

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
институт
Базовая кафедра биотехнологии
кафедра

УТВЕРЖДАЮ
Заведующая кафедрой
_____ Т.Г. Волова
Подпись, инициалы фамилия
« _____ » ____ июня 2021г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

Изучение биоразрушаемых биоматериалов для целей тканевой инженерии костной ткани

Тема

06.04.01 Биология

Е.И. Шишацкая

Выпускник

А.В. Мякишева

Красноярск 2021

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. Обзор литературы	7
1.1 Актуальность и проблематика	7
1.2 Анатомия кости и ее физиологические особенности	9
1.3 Трансплантаты для восполнения костного объема	13
1.3.1 Аллотрансплантаты	14
1.3.2 Аутотрансплантаты	14
1.3.3 Ксенотрасплантаты	15
1.4 Тканевая инженерия как перспективный метод регенерации костной ткани	
17	
1.5 Материалы, используемые в тканевой инженерии кости	21
1.5.1 Синтетические материалы из металлов	22
1.5.2 Синтетические материалы из керамики	24
1.5.3 Синтетические полимеры природного происхождения	26
Глава 2. Материалы и методы	32
2.1 Биополимерные образцы	32
2.1.1 Биосинтез ПГА	32
2.1.2 Получение биополимерных пленочных образцов	33
2.2 Исследование свойств поверхности пленочных образцов	34
2.3 Исследование механических свойств пленочных образцов	35
2.3 Оценка биосовместимости полученных плёночных матриксов	36
2.5 Окрашивание клеток флуоресцентным красителем DAPI	38
2.6 Статистическая обработка данных	38
Глава 3. Результаты и обсуждения	39

3.1 Синтез ПГА	39
3.2 Полученные матрицы из ПГА	41
3.3 Исследование поверхностных свойств	42
3.4 Физико-механические свойства полимеров	44
3.5 Биосовместимость пленочных образцов	45
Выводы	48
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	49
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	50

ВВЕДЕНИЕ

Лечение заболеваний опорно-двигательного аппарата остаётся сложной задачей на сегодняшний день. Известно, что только в России за один год травмы скелета получают более 6 миллионов человек [1], при этом каждому необходим индивидуальный план лечения. При простых переломах используют технику наложения гипсовых повязок и лангет, однако при более серьезных травмах такое лечение становится малоэффективным, что требует использования современных техник восстановления костного объема в качестве альтернативы устаревшим методам.

Всё более распространенными становятся ситуации, когда повреждение кости несет за собой утрату её участка, в этом случае на месте отсутствующего участка должна быть полностью восстановлена структура ткани с сохранением ее морфофункциональных свойств.

Перспективным способом лечения таких повреждений является тканевая инженерия – научная отрасль, которая занимается созданием элементов для живого организма с целью восполнения тканевого дефекта. Она включает в себя принципы инженерии, биологии и медицины, что дает ей возможность для стремительного развития в современном мире [2]. Именно тканевая инженерия позволяет создавать анатомо-индивидуальный каркас, который будет подходить человеку независимо от его биологических особенностей.

Её принципиальная схема заключается в том, что клетки человека сначала культивируют, а затем наращивают на специальных носителях – скаффолдах, которые обладают специальными условиями для клеточной адгезии и дальнейшей пролиферации. В роли скаффолов могут выступать изделия, состоящие из металла, биокерамики, а также природных или синтетических биополимеров. Для обеспечения высокого регенеративного потенциала таких материалов к ним предъявляется ряд требований, которым они должны соответствовать:

- обеспечение биосовместимости и биоинтеграции;

- перенятие на себя опорной функции ткани;
- полное восполнение дефекта ткани;
- стимулирование нормального роста и дифференцировки клеток.

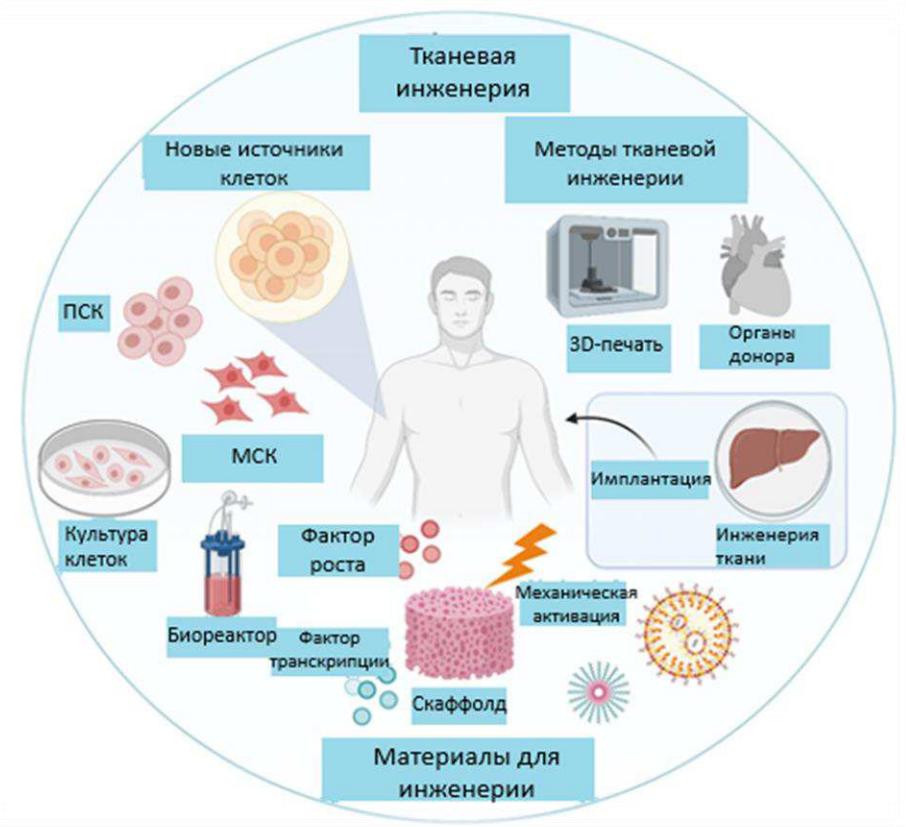


Рисунок 1 – Принципиальная схема тканевой инженерии

В настоящее время в целях тканевой инженерии исследовано большое количество материалов-претендентов для изготовления биосовместимых скаффолов, однако идеального носителя ещё не найдено, в связи с чем растет востребованность в разработке новых и модификации уже известных материалов, которые будут отвечать всем требуемым свойствам. В последние годы преимущество отдается исследованиям в области биоразрушаемых биополимеров – к ним относятся полилактиды, полигликолиды, полигидроксиалканоаты (ПГА) и др. Важными их особенностями являются биодеградация и возможность модификации поверхности, что даёт

предпосылки к созданию максимально приближенных анатомо-индивидуальных каркасов для восполнения утраченного объема ткани.

Однако среди всех биопластиков можно выделить класс полигидроксиалканоатов как сочетающий в себе полную биосовместимость и биодеградацию, а также возможность получения сополимеров, характеризующихся различными физико-химическими и механическими свойствами.

Цель работы – конструирование пленочных матриков из полигидроксиалканоатов и их исследование в качестве модельной системы скаффолда для адгезионных культур в целях репаративного тканегенеза костной ткани.

