезвоживали и заливали в метилметакрилат (Osteo-Bead, Sigma-Oldrich) по стандартной методике, рекомендованной производителем с последующей полимеризацией. Из полученных блоков изготавливались первичные срезы 200 мкм (Lowspeed saw Jet, Швейцария), из которых готовились вторичные срезы толщиной 40-50 мкм. Контроль толщины среза осуществлялся стандартным механическим микрометром барабанного типа. Микроскопическое исследование проводилось с использованием флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B. Микрофотографирование проводилось с использованием стандартного набора светофильтров, следующим этапом, было сложение RGB-каналов в единое изображение с использованием штатного программного продукта Leica для

флуоресцентной микроскопии (мультиканальная гистопантограмма).

Рентгенологическое исследование. Полученные пластиковые блоки перед изготовлением срезов исследовали на конусно-лучевом компьютерном томографе. Сканирование проводили в конусно-лучевом томографе Point 3D Combi 500 C, (Pointnix, Ю. Корея) на отработанном режиме 63kVp/7mA. При помощи программного обеспечения Horos Project-Free DICOM Medical Image Viewer измеряли площадь заращения костного дефекта. Для этого используя встроенный в программу инструмент обводили границы дефекта и программа высчитывала его площадь.

Результаты и обсуждение. Структура и морфология скаффолдов. По методике двойного выщелачивания нами были получены трехмерные скаффолды из ПОб/ГА (рис. 2). Изучение образцов полимерных подложек методом СЭМ (световой электронной микроскопии) (рис. 3) показало, что скаффолды имеют трехмерную пористую структуру с размером пор, указанных в таблице (таб. 1). Макропоры больше 300 мкм считаются оптимальным размером для проникновения питательных веществ и клеток во всем объеме материала.

Методом окрашивания чернилами определяли характер системы пор. В результате было доказано, что скаффолды из ПОб имеют сообщающуюся систему пор. В результате расчетов в среднем пористость скаффолдов составила 92% (табл. 1).

Таблица 1

Морфологические характеристики скаффолда на основе 3-полиоксипропирата

Тип скаффолда	Пористость, %	Размер пор, мкм		Связность пор
		Макропоры	Микропоры	
ПОб/ГА/АЛГ	92±1	365±65	18±7	+

Результаты исследования роста МСК в ТИК. Был исследован рост МСК на скаффолдах ПОб/ГАП/АЛГ, составляющих основу ТИК. Исследование роста МСК в скаффолдах с использованием теста на жизнеспособность ХТТ показало, что наблюдается слабый рост

МСК на скаффолдах, который тормозится к 7 сут. (рис. 2). Была проанализирована цитотоксичность скаффолдов, то есть их способность подавлять рост клеток в стандартных условиях на пластике также с использованием теста на жизнеспособность ХТТ (рис. 3).

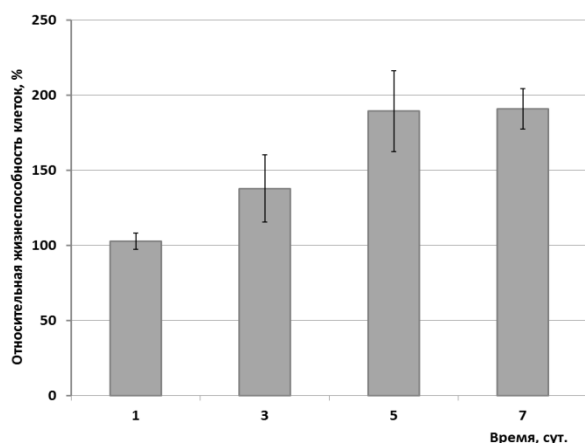


Рис. 2. Рост МСК на скаффолдах ПОБ/ГА/АЛГ (относительная жизнеспособность клеток в % от количества первоначально внесенных на скаффолд клеток)

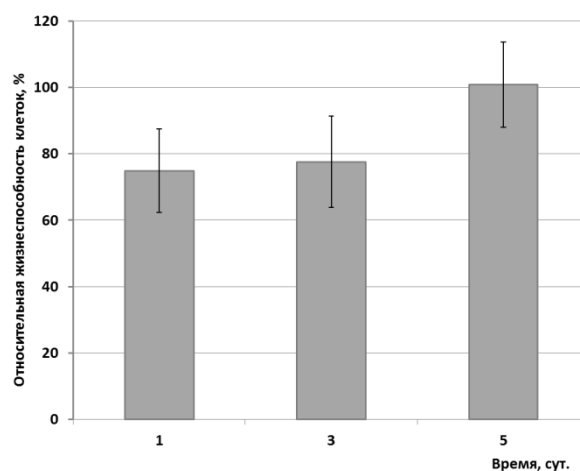


Рис. 3. Цитотоксичность скаффолдов ПОБ/ГА/АЛГ по отношению к МСК (относительная жизнеспособность клеток в % от количества клеток в контроле на культуральном пластике)

На диаграмме (рис. 3) видно, что в присутствии исследуемых образцов количество клеток меняется незначительно по сравнению с контролем, что говорит об отсутствии цитотоксичности, хотя имеется тенденция к ингибированию роста МСК на 1 и 3 сут. в скаффолдах из композита ПОБ/ГА, но данное изменение статистически недостоверно.

