

УДК 57.085.23, 57.089.67

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ МЕЗЕНХИМНЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ РОСТЕ НА БИОКЕРАМИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ «БИОСИТ-СР ЭЛКОР»

Касьянова Е.С., Александрова С.А., Сердобинцев М.С., Блинова М.И.

ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет

Петра Великого»;

ФГБУН «Институт цитологии» РАН;

ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России

VIABILITY OF MESENCHYMAL MULTIPOTENT STROMAL CELLS CULTIVATED ON BIOCERAMIC MATERIAL "BIOSIT-SR ELCOR"

Kasianova E.S., Alexandrova S.A., Serdobintsev M.S., Blinova M.I.

FAEI HE "Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University",

FSFIS "Institute of Cytology" RAS,

FAEI "Saint-Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation"

Аннотация

Исследована жизнеспособность мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) при культивировании на биокерамическом материале «Биосит-Ср Элкор». Для оценки морфологии и жизнеспособности клеток использовались методы прижизненной световой микроскопии и МТТ-тест. В результате исследования выявлено, что материал содержит микрочастицы, которые негативно влияют на жизнеспособность клеток. Была разработана методика очистки материала от микрочастиц.

Ключевые слова: остеозамещающие материалы, биоситалл, гидроксиапатит, даллит, «Биосит-Ср Элкор», мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, жизнеспособность.

Биокерамика является одним из наиболее перспективных искусственных остеозамещающих материалов. Однако, большинство биокерамических материалов имеют модуль упругости больше, чем у натуральной кости. Это может приводить к резорбции подлежащей костной ткани, и, как следствие, дистрофическим и деструктивным процессам [1]. Решением этой проблемы может стать создание биокерамических материалов, способных к активной остеоинте-

Abstract

The viability of mesenchymal multipotent stromal cells cultivated on bioceramic material "Biosit-Sr Elcor" was studied. Methods of intravital light microscopy and MTT-test were used. It was found that the material contains microparticles, which adversely affected on the viability of cells. A method of cleaning the material from microparticles was developed.

Keywords: osteoreplacement materials, biositall, hydroxyapatite, dallit, «Biosit-Sr Elcor», multipotent mesenchymal stromal cells, viability.

грации в костную ткань. Большинство исследований в этом направлении связано с изучением материалов, включающих сульфат кальция, трикальцийфосфат или гидроксиапатит (ГАП) [2, 3]. Специалистам Санкт-Петербургского государственного технологического института удалось создать синтетический аналог природной формы ГАП - даллит и разработать новый перспективный материал – биоситалл на основе биокерамики с входящим в состав

даллитом (коммерческое название «Биосит-Ср Элкор») [4]. Даллит входит в состав костной ткани и отличается от ГАП более реакционноспособной формулой, вследствие чего является более биорезорбируемым и остеоиндуктивным [4, 5]. Клинические испытания «Биосит-Ср Элкор» проходили на кафедре челюстно-лицевой хирургии СПбМАПО с 1995 г. [6]. В ходе этих испытаний исследовалась эффективность остеозамещения у пациентов с различными группами заболеваний пародонта. Были получены доказательства положительного влияния остеопластического материала на отдалённых сроках наблюдений (до 7 лет), что позволило рекомендовать его к широкому применению для замещения дефектов ткани костного гребня альвеолярного отростка челюстей. Однако, несмотря на успешное применение материала в клинической практике, в некоторых случаях возникали осложнения, проявляющиеся в виде местных воспалительных реакций [7, 8]. В модельном эксперименте по восстановлению перелома в верхней трети бедренной кости на 108 половозрелых крысах «Биосит-Ср Элкор» был имплантирован непосредственно в костно-мозговой канал. Было выявлено, что биоситалл в тканях экспериментальных животных на сроках до 3 недель вызывал гранулематозное воспаление с макрофагальной реакцией. В дальнейшем мелкие частицы фагоцитировались, а крупные оставались замурованными в рубцовой ткани без признаков воспаления. В канале бедренной кости на ранних сроках макрогранулы биоситалла окружались грануляционной тканью с примесью единичных многоядерных клеток. Вокруг микрогранул биоситалла формировались новообразованные остеоидные и костные балочки, непосредственно вокруг частиц биоситалла отмечалась пролиферация остеобластов с продукцией остеоида [8]. В наших экспериментах по изучению биосовместимости и цитотоксичности биоситалла «Биосит-Ср Элкор» на клеточных культурах было отмечено его измельчение в процессе обычных (рутинных) манипуляций. Образовывались частицы различных форм и размеров в диапазоне <math><1-20\text{ мкм}</math>. Мы предположили, что именно эти частицы вызывают негативные воздействия на клетки и их органеллы. Также нами было отмечено, что в разных размерных фракциях «Биосит-Ср Элкор» количество выкрашивающихся частиц разное, что может по-разному влиять на жизнеспособность окружающих тканей.