В соответствии с целью исследования были поставлены следующие задачи:

1. изготавливать плёночные матрицы из поли-3-гидроксибутират и его сополимера с валератом (30 мол. %);
2. освоить методики ведения модельной клеточной культуры;
3. оценить физико-механические характеристики изготовленных образцов;
4. исследовать биосовместимость полученных образцов *in vitro* в модельной адгезионной культуре.

Работа была выполнена на базе Лаборатории биотехнологии новых биоматериалов Сибирского федерального университета.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Актуальность и проблематика

Переломы костей и инфекции костной ткани – одни из самых распространенных проблем в современной медицине, в частности травматологии и ортопедии. Нарушения и болезни опорно-двигательного аппарата традиционно занимают ведущее место среди факторов инвалидности, они находятся на третьем месте в структуре общей заболеваемости по всему миру, а в России среди детей занимают 4 место, также стремительно растет общий травматизм среди подростков и пожилых людей [2].

Переломы подразделяются на открытые и закрытые, при этом открытые переломы являются наиболее опасными, так как чаще всего сопровождаются большой кровопотерей и нарушением функционирования внутренних органов. Летальность при таких повреждениях достигает 40 % и выше. В случае закрытых переломов возможны неправильные срастания с образованием смещений, что в последствии может привести к повторным переломам кости. Инфекция, в свою очередь, возникают как сопутствующее осложнение при переломах, чаще всего открытых, а также как самостоятельное заболевание. Самыми распространенными инфекциями костных тканей являются: остеомиелит – гнойно-некротическое заболевание костной ткани, вызываемое бактериями, артрит – сильное воспаление суставов, а также остеопороз – хронический процесс, приводящий к уменьшению плотности костной ткани и ведущий к обрззованию пор. По статистике в России инфекциями костных тканей страдают каждая третья женщина и каждый пятый мужчина после 50 лет [1].

В случае нарушения функционирования элементов костного скелета существует необходимость в их полном восстановлении. Распространённой и общепринятой на данный момент технологией, направленной на

восстановление повреждений костной ткани является техника с использованием внешних фиксаторов из металлов, по типу аппарата Илизарова, и различные другие металлические имплантаты – шурупы, винты, спицы, булавки.

В этом случае главной проблемой являются последствия после установки таких имплантатов, так как из-за проблемы биосовместимости материала и ткани кости возникает большинство осложнений. В число таких осложнений входят ранняя и поздняя остеодистрофии, имплантат-ассоциированный остеомиелит, секвестрирование и свищеобразование после операционных вмешательств [2].

При больших объемных дефицитах костной ткани (критический размер дефекта для ткани кости составляет $0,06 \text{ дм}^3$) сохраняется потребность в материалах, пригодных для их полного и желательно анатомо-специфического заполнения [3].

С развитием биомедицины в последние годы происходит постепенный переход на неметаллические имплантаты различных составов, в том числе из полимеров [4]. Имплантаты полимерного состава обладают рядом свойств, благоприятно влияющих на восполнение утраченного объема кости. Главной их особенностью является то, что существует возможность создания максимально анатомо-индивидуального каркаса с минимальными рисками отторжения.

Таким образом, одним из ведущих направлений в тканевой инженерии для восстановления дефекта кости является создание биосовместимых материалов, способных встраиваться в дефект и не оказывать цитотоксического и какого-либо другого отрицательного воздействия на ткань и организм в целом. В идеальном случае имплантат должен служить матрицей для саморегенерации, поэтому материал, из которого он изготовлен, должен сочетать в себе требуемые физико-механические свойства, биосовместимость и способность к биодеградации [5].

1.2 Анатомия кости и ее физиологические особенности

В онтогенезе все органы аппарата движения формируются из среднего зародышевого зачатка – мезенхимы. Склеротомная мезенхима дает начало популяциям плюрипотентных клеток скелетогенной мезенхимы – единой родоначальнице основных клеточных дифферонов как хрящевой, так и костной тканей.

В эмбриональном развитии первым зачатком осевого скелета является спинная струна – хорда, происходящая из мезодермы. Скелет человек в процессе своего развития проходит три стадии: соединительнотканную (скелет состоит из хорды и соединительной ткани), хрящевую (скелет состоит из хорды и хрящей) и костную (скелет представлен остатками хорды и непосредственно костным скелетом). Эти стадии не распространяются на кости свода черепа, лица и ключицы, которые являются покровными. Кости черепа развиваются из склеротомов головных сомитов, а лицевые начинают свое развитие из висцеральных дуг – производных мезодермы.

У ребенка имеется почти 270 костей, это больше, чем у взрослого человека. Такая разница из-за того, что детский скелет состоит из большого количества маленьких косточек, которые затем срастаются в крупные в процессе взросления. Это такие кости, как череп, таз и позвоночник, после чего остается уже около 206 костей.

Опорно-двигательный аппарат человека и высших животных состоит из костей, суставов, связок, сухожилий и мышц, и представлен различными типами соединительных тканей – волокнистый и гиалиновый хрящ, пластинчатая и рыхлая кость и др. По общепринятой классификации организм взрослого человека имеет 206 костей (85 парных и 36 непарных). У ребенка же имеется почти 270 костей, это объясняется тем, что детский скелет состоит из

большого количества маленьких косточек, которые затем срастаются в крупные в процессе взросления – череп, таз и позвоночник.

Кости делятся на несколько видов в зависимости от их анатомии:

- трубчатые – длинные (плечевая, бедренная, кости предплечья и голени), короткие (кости пясти, плюсны и фаланги);
- губчатые – длинные (ребра, грудина), короткие (позвонки, кости запястья и предплюсны), сесамовидные (коленная чашечка, гороховидная);
- плоские – кости черепа (лобная и теменная,), кости поясов (лопатка, тазовые кости);
- смешанные – кости основания черепа (височные, клиновидные), позвонки [6].

Основу любой кости как органа составляет костная ткань, состоящая из клеточных элементов, волокнистой структуры и межклеточных аморфных веществ с минеральными солями, при этом любая кость хорошо васкуляризована и имеет иннервацию. Кость состоит на 50% из воды, 15,5% составляет жир, 12,5 % – органические (коллаген, протеогликаны) и 22% – неорганические вещества (соли фосфора, кальция, гидроксиапатит) [7].

Снаружи кость покрыта надкостницей. Она выполняет защитную и костеобразующую функции. Надкостница имеет двухслойное строение (поверхностный и внутренний слои), она проникает в поверхностные слои костного вещества. Наружный слой надкостницы является глубоковолокнистым за счет наличия в нем кровеносных сосудов и нервных окончаний. Внутренний слой тонкий, остеогенный, его клетки превращаются в остеобlastы – молодые костные клетки. Благодаря костеобразующим функциям надкостницы кость может нарастать в толщину [8].

Существует предел физиологической компенсации регенераторного потенциала надкостницы. В частности, при возникновении переломов со смещением и плохом сопоставлении костных отломков необходимо

вмешательство врача для восстановления целостности костного органа. Другими словами, надкостница выполняет функцию восстановления матричного вещества кости при плотном контакте с подлежащими структурами. При многооскольчатых переломах и травмах с потерей объема кости необходимо использовать дополнительные средства для восполнения утраченного объема.