Результаты рентгенологического исследования. Полученные результаты компьютерной томографии черепов крыс позволили измерить площадь

регенерации дефектов в исследуемых группах. На рисунках 4А, 4Б представлен результат измерений в опытной группе с минимальным (рис. 4А) и максимальным результатами по площади регенерата (рис. 4Б). На рисунке 4А площадь неминерализованного костного дефекта составила 5 мм², что соответствует 10% от исходной площади дефекта, на рисунке 4Б площадь неминерализованного костного дефекта составила 0,8 мм², что соответствует 1,6% от исходной площади дефекта.

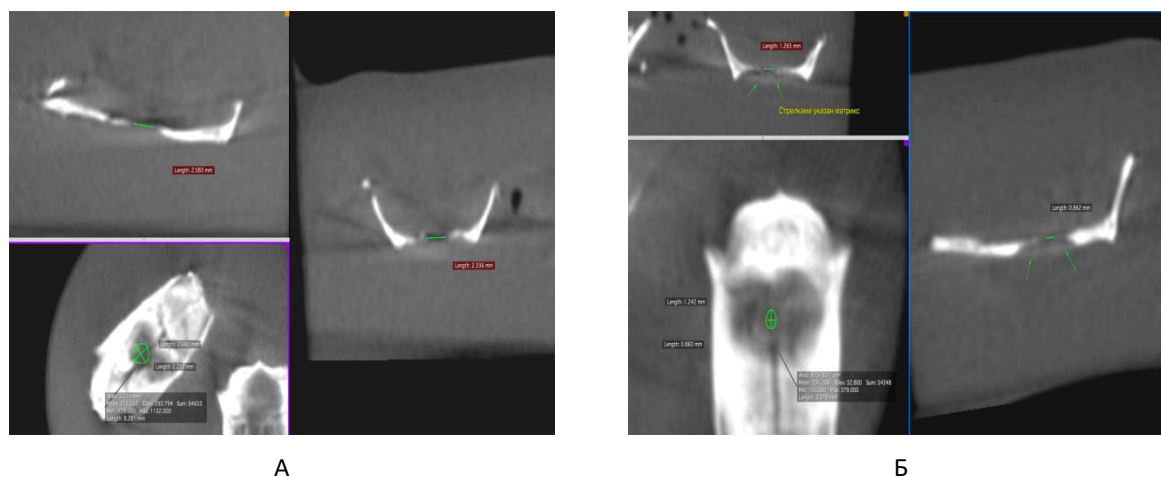


Рис. 4. Рентгенологическая картина критического костного дефекта свода черепа крысы через месяц после его заполнения ТИК.

Результаты гистологического исследования. При микроскопическом исследовании с использованием флуоресцентной микроскопии образцов костной ткани теменных костей крыс выявлено, что накопление

флуоресцирующих меток в костной ткани произошло успешно. Основываясь на данных исследования гистологических срезов образцов костной ткани при помощи флуоресцентной микроскопии с раздельным

окрашиванием флюорохромами было выявлено, что при имплантации в критический костный дефект теменной кости крысы разработанных ТИК, наблюдалось

до 92% закрытие критического костного дефекта свода черепа у крысы с новообразованной костной ткани (рис. 5, 6).

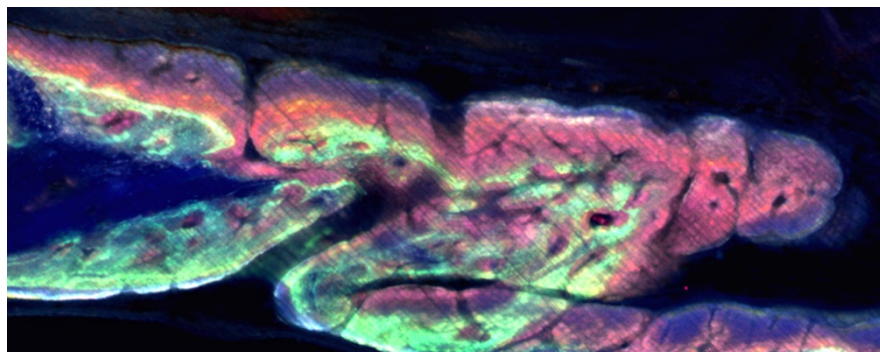


Рис. 5. Раздельное окрашивание флюорохромами новообразованной костной ткани. Люминисцентная микроскопия. Мультиканальное изображение. Ув. x100

На рисунке 5 отмечается преимущественное накопление ализаринового красного в костном веществе, что свидетельствует о нарастании интенсивности репаративного остеогенеза во второй и третьей декаде исследования. На рисунке 6 определяется почти полное

заполнение дефекта новообразованной костной тканью через 28 дней после имплантации. На рисунке 6 наблюдается почти полное заполнение дефекта новообразованной костной тканью через 28 дней после имплантации.