Цель работы - изучить жизнеспособность ММСК костного мозга кролика при культивировании с биоситаллом «Биосит-Ср Элкор».

Для этого были поставлены следующие задачи:

1) дать качественную оценку морфологических характеристик и жизнеспособности клеток при инкубации на гранулах биоситалла;

2) дать качественную оценку морфологических характеристик и жизнеспособности клеток после их инкубации в экстрактах биоситалла;

3) предложить схему культивирования клеток на гранулах биоситалла, при которой клетки проявляют максимально возможную жизнеспособность.

Материалы. В качестве тест-системы использовали ММСК костного мозга кролика. Культуру выделяли из костей конечностей новорожденного кролика породы Шиншилла по стандартной методике [9].

Остеозамещающий биоситалл силико-алюмофосфатной группы «Биосит-Ср Элкор», в состав которого входят даллит, оксиды кальция, кремния, фосфора, алюминия, магния и цинка ($\text{SiO}_2 - \text{P}_2\text{O}_5 - \text{Al}_2\text{O}_3 - \text{RO} - \text{CaO}_2$). Материал производится НПФ «Элкор» (г. Санкт-Петербург). Общая пористость материала составляет 60%. В работе были исследованы фракции с размерами гранул в диаметре 0,1-0,3 мм; 0,3-0,5 мм; 0,5-1,5 мм, 2-3 мм.

Экстракт (смывы) получали, помещая 0,5 г «Биосит-Ср Элкор» фракции 0,1-0,3 мм в 6 мл питательной среды α MEM (Lonza, Бельгия) с 10%-ным содержанием СЭК (сыворотки эмбрионов коров) (HyClone, США) на 5 мин. После чего отбирали 2 мл экстракта без осадка, встряхивали и отбирали получившуюся взвесь. При этом гранулы биоситалла оставались на дне пробирки, а в экстракт выходили более легкие микрочастицы.

Методы.

Морфологическое состояние клеток регистрировали фотофиксацией в процессе прижизненного наблюдения с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS100, оснащенного фотокамерой.

Жизнеспособность клеток определяли методом МТТ-теста. Метод основан на восстановлении тетразолиевых солей оксидоредуктазными ферментами митохондрий в пурпурные кристаллы формазана. О восстановительной способности митохондрий,