Под надкостницей располагается собственно костная ткань, представленная в основном продуктами жизнедеятельности костеобразующих клеток – остеобластов, которые большей частью концентрируются в надкостнице, эндoste – оболочке, покрывающей кость со стороны костномозговой полости, и области метафизарного хряща.

Основу кости составляют коллагеновые волокна, окруженные частицами гидроксиапатита, которые уложены пластинками. Эти пластиинки в костном веществе располагаются слоями вокруг длинных Гаверсовых каналов. Гаверсов канал вместе с костными пластинками является единицей компактного вещества – остеона. Параллельно пластинкам располагаются маленькие пустоты – костные тельца, где находятся костные клетки, дающие отростки в канальцы.

В костях структурной единицей является именно остеон, между которым располагаются вставочные пластинки. Они вместе с остеонами заполняют пространство между слоями. Внутренние и наружные слои, окружающие пластинки по направлению к концевым участкам тела кости, расходятся друг от друга и образуют костные перекладины, получается трабекулярное губчатое вещество.

Длинные кости имеют вытянутую среднюю часть – диафиз из компактного вещества, на каждом конце, в свою очередь, находится эпифиз с красным костным мозгом внутри. Между эпифизом и диафизом находится метафиз, в период роста кости в этом месте находится хрящ, который постепенно окостеневает. Плоские и короткие кости состоят из тонкого слоя

губчатого вещества и покрыты снаружи компактным веществом. В смешанных костях сочетаются элементы коротких и плоских видов костей.

В структуре костной ткани выделяют три основных типа клеток:

- остеобласти – клетки, из которых строится костная ткань, синтезирующие матрикс. По мере его накопления остеобласти переходят в остеоциты, которые уже не способны к синтезу межклеточного вещества. Активные остеобласти в норме покрывают от 2% до 8% всей поверхности кости, также они синтезируют и секрецируют вещества, входящие в состав органического матрикса костной ткани. Неактивные остеобласти покрывают до 95% поверхности кости и играют роль в инициации перестройки костной ткани.
- остеоциты – являются самыми многочисленными клетками костной ткани. Они образуются из остеобластов, когда те уже окружены матриксом. Остеоциты утрачивают способность к делению, вследствие чего резко падает интенсивность синтетических процессов.
- остеокlastы представляют собой многоядерные гигантские клетки (симпласты), образующиеся в результате слияния моноцитов, обладающие подвижностью. Их главная функция – удаление костной ткани с помощью растворения минеральной основы и коллагена. Известно, что костная ткань может полностью восстанавливаться после не слишком серьёзных повреждений. В норме постоянно происходит восстановление (регенерация) и разрушение (резорбция) кости. Разрушение структуры старого и восстановление нового костного вещества приводят к построению структуры, которая необходима для выполнения механической нагрузки.

Регенерация костной ткани происходит путём пролиферации клеток камбимального слоя надкостницы, эндоста, малодифференцированных клеток костного мозга и мезенхимальных клеток. Восстановление происходит в 4 основные стадии:

- катаболизм тканевых структур остеокластами, пролиферация клеточных элементов;
- образование и дифференцировка новых тканевых структур;
- образование ангиогенной костной структуры (восстановление сосудистой сети формирующегося костного регенерата, а также минерализация его белковой основы);
- полное восстановление анатомо-физиологического строения кости [7].

1.3 Трансплантаты для восполнения костного объема

Существуют различные материалы для использования в качестве заменителя кости. Одним из типов таких материалов являются трансплантаты – нативные участки ткани или органы целиком, извлечённые из организма. Вживление костных трансплантатов возможно с одновременным использованием известного в ортопедии аппарата Г.А. Илизарова. Данная методика позволяет крепко фиксировать трансплантат, что приводит к лучшему и более быстрому остеосинтезу костной ткани [9]. Однако в целом использование такой конструкции неблагоприятно влияет в первую очередь на прилежащие мягкие ткани, а именно дерму и подкожную клетчатку из-за постоянного прямого контактирования с ними. Частыми осложнениями являются стойкие воспалительные реакции при попадании сопутствующих инфекций в организм. Возможно также развитие инфекций более глубоких тканей, включая саму кость, что выражается в остеомиелите и сепсисе, что в совокупности приводит к неудаче вмешательства [10].

Всего существует три основных вида трансплантатов: аутотрансплантаты (кость берется у самого человека), аллотрансплантаты (основой служат кости другого человека) и ксенотрансплантаты (кость берется у представителя другого вида) [11].

1.3.1 Аллотрансплантаты

Аллотрансплантаты бывают нескольких разновидностей: свежие, замороженные и лиофилизированные. Они имеют широкое распространение в ортопедии, но главная проблема их использования – это риск переноса инфекций от донора к реципиенту, так как кость, которая будет трансплантирована на место отсутствующей, получают в основном от трупного материала. Преимуществом таких трансплантов является то, что они имеются в неограниченном количестве, и нет необходимости длительного ожидания для пересадки [12].

Известно, что аллотрансплантаты, которые были пересажены приматам от других представителей этого же вида, показывали низкую степень отторжения. Однако в нескольких исследованиях на добровольцах было продемонстрировано, что у пациентов до 25 лет значительно более высокий процент отторжения именно аллотрансплантата, вследствие развития иммунной реакции. Ввиду этого должны разрабатываться современные методики обработки материала перед его применением с соблюдением ряда правил и рекомендаций [13].

Таким образом, правильно подготовленные и проверенные аллотрансплантаты могут обеспечить замену собственной кости человека. Однако сложность методики их получения и этические моменты использования этой технологии существенно ограничивают их применение [14].

1.3.2 Аутотрансплантаты

Использование аутотрасплантатов является золотым стандартом в лечении дефектов кости. Анатомия и физиология кости, с постепенной перестройкой губчатой кости в пластинчатую, позволяют эффективно

использовать аутотрансплантаты с присутствующими собственными мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) и остеобластами [12]. МСК активно включаются в процессы пролиферации и дифференцировки после пересадки, что снижает риск отторжения при соблюдении условий плотного контакта трансплантируемого фрагмента кости [15]. Это, в свою очередь, позволяет с большей эффективностью восстановить дефект костной ткани.

Аутологичная костная ткань является подходящим материалом для восполнения отсутствующего объема кости. Она является остеокондуктивной, остеоиндуктивной и содержит остеогенные клетки реципиента. Однако весомый недостаток в том, что аутотрансплантат всегда присутствует в ограниченном количестве, что приводит к невозможности его использования для замены больших дефектов объема кости [14].

В эксперименте добровольцам было пересажено два вида трансплантата – ауто- и аллотрансплантат, после чего фиксировали процессы регенерации. Результаты показали, что именно аутотрансплантат демонстрирует лучшие показатели приживления, а также увеличивается срок эксплуатации и долговечности конструкции [16].

Однако с возрастом повышается ломкость кости, вследствие накопления в них неорганических солей: у мужчин это происходит после 50 лет, у женщин в период постменопаузы. Помимо ломкости, с возрастом возникает вероятность развития заболеваний костной ткани, типа остеопороза, при этом также большое значение имеет генетическая предрасположенность человека. Вследствие приведенных нарушений нормального свойства костной ткани использование аутотрансплантатов становится невозможным [14], [16].