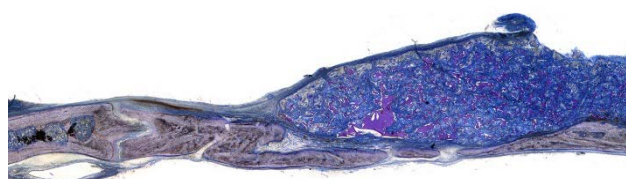


Рис. 6. Мультиканальное люминисцентное и световое изображения костного регенерата. Гистопантограмма. Ув. x50

На рисунке 7 можно детально проследить площадь и скорость образования костной ткани на основе ТИК.

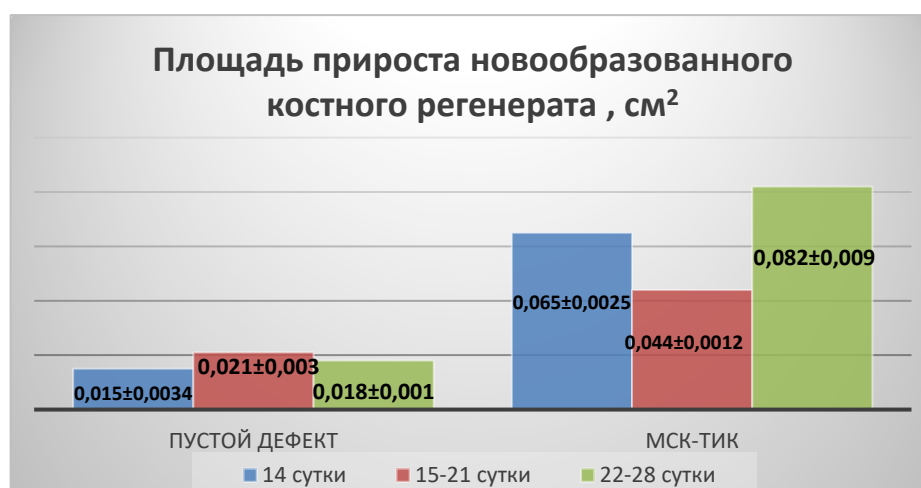


Рис. 7. Динамика регенерации критических костных дефектов свода черепа крысы опытной группы – при заполнении дефектов ТИК, и контрольной – пустых дефектов.



Из данных диаграммы (рис. 7) видно, что происходит как увеличение площади костного регенерата, образовавшегося за первые 14 суток (МСК-ТИК $Md.A_{ГD}=0,065\pm 0,005 \text{ см}^2$), так и увеличение скорости прироста костной ткани (МСК-ТИК $MFR_{0-14}=388\pm 19,5$ мкм/сут). Однако в последующем (с 15-21 сутки), скорость образования кости замедляется (МСК-ТИК $MFR_{15-21}=333,3\pm 15,7$), что выражается в умеренной стабилизации площади новообразованной костной ткани на уровне $0,044\pm 0,005 \text{ см}^2$ (МСК-ТИК $Md.A_{ГT}$). В последующем (с 22-28 день) скорость образования костной ткани после трансплантации ТИК увеличивается (МСК-ТИК $MFR_{22-28}=483\pm 14,7$ мкм/сутки), что приводит образованию значительно массива костной ткани - площадь, занимаемая новообразованной костной тканью в этот период (22-28 день) составляла $0,082\pm 0,005 \text{ см}^2$.

Таким образом, нами выявлено что, имплантация разработанной ТИК, содержащей клеточную культуру МСК проявляла выраженную стимуляцию репаративного остеогенеза с увеличением первичной площади, занимаемой костным регенератом на поверхности твердой мозговой оболочки.

Эксперимент соответствовал «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» в соответствии с приказами МЗ СССР № 755 от 12.08.1977г. и № 701 от 24.07.1978г. и «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» от 2003г.

Выводы. Таким образом, нами была разработана методика получения тканеинженерной терапевтической системы на основе скаффолда из композита ПОБ/ГА, заполненного альгинатным гидрогелем, содержащим МСК, и продемонстрирована ее эффективность по регенерации костной ткани на экспериментальной модели критического костного дефекта (до 92% площади дефекта) у крыс.

Финансирование исследования. Работа выполнена при поддержке гранта Российского Научного Фонда (Соглашение № 15-15-10014 от 01.05.2015г.) во всех частях, за исключением биосинтеза поли-3-оксибутирата, который был выполнен в рамках гос. задания, № гос. регистрации 01201351358.

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