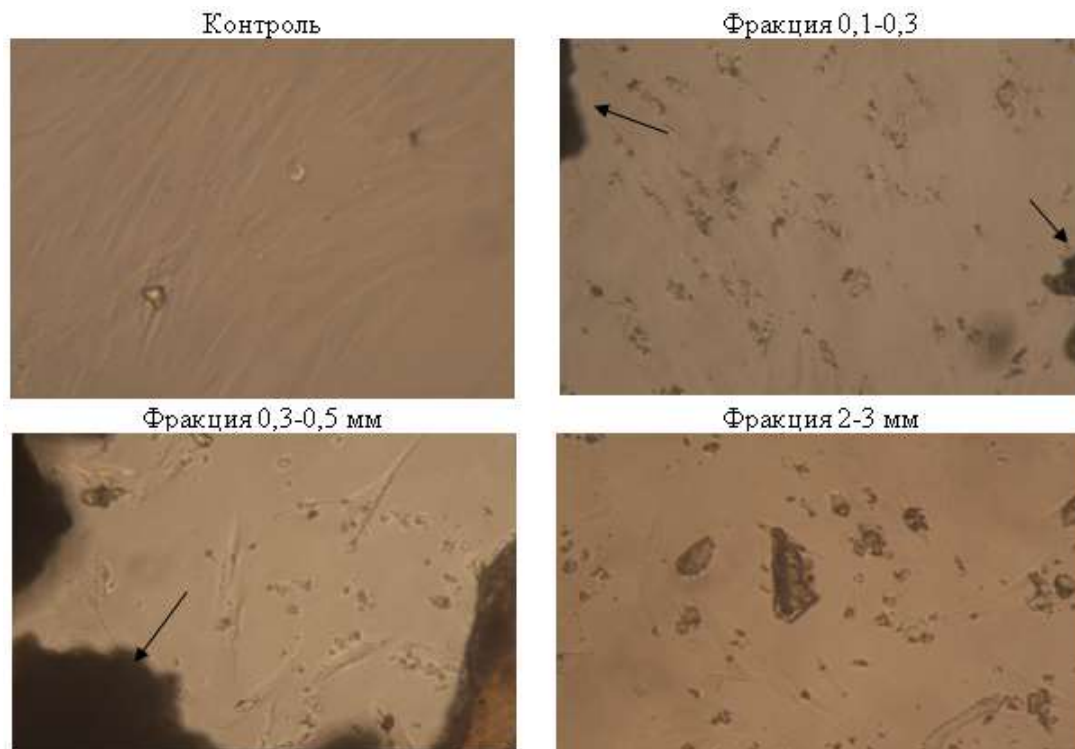


Рис.1. ММСК костного мозга, инкубируемые в течение 3 сут в присутствии гранул «Биосит-Ср Элкор» различных фракций. Прижизненные наблюдения под инвертированным микроскопом (увеличение 200х).

характеризующей жизнеспособность клеток, можно судить, измеряя интенсивность окраски на спектрофотометре.

После инкубации клеток в разных условиях в среду культивирования добавляли стоковый раствор МТТ (5 мг/мл) в количестве 10% от объема содержащейся в лунке среды, инкубировали в течение 4 ч в CO₂-инкубаторе. Затем отбирали среду, а образовавшиеся кристаллы вместе с клетками растворяли в 200 мкл диметилсульфоксида (Биолот, РФ). Оптическую плотность раствора измеряли на иммунохимическом анализаторе Fluorofot "Charity" при длине волны 570 нм (референсная длина 630 нм). Результаты опыта выражали в процентах, которые вычислялись как отношение оптической плотности, отражающей жизнеспособность клеток на исследуемом материале или экстракте, к оптической плотности контроля. Контролем являлись ММСК, инкубированные на стандартном культуральном пластике.

Результаты

1) Культивирование ММСК на гранулах биоситалла. Для исследования жизнеспособности ММСК при росте на остеозамещающем материале «Биосит-Ср Элкор» была проведена 3-суточная инкубация клеток на гранулах разных фракций: 0,1-0,3 мм; 0,3-0,5 мм; 0,5-1,5 мм, 2-3 мм. Для этого ММСК были посажены в лунки 24-луночного планшета с плотностью 5 тыс. клеток/см², в которых было помещено 0,25 г материала (гранулы были равномерно распределены по поверхности лунки). На фото, полученном с помощью световой микроскопии (Рис. 1), можно видеть, что кроме гранул материала (отмечены стрелками), во всех случаях присутствуют более мелкие частицы материала, названные нами «микрочастицы» из-за своего размера (до 20 мкм). Мы предполагаем, что эти микрочастицы были поглощены клетками и находятся в их цитоплазме. При дальнейшем культивировании было обнаружено, что выживаемость клеток, содержащих микрочастицы, значительно снижена.

Жизнеспособность ММСК при инкубации непосредственно с гранулами материала всех изученных фракций была значительно ниже, чем в контроле (росте ММСК на культуральном пластике) (Рис. 2).