1.3.3 Ксенотрансплантаты

Ксенотрансплататы получают из организма другого биологического вида, например, для пересадки человеку используют материалы от крупного рогатого

скота, также близким сродством к кости человека обладают биоматериалы свиней. Главное преимущество ксенотрансплантата – это обилие доноров-животных, что делает их более доступными и дешевыми для широкого применения [17].

Однако, имплантаты такого типа могут вызвать иммунное отторжение и воспалительные реакции вследствие своего инородного происхождения. Это связано с тем, что в организме существует главный комплекс гистосовместимости (ГКГ) – это комплекс антигенов, состоящих из поверхностных белков, необходимых для иммунной системы человека. У людей ГКГ представлен человеческими лейкоцитарными антигенами (ЧЛА), которые находятся на поверхности самих клеток [18]. Именно эти антигены представляют из себя большую проблему после пересадки ткани инородного происхождения в другой организм. Влияние ЧЛА реципиента на донорскую кость может существенно затормозить заживление трансплантата, а в худшем случае – привести к его отторжению. Отторжение любого трансплантата – результат совместного взаимодействия врожденной и адаптивной иммунных систем, поэтому ксенотрансплантаты требуют более сложной и тщательной обработки, которая, в свою очередь, приводит к снижению остеогенных свойств [19].

В одном из исследований на группе добровольцев были проведены сравнения при проведении алло- и ксенотрасplantации. В ходе эксперимента статистически достоверно было показано отсутствие существенной разницы между этими двумя видами трансплантации, причем в обоих случаях наблюдалась большая потеря собственной костной массы [20].

Таким образом, необходимо тщательно оценивать биобезопасность ксеногенной кости, акцентируя внимание на оценивание иммунотоксичности (воспаление, гиперчувствительность) и управление рисками их возникновения. Иначе иммунный ответ между антигеном ксенокости и антителом человека может привести к полному отторжению имплантата и неудачной пересадке. А

также не стоит исключать ряд технических и этических ограничений для использования их в клинике, что служит предметом продолжающихся исследований [21].

1.4 Тканевая инженерия как перспективный метод регенерации костной ткани

Ввиду большинства ограничений, накладываемых на применение трансплантатов, существует необходимость в разработке новых технологий для восполнения дефектов кости [10]. Перспективным подходом в этом направлении является тканевая инженерия, заключающаяся в разработке миметиков естественных структур, которые должны перенимать на себя функции замененного костного органа после их установки в организм. Искусственно полученные структуры для замещения дефектов разной этиологии называются имплантатами. Имплантаты могут быть сконструированы разными методами и с использованием различных материалов в своей основе – металлов, керамики, пластмасс и др. В настоящее время ведутся многочисленные исследования в сторону синтетических биополимеров для применения их в ортопедии и травматологии с целью восполнения костного объема [22].

Как уже говорилось ранее, главная задача тканевой инженерии – это создание новых, искусственных конструкций, способных к взаимодействию с биологическими структурами организма реципиента. Они должны, заполняя дефект, запускать процессы дифференцировки костной ткани в верном направлении, одновременно выполняя возложенную на них опорную функцию. Необходимо, чтобы в полученной конструкции был соблюден ряд требований, таких как:

- биосовместимость – используемый материал должен подходить по химическому составу (устойчивость к коррозии или полная инертность к окружающей среде);

- остеогенность – реконструированная ткань должна подходить для формирования новой кости, это одно из важнейших требований для использования материала в тканевой инженерии кости.
- остеокондуктивность – возможность для формирования капилляров и прорастания клеточных элементов;
- остеоиндуктивность – способность материала стимулировать недифференцированные клетки (МСК) к остеобластной дифференцировке;
- остеоинтеграция – материал должен постепенно интегрироваться и сливаться с уже имеющейсяостью после пересадки [23].

С помощью методов тканевой инженерии возможно создавать имплантаты с контролируемой скоростью разложения, заданной архитектурой поверхности и внутренних структур, требуемыми механическими свойствами, которые впоследствии можно будет использовать в травматологии и ортопедии. Также использование методов тканевой инженерии применимо для лечения первичных и вторичных злокачественных новообразований костной ткани с формированием тканевого дефицита после их удаления [24].

Основу имплантата составляет скафболд или матрикс – временная механическая конструкция, восполняющая костный дефект тканей, которая является основой для адгезии и пролиферации живых клеток, например, соединительнотканых [25]. Такая конструкция должна обладать определенными характеристиками – иметь подходящий химический состав, шероховатость поверхности, внутреннюю архитектуру, пористость и биосовместность, а также механическую прочность, сопоставляемую с поврежденной костью [26]. Материал для конструкции должен быть биоразлагаемым, чтобы минимизировать количество остаточных продуктов на месте регенерации кости и снизить цитотокическое воздействие на прилежащие клетки. Шероховатость материала и его внутренняя геометрия – главные параметры, определяющие успешный рост и адгезию новых остеоклеток. Пористость, в свою очередь, влияет непосредственно на скорость

прикрепления, биодеградацию и высвобождение инкапсулированного лекарства для предотвращения сопутствующего заражения. Таким образом, чем выше пористость материала, тем лучше адгезируются клетки и тем интенсивнее происходит их пролиферация [27]. Существуют поры разного размера, например, поры небольшого размера (< 75 мкм) подходят для волокнистых тканей, средние (75-100 мкм) или крупные поры (> 200 мкм) подходят для неминерализованной ткани или полностью минерализованной кости. В целом для формирования нормальной костной ткани на месте имплантата желателен средний размер пор в 50-100 мкм. Необходимо также учитывать такой параметр как промежуточное расстояние между порами – это каналы, которые соединяют их и служат местом транспортировки веществ. У каналов также должен быть определенный заданный размер, который варьируется в пределах 15-50 мкм [28].

Внедрение имплантатов в организм человека предполагает ревитализацию подготовленных матриков-носителей перед имплантацией культивированием на них клеток. Введение клеток реципиента в скаффолд снижает имmunогенность и повышает биосовместимость будущего имплантата [29]. Клетки, закрепляясь на поверхности, начинают расти в заданном направлении, заполняют собой пространство дефекта и восполняют костный объем. Для лучшего приживления имплантата и снижения вероятности его отторжения используются МСК реципиента – это один из перспективных способов имплантации [30].

Благодаря использованию тканеинженерных методов можно создать максимально индивидуальные имплантаты вне зависимости от анатомии человека с минимальными рисками на костный орган. На сегодняшний день внимание уделяется созданию более персонифицированных конструкций, именно поэтому тканевая инженерия является передовой технологией для целей заполнения костного объема.

Существует большое количество технологий получения скаффолов с заданными свойствами: электротиннинг (под действием электричества происходит вытягивание волокон нужного размера из сплава и после получение скаффолда), метод лиофилизации (на полимерный раствор воздействуют низкой температурой, после чего происходит удаление растворителя с помощью вакуума), газовое вспенивание (полимер насыщают газом под высоким давлением, затем приводят его к вспениванию снижением давления, таким образом, получается пористая структура), метод быстрого прототипирования, который представляет собой получение трехмерного объекта любой формы [31]. К нему относятся лазерная стериолитография (для получения скаффолда необходим жидкий фотополимер, который затвердевает под действием лазерного излучения), селективное лазерное спекание (для получения скаффолда необходим порошковый термопластичный материал, который может плавиться под воздействием на него инфракрасного лазерного излучения), 3D-печать (метод заключается в послойном нанесении расплавленной струи полимера) и пр. [32].

Также полученную конструкцию можно нагружать лекарствами и факторами роста с остеокондуктивными свойствами, это будет способствовать более быстрому образованию новой костной ткани, а также обеспечивать защиту и скорость заживления при постепенной замене имплантата на новообразующуюся кость [33].

В качестве материалов в тканевой инженерии применяют как органические, так и неорганические вещества. На сегодняшний день в качестве материала для тканевой инженерии преимущественно используются биосинтетические биополимеры на основе молочной и гликоливой кислот, гидроксиапатита, хитозана, в том числе их композиты. Также перспективными считаются материалы из полигидроксиалканоатов (ПГА), благодаря широте биомеханических характеристик сополимерных образцов, контролю уровня полимеризации и высокой биосовместимости [34]

Можно сделать общий вывод, что приведенные свойства материала и готового имплантата напрямую влияют на скорость и качество заживления костной ткани. Необходимо учитывать индивидуальные особенности реципиента, уделять особое внимание материалу для имплантата, который должен сочетать в себе все функции для восполнения дефекта кости [35].

1.5 Материалы, используемые в тканевой инженерии кости

Как материал для имплантата могут использоваться синтетические материалы. Подходящий для замены костного органа синтетический материал должен обладать биосовместностью, демонстрировать минимальное фиброзное действие, также должен быть прост в тканеинженерном использовании и быть способным хорошо поддерживать форму кости и восполнять собой дефект ткани [36].

Искусственные имплантаты востребованы среди людей разных возрастных групп, имеющих приобретенные или врождённые заболевания костной ткани, переломы и другие дефекты. Они необходимы для восполнения костного объема, который был утрачен вследствие нарушения функционирования костного органа [22].

Для восполнения дефекта костной ткани применяются материалы трех групп, которые отличаются по своему составу: металлические (сплавы Ni/Ti и MgF), керамические (гидроксиапатит, стеклокерамика и пр.) и полимерные (полигидроксиалканоаты, лактиды, гликолиды, коллаген, хитозан и пр.).

Каждый из материалов обладает специфическим для него набором физико-химических свойств, который определяет широту его использования в тканевой инженерии. Таким образом, материалы из керамики обладают хорошей прочностью на сжатие, гидроксиапатит в своем использовании не

допускает фиброзного врастания, обладает хорошим модулем упругости. Металлическая основа в имплантате более прочная, чем сама кость, это может вызвать повторные переломы костного органа с более серьезными последствиями для человека. Полимерные материалы обладают хорошей биоактивностью и микроструктурой, что благоприятно влияет на организм и снижает риски отторжения имплантата [37].

1.5.1 Синтетические материалы из металлов

Для восстановления костной ткани используются такие металлы как алюминий, кальций, хром, кобальт, медь, железо, литий, магний и др. Рассмотрим некоторые из них более подробно:

- алюминий – является биоинертным, не формирует поверхность раздела фаз между самой костью и материалом, придает механическую прочность если не используется пористая структура. Однако у алюминия есть недостаток – этот металл никак не влияет на регенерацию кости, а его избыток может вызывать негативное воздействие на окружающую среду [38]. Также рассматриваемый металл не входит в состав микроэлементов, что, напротив, может негативно влиять на организм человека [39];
- хром – один из биогенных элементов, постоянно входит в состав тканей растений и животных. В реконструкции костей чаще всего используют его сплав с кобальтом. Хром своим присутствием может изменять экспрессию остеогенных участков гена, влияя тем самым на минерализацию кости в лучшую сторону [40]. Хром VI и III ингибируют активность коллагеназы, что способствует более быстрому восстановлению костной массы за счет своего влияние на рост и регенерацию тканей. Наличие металла в имплантате

увеличивает пролиферацию и инфильтрацию остеобластов, что, в свою очередь, увеличивает синтез коллагена во внеклеточном матриксе [41];

- кальций – распространённый макроэлемент в организме растений, животных и человека. Важной характеристикой кальция является то, что он является компонентом биоразлагаемого кальций фосфата, на основе которого создаются биоматериалы для заполнения костного дефекта. Известно, что использование внеклеточного кальция приводит к улучшенной дифференцировке остеобластов и МСК, именно поэтому ионы кальция применяются в качестве основного компонента в реконструкции костей [42];
- магний – один из важных биогенных элементов, в значительных количествах содержится в тканях животных и растений. Этот металл играет важную роль для костей организма так, как он поддерживает их прочность и способствует нарастанию новых клеток. Приведенные особенности допускают использования магния для целей тканевой инженерии костной ткани, поэтому его можно вводить в состав имплантатов благодаря его положительному взаимодействию с компонентами костей [43]. Однако при наличии избытка магния в организме, снижается внутриклеточная концентрация ионов кальция, таким образом, кальций начинает вымываться из костей. Поэтому следует с осторожностью подходить к имплантации конструкций с высокой концентрацией магния, чтобы не снижать содержание кальция в организме человека [44].

Преимущественно для восстановления костного объема используются материалы из сплавов металлов совместно с кальций фосфатом, поэтому металлическая конструкция, покрытая кальций фосфатом, может выступать в качестве матрикса для нарастания новых костных клеток [42]. Ионы металлов благоприятно влияют на восстановление кости и нарастания клеточной массы, так как являются компонентами состава костной ткани, кальций фосфат, в свою очередь, формирует костный матрикс, который активирует процессы пролиферации клеток и их дифференцировки. Недостатком является то, что

металлы в чистом виде могут оказывать цитотоксическое влияние на прилежащие клетки. Жесткий металлический каркас при повторном повреждении может вызвать множественные переломы соседних костей, это приводит к повторному хирургическому вмешательству в организм человека и как следствие – осложнениям [45].

1.5.2 Синтетические материалы из керамики

На сегодняшний день существует возможность применения керамики нескольких видов: биоинертной (оксид алюминия, диоксид циркония), рассасывающейся (трикальцийфосфат), биоактивной (гидроксиапатит, стеклокерамика и биоактивное стекло) и пористой (металлы, покрытые гидроксиапатитом) [46].

Биокерамика является подходящим материалом для восстановления утраченного объема костной ткани, так как из неё возможно сконструировать индивидуальные для каждого человека каркасы с подходящими по размеру порами, которые будут улучшать адгезию клеток. Именно биокерамика как материал-заменитель совмещает в себе необходимую прочность костной ткани и ее пластичность. Фосфаты кальция, из которых состоит биокерамика, модифицируют с помощью включений кремния, стронция и цинка, что усиливает пролиферацию остеобластов, повышает механическую прочность и биосовместимость [47].

Биокерамика на основе гидроксиапатита (ГА), трикальцийфосфата и сульфата кальция является ломкой и плохо справляется с требованиями к материалу для имплантата. Поры, имеющиеся в конструкции, уменьшают плотность материала, однако они необходимы для лучшей остеointеграции. В совокупности это создает новые сложности для создания подходящей биокерамики с целью применения в тканевой инженерии, именно поэтому биокерамика не может использоваться как самостоятельный материал для

имплантата. В этом случае фосфаты кальция совмещают с биополимерами для получения необходимой механической прочности и улучшения биосовместности [48], [49].