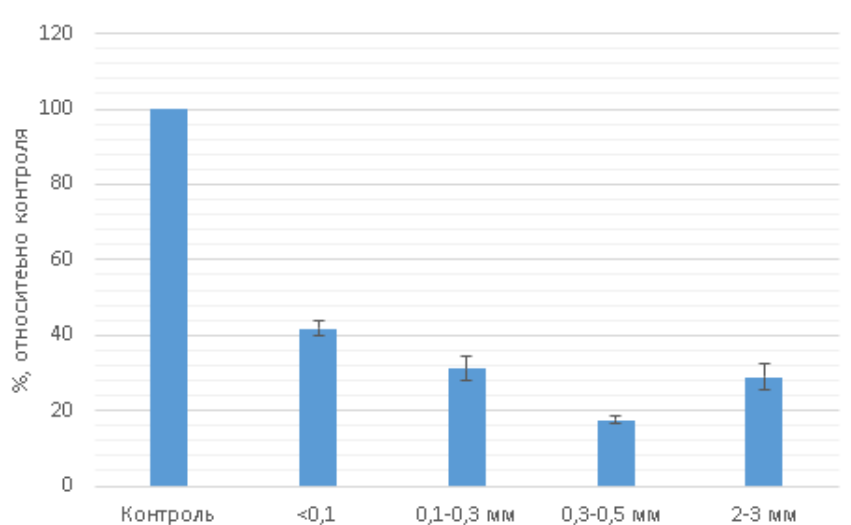


Рис.2. Жизнеспособность ММСК костного мозга, инкубируемых в течение 3 сут в присутствии гранул «Биосит-Ср Элкор» различных фракций, вычисленная по результатам МТТ-теста

При этом жизнеспособность клеток на различных фракциях материала отличалась. Это может быть связано с разным количеством микрочастиц, образующихся во фракциях на этапах производства и эксплуатации материала. Для дальнейших исследований была выбрана фракция 0,1-0,3 мм.

2) Культивирование ММСК в экстрактах биоситалла.

Мы предположили, что низкая жизнеспособность ММСК при инкубации вместе с биоситаллом может быть связана с микрочастицами, которые в большом количестве образуются при выкрашивании материала, поглощаются клетками и негативно влияют на внутриклеточные процессы, вызывая гибель клеток. Для этого были сделаны две

фракции экстрактов (смывы), содержащие разное количество микрочастиц: 1) «верхняя часть» - гранулы материала помещали в αМЕМ, выдерживали 5 мин (время, за которое основное количество гранул оказывалось на дне пробирки), отбирали верхнюю часть экстракта; 2) «взвесь» - емкость с экстрактом встряхивали и отбирали взвесь, содержащую большее количество микрочастиц.

Клетки культивировали в полученных экстрактах в течение 2 сут. Жизнеспособность ММСК оценивали методом МТТ, морфологическую оценку состояния клеток исследовали методом прижизненной световой микроскопии. Проанализировав полученные результаты можно заключить, что

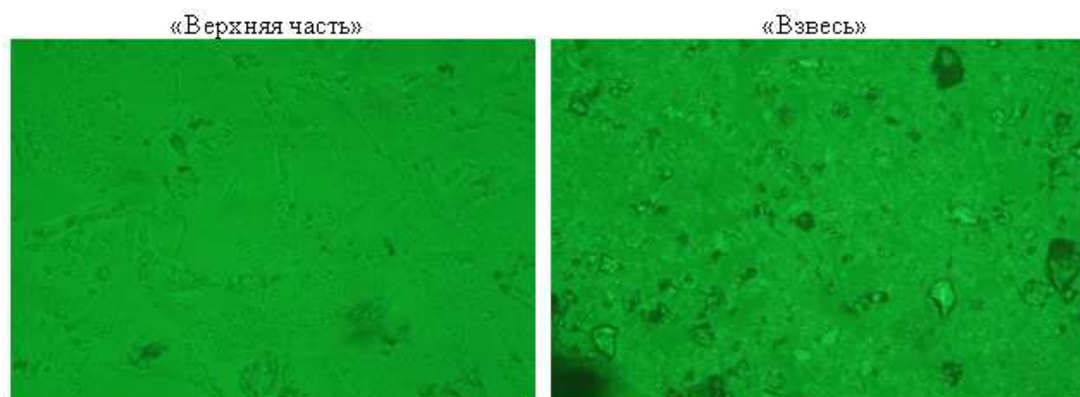


Рис.3 ММСК костного мозга, инкубируемые в течение 2 сут в присутствии экстрактов «Биосит-Ср Элкор», содержащих разное количество микрочастиц. Прижизненные наблюдения под инвертированным микроскопом (увеличение 200х)