Примером совместного использования биокерамики с биополимером является добавление к ГА поликапролактона (ПКЛ) с помощью селективного лазерного спекания, что показывает усиленную механическую прочность конструкции в целом [50]. Более детальное развитие исследований в этом направлении даст возможность создания максимально анатомо-индивидуальных каркасов для заполнения костного дефекта [51].

Еще один вид керамики, который используется в реконструкции кости – это стеклокерамика. Указанный синтетический материал обладает хорошей биосовместимостью, что дает возможность вступать в контакт с живой тканью, снижая вероятность отторжения. Стеклокерамика представляет собой кристаллизованное стекло с остаточной стеклянной фазой, однако, в отличие от стеклокерамики, биоактивное стекло является аморфным веществом. Его продукты быстро разрушаются в окружающей среде, приводя к усилению экспрессии генов и клеточной активности [48].

Биостекло благодаря своей биологической активности может быть использовано в качестве покрытия для менее биосовместимых и биоинертных материалов, например, титана и стали. Металлы обладают механической прочностью, однако оказывают неблагоприятное влияние на живой организм после пересадки, вызывая воспалительные реакции и цитотоксическое действие. Именно поэтому металлические конструкции следует покрывать биостеклом или материалом из кальция фосфата с помощью плазменного напыления, это улучшает биосовместимость имплантата с живыми тканями и органами человека [52].

Таким образом, главным и общим свойством керамических материалов является их способность вызывать специфический биологический ответ, который улучшает взаимодействие между конструкцией и живыми костными

клетками, активируя их деление и рост. Однако стоит иметь ввиду, что чистая керамика не обладает подходящей прочностью, именно поэтому ведутся поиски новых материалов [50].

1.5.3 Синтетические полимеры природного происхождения

В настоящее время одним из перспективных материалов для восполнения костного объема являются конструкции на основе биополимеров – получение материалов идет естественным путем, что делает их безопасными для организма человека, в отличии, например, от металлов. Полимеры могут быть натурального происхождения – это хитозан, гиалуроновая кислота, пектин, желатин, крахмал, а также биосинтетического – полигликолиевая кислота, полиангидриды, поликарбонаты и др. [48].

1.5.3.1 Биополимеры природного происхождения

Полимеры природного происхождения, такие как гиалуроновая кислота, коллаген, желатин и др. получают из животных или растений, благодаря этому они положительно влияют на клеточно-материальное взаимодействие внутри организма. Это объясняет их распространенность в восстановлении ткани после ее повреждения [53].

Природные полимеры подвергаются деградации с образованием гидрогеля, который играет роль матрицы для остеобластов, что улучшает их адгезию. Гидрогели обладают подходящей для имплантата биосовместимостью и нужными физическими характеристиками [54], однако дальнейшие исследования показывают, что свойства гидрогелей не являются столь подходящими. Рассматриваемому материалу не хватает механической прочности, которая могла бы выдержать вес конструкции, поэтому отсутствует возможность полного перехода на материалы из гидрогелей [48].

Гидрогели совместно применяются с ГА. На их основе создают каркасы, которые уже обладают нужным набором свойств и качеств для целей костной реконструкции, таких как необходимый модуль упругости и прочность [55].

С использованием гидрогеля из коллагена была разработана матрица с эластиноподобным полипептидом. Полученный полипептид содержит в себе человеческий костный морфогенетический белок (rhBMP-2), что является благоприятным параметром для остеогенеза, и доксициллин для антимикробной активности. Новые разработки гидрогелей обладают улучшенными механическими свойствами в сравнении с уже исследованными, а постепенное высвобождение антибиотика оказывает пролонгированную противомикробную активность. Таким образом, гидрогели с совместным применением лекарственных средств являются перспективным направлением для борьбы с бактериальной инфекцией после хирургического вмешательства и стимулирования восстановления собственной костной ткани [56].

Гидрогели также подвергаются разным видам модификаций – с помощью определенных методик можно изменить гидрофобность/гидрофильность материала, а также повысить его биологическую активность. Сублимационная сушка гидрогелевых конструкций изменяет микроструктуры матрицы, делая ее более макропористой, это приводит к усилиению пролиферации и росту клеток [57].

1.5.3.2 Биосинтетические биополимеры

Полимеры биосинтетического происхождения – это нетоксичные, биосовместные компоненты, которые востребованы в медицине и тканевой инженерии, именно из этих полимеров можно сделать подходящий каркас для заполнения костного дефекта, который будет отвечать заданным характеристикам, таким как пористость, биосовместимость, биоразлагаемость и точная скорость разложения до нетоксичных соединений.

Синтетические биополимеры являются примером биоразлагаемых материалов для тканевой инженерии. К данным биополимером относятся: поливиниловый спирт (ПВС), полигидроксиалcanoаты (ПГА), полилактиды (ПЛА), полигликолиды. Их получение достаточно дорогостоящее, однако биосинтетические полимеры могут быть произведены в крупных масштабах и в контролируемых условиях. ПГА, ПЛА и их сополимеры находят широкое применение в тканевой инженерии для восполнения утраченного костного объема [58].

Характерной особенностью большинства биополимеров является то, что они способны к разложению в физиологических условиях организма. Конструкции биополимерного происхождения представляют собой пористые каркасы из натуральных и биосинтетических материалов (полностью натуральные биополимеры не обладают подходящей механической прочностью) [59].

Наиболее исследованными биоразлагаемыми полимерами являются сложные полиэфиры, полученные из лактида, гликолида и капролактоновых мономеров. Их разложение в организме зависит от вида изомера, кристаллического строения, молекулярного веса. В процессе биодеградации полимеры распадаются на небольшие олигомеры, которые выводятся почками, как побочные продукты [60], [61].

Главным отличием биополимеров от других материалов является то, что в них не могут присутствовать включения белков инородного происхождения, которые способны к передаче ненужных сигналов, что могло бы вызвать воспалительный процесс и, как следствие, отторжение имплантата.

В последнее время постепенно внедряются в применение биополимеры совместно с коллагеном: для анализа их взаимодействия была сконструирована коллагеновая губка, состоящая из волокон полигликолиевой кислоты и коллагена. Сканирующая электронная микроскопия показала, что полученная коллагеновая губка с биополимером превосходила исходный материал без него,

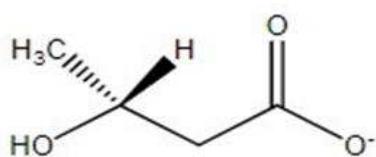
то есть совместный имплантат улучшает скорость пролиферации и дифференцировки МСК. Таким образом, очевидна выгода их применения в тканевой инженерии как материала для заполнения костного дефекта [62].

Приведенные выше биополимеры могут быть использованы совместно с другими материалами, образуя композиты. В одном из исследований на добровольцах были исследованы биоразлагающиеся пористые каркасы для восстановления костной ткани на основе полигидроксибутират (ПГБ) и гидроксиапатита (ГА). Гидроксиапатит благодаря своему составу улучшает свойства исходного материала, повышая его остеогенные характеристики. Полученные конструкции были имплантированы в организм, и в процессе исследования сделаны выводы о том, что внедрённые матрицы являлись цитосовместными, способными поддерживать адгезию и пролиферацию остеобластов. Это отличало их от материалов на чистом биополимере [63].