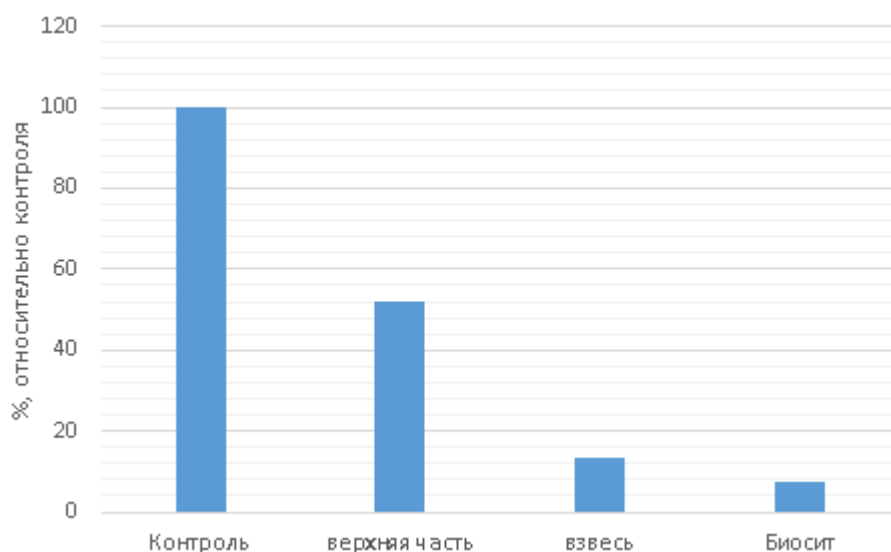


Рис.4. Жизнеспособность ММСК костного мозга, инкубируемых в течение 2 сут в экстрактах «Биосит-Ср Элкор», содержащих разное количество микрочастиц, вычисленная по результатам МТТ-теста

чем большее количество микрочастиц контактирует с клетками, тем меньше их жизнеспособность. Так, оказалось, что морфология клеток, инкубируемых во взвеси с небольшим количеством микрочастиц («верхняя часть») отличалась от контроля наличием включения и вакуолизацией, однако в гораздо меньшей степени, чем при культивировании ММСК во «взвеси» (Рис. 3).

Жизнеспособность клеток, инкубируемых в присутствии взвеси микрочастиц, оказалась практически такая же низкая (13,2%), как и при культивировании ММСК непосредственно на материале (7,5%) (Рис. 4). Жизнеспособность ММСК, инкубируемых в «верхней части» экстракта (отобранной без осадка и содержащей незначительное количество микрочастиц) составляла 52,2% относительно контроля.

Следовательно, для того, чтобы избежать от негативного воздействия микрочастиц, необходимо проводить отмывку материала.

3) Подбор оптимальной схемы обработки материала для культивирования клеток.

Схема обработки материала № 1. Гранулы «Биосит-Ср Элкор» (фракция 0,1-0,3 мм) замачивали в 96%-ном этаноле, выдерживали 2-3 ч, трижды заменяли спирт, промывали раствором ФСБ (фосфатно-солевого буфера) 3 раза, бессывороточной средой α MEM 2 раза, давали отстояться до

оседания частиц материала и отбирали «экстракт 1». Такая схема отмывки материала от частиц (с использованием этанола) была основана на предположении, что микрочастицы - это остаточные продукты выгорающих добавок.

После инкубации ММСК в «экстракте 1» в течение 2 сут можно было наблюдать, что морфология клеток не отличалась от контрольной (Рис. 5, В), а жизнеспособность, определяемая МТТ-тестом составляла 90,1% (по отношению к контролю). (Рис. 6).

Схемы обработки материала № 2.

В ходе исследований было обнаружено, что СЭК, входящая в состав питательной среды, может активно связывать микрочастицы, тем самым оказывать воздействие на отмывку материала. Основываясь на этих наблюдениях, была предложена следующая схема обработки материала: гранулы материала «Биосит-Ср Элкор» (фракция 0,1-0,3 мм) поместили в среду без сыворотки из расчета 0,5 г на 6 мл, встряхнули, оставили на 5 мин в среде α MEM, перенесли в лунку, не забирая осадок. Перед внесением клеток добавили 10 % СЭК (необходимой для культивирования клеток) - «экстракт 2».

Анализ морфологии клеток показал, что ММСК поглотили большое количество микрочастиц, однако форма клеток изменилась незначительно по сравнению с контролем

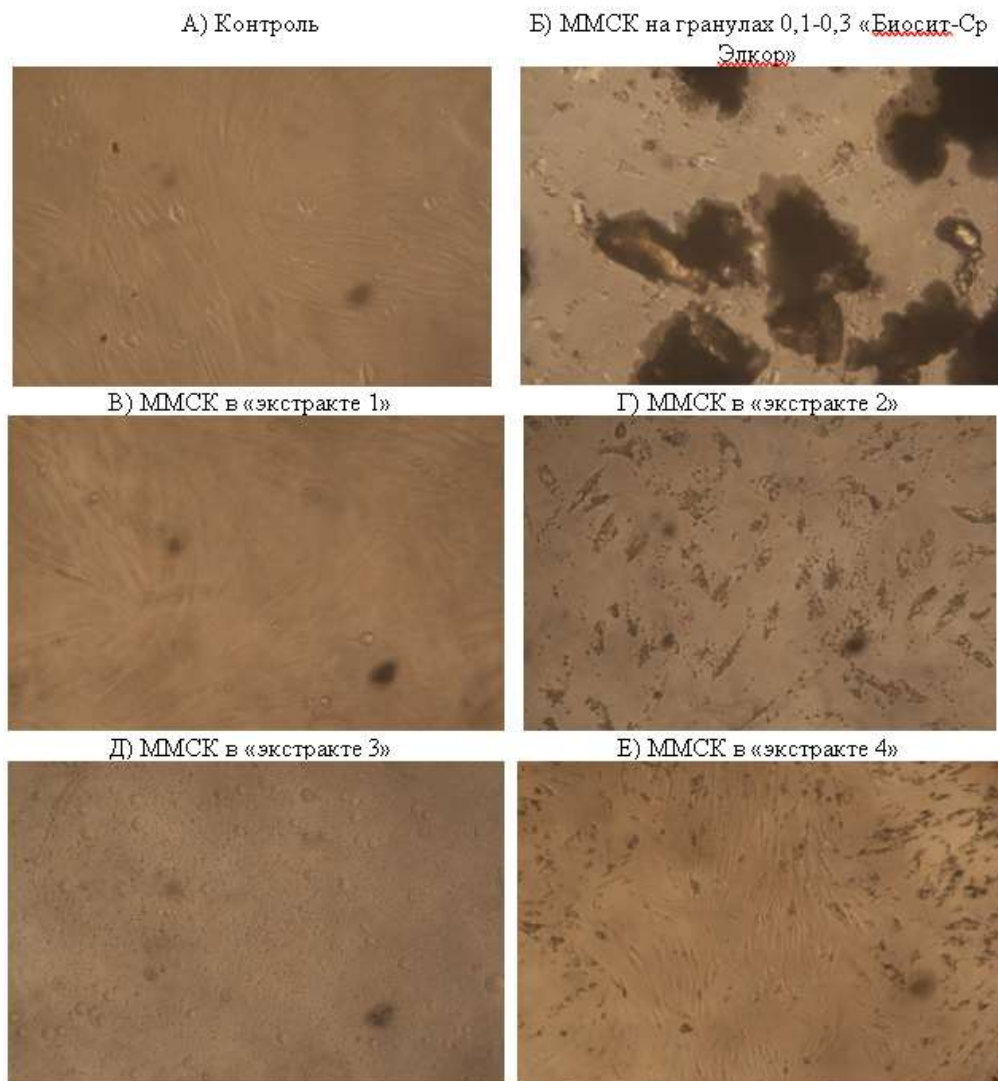


Рис.5 ММСК костного мозга, инкубируемые в течение 2 сут в присутствии экстрактов с разными вариантами отмывки «Биосит-Ср Элкор». Прижизненные наблюдения под инвертированным микроскопом (увеличение 200х)

(Рис.5, Г). Жизнеспособность ММСК относительно контроля составила 69,6% (Рис. 6).

В то же время, когда проводили культивирование клеток в «экстракте 3», приготовленном аналогично «экстракту 2», но на основе среды, содержащей 10% СЭК (и поэтому содержащем большое количество микрочастиц), на снимках дна культуральных сосудов под инвертированным микроскопом практически не обнаружено клеток (Рис. 5, Д). Жизнеспособность клеток была очень низкой – 10,8% относительно контроля (Рис. 6).

Таким образом, можно заключить, что среда с сывороткой захватила большее количество микрочастиц, которые снизили жизнеспособность клеток.

Схема обработки материала № 3.

Опираясь на результаты вышеизложенных опытов, можно заключить, что микрочастицы оказывают негативное влияние на жизнеспособность клеток. Исходя из того, что ММСК при инкубации в «экстракте 1» сохраняли нормальную морфологию (Рис. 5, В) и высокую жизнеспособность (Рис. 6), можно предположить, что микрочастицы не являются токсичными, а механически разрушают клетку, попадая внутрь и препятствуя нормальной работе органелл. Поэтому были исключены этапы отмывки материала с использованием спирта и ФСБ. Для проверки этой гипотезы была предложена следующая схема отмывки: гранулы материала 3 раза промывали бессывороточной α MEM, третья отмывка – экстракт («экстракт 4»).