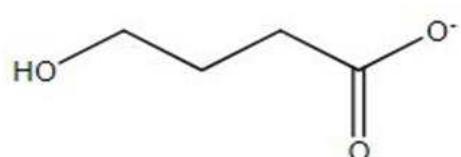
В настоящее время широко востребованными становятся материалы из особого класса биоразлагаемых полимеров, производимых микроорганизмами в процессе своей жизнедеятельности – полигидроксиалканоатов (ПГА) – полиэфиров на основе гидроксимасляной кислоты. Из полученного бактериального материала делают подложки (скаффолды) для наращивания клеток реципиента, также материалы могут быть дополнительно модифицированы для создания максимально анатомо-индивидуального каркаса [64].

Биоматериалы, состоящие из ПГА – макромолекул бактериального происхождения, которые накапливаются в цитоплазме бактерий в виде нерастворимых гранул, являются биосовместимыми и биоразлагаемыми полиэфирами, подвергаются модификациям, поэтому конструкции из таких материалов обладают хорошей прочностью на разрыв, устойчивостью к высоким температурам и подходящей эластичностью, ввиду этого прекрасно квалифицируются для целей использования в качестве каркаса в тканевой инженерии костной ткани.

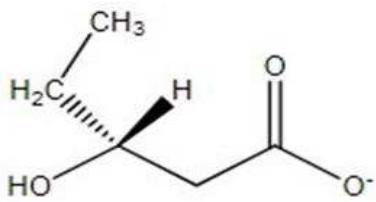
ПГА могут отличаться по количеству атомов углерода, включённых в полимерную цепь, таким образом, существуют ПГА с короткой цепью из 1-5 атомов, со средней длиной цепи из 6-14 атомов углерода и с длинной цепью, состоящей из более 14 атомов. Химический же состав ПГА может варьироваться, это зависит от производителя, углеродного субстрата и вносимых прекурсоров. Молекулярная масса этих полимеров колеблется от 200 до 300 кДа. Также ПГА могут быть классифицированы на основе мономерных звеньев, например, полимер с одним типом мономера – гомополимер, такой как поли-(3-гидроксибутират), ПГА с более, чем одним мономером – гетерополимер, примером может служить поли-(3-гидроксибутират-ко-3-гидроксивалерат) [65].



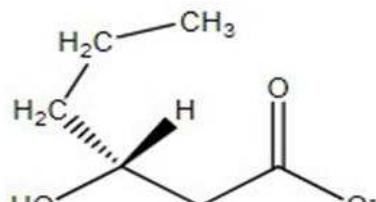
3-гидроксибутират



4-гидроксибутират



3-гидроксивалерат



3-гидроксигексаноат

Рисунок 2 – Основные короткоцепочные мономеры ПГА

ПГА синтезируются в ходе сложного многоэтапного процесса. Изначально происходит транспорт источника углерода для синтеза полимера из внешней среды в клетку. Вследствие анаболических и катаболических реакций образуется Ацетил-КоА, тиоэфир которого является субстратом для ПГА-синтетаз, ПГА-синтетазы образуют эфирные связи, из которых и складывается полимерная цепь. Процесс может быть контролируемым с помощью добавления ферментов [66]. Для использования биополимера необходимо проведение его экстракции и очистки, для получения высокоочищенного полимера, пригодного для биомедицинского использования. Для этого ПГА

растворяют в неполярных растворителях, ди- или трихлорметане, затем осаждают гексаном для получения осадка белого цвета [67].

Выделенный материал обладает подходящей механической прочностью и пластичностью, может быть модифицирован, то есть из него можно сконструировать костные каркасы разного размера и диаметра, которые будут выполнены по индивидуальным требованиям. Полученные скаффолды будут служить в качестве носителей пролиферирующих стволовых клеток, позволяя им размножаться и мигрировать к поврежденным тканям в заданном направлении. В отличие от конструкций из другого материала, конструкции из ПГА имеют необходимые поверхностные поры 10-60 мкм, которые соединены друг с другом проходами с размером 8,8 мкм. Эти характеристики благоприятствуют высокой адгезии клеток *in vivo* и улучшенной дифференцировке мезенхимальных стволовых клеток человека [68].

На сегодняшний день ведутся многочисленные исследования этого класса биоразлагаемых полимеров, которые демонстрирует ценные свойства отдельных представителей ПГА, такие как термопластичность, биосовместимость, биодеградация, невосприимчивость к катализитической деградации в водной среде, медленной кинетикой биосорбции – это позволяет контролировать высвобождение препарата, которым можно нагружать скаффолды [66].

Клинические испытания показали, что ПГБ – гомополимер D(-)-3-β-гидроксимаслянной кислоты, состоящий из 97,7% полимера, 1,87% белка и 0,46% липидов биосовместим с различными клеточными линиями, включая остеобласти. Однако сам ПГБ обладает не той прочностью, которая была бы сопоставима с нативной костью, поэтому ведутся исследования по созданию сополимеров ПГБ для улучшения физико-химических и механических свойства материала [69].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Биополимерные образцы

В работе были исследованы биополимерные образцы полигидроксиалканоатов (ПГА), а именно гомогенный поли-3-гидроксибутират и его сополимер поли-3-гидроксибутират-ко-3-гидроксивалерат с 30 мол.% включением валерата. Образцы ПГА были получены в Лаборатории биотехнологии новых биоматериалов СФУ по стандартному протоколу.

2.1.1 Биосинтез ПГА

Продуцент ПГА – штамм *Cupriavidus necator* B-10646, зарегистрированный во Всероссийской коллекции, способный к высокому накоплению гранул ПГА.

Посевной материал получали из ресуспендированной музейной культуры на агаре. Культуру выращивали на жидкой среде Шлегеля, источник азота – мочевина, углеродный субстрат – глюкоза концентрацией 10 г/л. Инокулят получали в стерильных условиях, для этого использовали шейкер-инкубатор «Incubator Shaker Innova» («New Brunswick Scientific», США) и стеклянные колбы объемом до 2 л. Инокулят культивировали при температуре 30°C, 200 об/мин. Дальнейшее культивирование проводили в ферментёре Bioengineering (Швейцария) – NLF 22, объем аппарата 30 л (рабочий объем от 5 до 20 л).



Рисунок 3 – Ферментер Bioengineering, 30 л

Для получения сополимера с валератом добавляли одновременно с глюкозой валерьяновую кислоту с концентрацией 0,02 г/л.

2.1.2 Получение биополимерных пленочных образцов

Одним из наиболее распространенных способов получения пленок является способ отливки раствора на обезжиренную поверхность (casting solution).

Для получение пленок полимер растворяли в дихлорметане (CH_2Cl_2), для улучшения растворения использовали магнитные мешалки Heidolph MR Hei-Standard (Heidolph Instruments, Германия) с нагревом до 50°C. Процедуру проводили до тех пор, пока раствор не станет гомогенным. Работы проводились в ламинарном шкафу (LAMSYSTEMS, Россия) под вытяжкой и в защитных перчатках для обеспечения безопасности. Раствор разогретого до 45°C

полимера отливали через фильтр – мельничный газ, на обезжиренную поверхность чашки Петри с дальнейшим его испарением в беспылевом бокс-ламинаре (Labconco, США). После чего пленки отделяли от стеклянной поверхности и с помощью специальной формы высекали диски диаметром 5 мм. Полученные полимерные матрицы помещали в 96-ти луночный планшет и подвергали стерилизации УФ-излучением в 70% этаноле в течение 15 минут. Стерилизованные матрицы промывали три раза фосфатно-буферным раствором и замачивали в полной ростовой среде ДМЕМ.