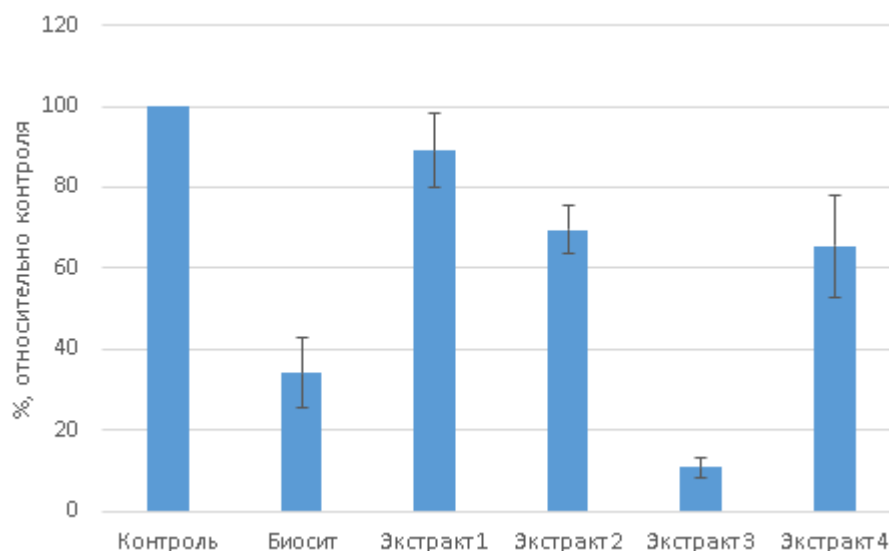


Рис.6. Жизнеспособность ММСК костного мозга, инкубируемых в течение 2 сут в экстрактах с разными вариантами отмывки «Биосит-Ср Элкор», вычисленная по результатам МТТ-теста

Через 2 суток культивирования в полученном экстракте наблюдали, что только небольшое количество микрочастиц было поглощено ММСК (Рис.5, Е). Жизнеспособность клеток при этом составила 65,4% (Рис.6, «экстракт 4»).

При трехкратной отмывке гранул зафиксирована достаточно высокая жизнеспособность клеток, но ниже, чем в контроле. Следовательно, такой схемы отмывки недостаточно для полного удаления микрочастиц. Поэтому была разработана схема более эффективного избавления «Биосит-Ср Элкор» от микрочастиц: 4 раза промыть его полной ростовой средой. Введение еще одного этапа отмывки и наличие СЭК практически полностью удаляло оставшиеся микрочастицы и значительно увеличивало жизнеспособность ММСК костного мозга.

Обсуждение

Было обнаружено, что культивирование ММСК непосредственно на биоситалле приводит к значительному снижению их жизнеспособности (Рис. 2). Однако, было не ясно, с чем это связано - с токсическим воздействием компонентов материала, экстрагирующихся в среду культивирования, или механическим воздействием микрочастиц, выкрашивающихся из гранул материала. В результате ряда отмывок материала «Био-

сит-Ср Элкор» этанолом, ФСБ и бессыворочной средой была обнаружена высокая жизнеспособность клеток при инкубации в «экстракте 1», что свидетельствовало об отсутствии токсических компонентов материала (90,1%, Рис.6). В других экспериментах было отмечено, что при проведении различных этапов отмывки микрочастицы удаляются, при этом и жизнеспособность ММСК костного мозга увеличивается и приближается к контрольным значениям. Таким образом, можно предположить, что на снижение жизнеспособности клеток влияли механические свойства микрочастиц. Для того, чтобы подтвердить эту гипотезу был проведен эксперимент с обогащением экстракта микрочастицами. Возникло предположение, что СЭК может каким-то образом связывать микрочастицы. Основываясь на этом, был приготовлен экстракт, содержащий большое количество микрочастиц («экстракт 3»), жизнеспособность ММСК в котором была очень низкая (10,8%). Можно заключить, что для отмывки материала лучше использовать среду с сывороткой, т.к. она будет забирать большее количество микрочастиц, лучше очищая материал. В результате проведенных исследований была разработана оптимальная схема избавления «Биосит-Ср Элкор» от микроча-

стиц: 4 раза промыть 0,5 г материала фракции 0,1-0,3 мм полной ростовой средой по 2 мл.

В литературе описан положительный опыт по созданию тканеинженерных эквивалентов с использованием ММСК костного мозга кролика и биоситалла для пластики костей черепа [10]. Однако, перед заселением гранул биоситалла клетками материал подвергали обработке: многократно промывали средой без сыворотки и стерилизовали автоклавированием. На очищенные гранулы «Биосит-Ср Элкор» высаживали ММСК, направленные в остеогенную дифференцировку, затем имплантировали в рану. Через 60 сут в результате эксперимента в области краев дефекта наблюдали активный процесс остеогенеза. Через 120 сут бывшая область дефекта была запол-

нена ретикулофиброзной тканью, формирующей костные трабекулы между гранулами материала.

Таким образом, «Биосит-Ср Элкор» может быть перспективным остеозамещающим материалом нового поколения. Однако при использовании его в качестве компонента тканеинженерного эквивалента необходимо нивелировать воздействие микрочастиц, влияющих на клеточную жизнеспособность.

Заключение

В данном исследовании было доказано негативное влияние микрочастиц «Биосит-Ср Элкор» на ММСК костного мозга кролика. Была предложена схема обработки материала, позволяющая избавиться от микрочастиц, негативно влияющих на жизнеспособность клеток.

Список литературы

1. Хайрутдинова Д.Р. История создания и развития биоматериалов. Москва, 2016. С 21-33.
2. Du F, Wu H, Li H, Cai L, Wang Q, Liu X, Xiao R, Yin N, Cao Y. Bone marrow mononuclear cells combined with Beta-Tricalcium Phosphate granules for alveolar cleft repair: a 12-month clinical study. *Sci Rep.* 2017, 7(1):13773. doi: 10.1038/s41598-017-12602-1.
3. Сафронова Т.В., Путляев В.И., Сергеева А.И., Куненков Э.В. Синтез нанокристаллического гидроксиапатита кальция из сахаратов кальция и гидрофосфата аммония. Доклады академии наук, 2009, т. 426 №4. С. 491-496.
4. Елагина И.А., Аносов Н.А., Лысенко Л.Н. Остеозамещающий материал нового поколения для изделий «Биосит-Ср Элкор». Монография. СПб, Lap. Lambert Academic publishing, 2014. С.61.
5. Кораго А.А. Введение в биоминералогию. СПб, Недра, 1992. С. 280
6. Васильев А.В., Котова-Лапоминская Н.В. Применение остеозамещающего материала «Биосит-Ср Элкор» в хирургической стоматологии (пособие для врачей). СПбМАПО, СПб, 2004. С.28.

7. Шкандратов Е.В. Применение стеклокристаллического остеозамещающего материала «Биосит-Ср-Элкор» при операциях эндопротезирования тазобедренного сустава (экспериментально-клиническое исследование). СПб, 2007г. С.8.

8. Каныкин, А.Ю., Шкандратов Е.В., Нетько Г.И. Морфологическая картина при имплантации микрогранул стеклокристаллического материала «Биосит-Ср-Элкор» в эксперименте. *Травматология и ортопедия России.* — 2003. — С.40-44.

9. Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999. Vol. 284. P. 143-147.

10. Деев Р.В., Цупкина Н.В., Николаенко Н.С., Пинаев Г.П. Использование стромальных клеток костного мозга, мобилизованных на гранулах биоситалла, для пластики костей мозгового черепа. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*, т II, №2, 2007.

Поступила в редакцию 20.10.2017

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 14-50-00068 «Стволовые клетки - основа клеточных технологий»

Сведения об авторах:

Касьянова Елизавета Сергеевна – магистрант кафедры медицинской физики ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», старший лаборант-исследователь ФГБУН «Институт цитологии» РАН, Санкт-Петербург, e-mail: k_elisa@bk.ru

Александрова Светлана Алексеевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник ФГБУН «Институт цитологии» РАН, Санкт-Петербург, e-mail: alekssvet2205@gmail.com

Блинова Миральда Ивановна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель группы клеточных биотехнологий ФГБУН «Институт цитологии» РАН, Санкт-Петербург, e-mail: mira.blinova@mail.ru

Сердобинцев Михаил Сергеевич – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник, руководитель направления «Костно-суставная хирургия и ортопедия» ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России, Санкт-Петербург, e-mail: osteolog@mail.ru