2.2 Исследование свойств поверхности пленочных образцов

Свойства поверхности пленочных образцов исследовали с помощью прибора для измерения краевых углов смачивания DSA-25E (Krüs, Германия) с использованием программы DSA-4 для Windows. На поверхность биополимерных пленок при помощи микрошприцов последовательно наносили капли воды и дийодметана объёмом 1,5 мкл, взаимодействие жидкости с поверхностью документировали на видео для дальнейших расчётов.

Для вычисления краевого угла смачивания полученный кадр видеофиксации капли стабилизировали, после чего проводили его обработку в полуавтоматическом режиме при помощи программного метода «Circle».



Рисунок 4 – прибор для измерения краевых углов DSA-25E

Для каждого образца проводили 10 измерений, после чего по полученным значениям контактного угла смачивания находили поверхностную энергию, дисперсную и полярную составляющие. Для нахождения использовалась формула Оунса, Вендта, Рабеля и Кельбье (ОВРК):

$$\frac{\sigma_L (\cos \phi + 1)}{2\sqrt{\sigma_L^D}} = \frac{\sqrt{\sigma_S^P} * \sqrt{\sigma_L^P}}{\sqrt{\sigma_L^D}} + \sqrt{\sigma_S^D}, \quad (1)$$

Шероховатость поверхности полимерных образцов исследовали с помощью атомно-силового микроскопа «SmartSPM» (ООО «Аист-НТ», Россия). Для этого вычисляли среднюю и среднеквадратичную шероховатость, а также максимальную глубину.

Количество пор и их суммарную площадь измеряли по результатам анализа СЭМ-изображений с использованием свободного программного обеспечения для анализа и обработки растровых изображений ImageJ 1.53a.

2.3 Исследование механических свойств пленочных образцов

Для определения механических свойств использовали универсальную электромеханическую испытательную машину Instron 5565-5KN (Instron, Великобритания). С помощью испытательной машины находили: модуль Юнга (Мпа), напряжение при разрыве (Мпа), относительное удлинение при разрыве (%). Испытания модуля упругости проводились при скорости деформации 3 мм/мин.



Рисунок 5 – Универсальная испытательная машина Instron 5565-5KN

2.3 Оценка биосовместимости полученных плёночных матриксов

Для оценки биосовместимости пленочных образцов использовали линию остеобластов человека CN417D-250. На каждый матрикс высаживали клетки плотностью 10^4 кл/см², после чего добавляли 200 мкл питательной среды и культивировали в течение трех суток.

После культивирования клетки открепляли от поверхности матриксов раствором трипсина, окрашивали трипановым синим и производили подсчёт в камере Горяева живых (неокрашенных) и мертвых (окрашенных) клеток по формуле:

$$X = N * 0.05 * 10^6 * m, \quad (2)$$

Где X – концентрация клеток в мл (млн/мл), N – количество клеток в больших квадратах, m – разбавление.

Жизнеспособность клеточных культур определяли при помощи МТТ-теста – калориметрического анализа для оценки метаболической активности клеток. Метод основан в восстановлении митохондриальными дегидрогеназами тетразолиевого красителя 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразол бромида в нерастворимый формазан, количество которого свидетельствует об активности процесса дыхания клеток. Контролем служила поверхность планшетов из полистирола.

Матриксы помещали в 96-луночный планшет и проводили высея клеток плотностью 10^4 на лунку в 200 мкл питательной среды. Клетки культивировали в течение 3 суток, после чего в каждую лунку вносили 10 мкл раствора МТТ и 190 мкл среды ДМЕМ. После 4-х часов инкубирования образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в 200 мкл ДМСО и измеряли оптическую плотность.



Рисунок 6 – фотометр Bio-Rad 680

Измерение оптической плотности производили при длине волны $\lambda = 550$ нм на фотометре Bio-Rad 680 (Bio-Rad LABORATORIES Inc, USA). Количество жизнеспособных клеток определяли при помощи калибровочного графика.

2.5 Окрашивание клеток флуоресцентным красителем DAPI

Флуоресцентное окрашивание проводили красителем DAPI, который окрашивает ядерный материал клеток. Матриксы с клетками промывали фосфатно-солевым буфером, после чего фиксировали 4% раствором формалина в течение 1 часа. После промывали раствором Triton-X и снова буфером. После чего окрашивали DAPI концентрацией 1 мкг/мл по 50 мкл на один образец в течение 15 минут. После чего микроскопировали на флюоресцентном микроскопе Leica DM6000 (Leica Microsystems, Германия).

2.6 Статистическая обработка данных

Обработку данных производили с использованием программы Microsoft Excel 2020. Полученные результаты статистического анализа представлены в виде среднего арифметического со стандартным отклонением. Для достоверности использовали t-критерий Стьюдента при уровне значимости $p = 0.05$. Данные высокоточного метода АСМ даны в виде средних значений измерений.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Изъято 9 страниц

ВЫВОДЫ

1. Были получены и исследованы свойства 2 типов ПГА: гомогенный ПЗГБ и сополимер с ЗГВ с содержанием последнего 30 мол.%.

2. Из полученных ПГА были сконструированы биополимерные пленки, исследованы их физико-химические и механические характеристики.

3. Показано, что включение в цепь звеньев валерата делает полимер менее жестким и более эластичным в сравнении с ПЗГБ. Также включение молекул ЗГВ повышает показатели шероховатости, что благоприятствует адгезии клеток, в отличии от более гладкой и гидрофобной поверхности пленки из ПЗГБ. То есть ПЗГБ/ЗГВ с включением 30 мол.% валерата предпочтительнее для целей тканевой инженерии, чем ПЗГБ. Его исследованные характеристики наиболее приближены к параметрам кости человека.

4. Важным показателем является полная биосовместимость полученных ПГА с клеточной линией остеобластов. Свойства поверхности напрямую влияют на адгезию и рост остеобластов CN417D-250. В ходе исследования было продемонстрировано, что матричные носители из ПЗГБ и ПЗГБ/ЗГВ не оказывали цитотоксического влияния на клетки, это дает возможность для их использования в тканевой инженерии с целью восполнения костного дефекта. По полученным в эксперименте результатам можно сделать вывод, что биополимерные пленки являются благоприятной матрицей для адгезии и пролиферации клеток, количество которых на 3-и сутки превышает контроль.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

1. ПКСМ – плюрипотентные клетки скелетогенной мезенхимы
2. ГА – гидроксиапатит
3. МСК – мезенхимальные стволовые клетки
4. ГКГ – главный комплекс гистосовместимости
5. ЧЛА – человеческие лейкоцитарные антигены
6. ПГА – полигидроксиалканоаты
7. ПКЛ – поликапролактон
8. rhBMP-2 – человеческий костный морфогенетический белок
9. ПВС – поливиниловый спирт
10. ПЛА – полилактид
11. ПГБ – полигидроксибутират
12. ПЗГБ-ГВ – поли-3-гидроксибутират-со-3идроксивалерат

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Панков И.О. Современные методы лечения переломов костей конечностей в сочетании с тяжелой травмой груди и живота / Панков И.О., Емелин А.Л., Рябчиков И.В., Айдаров В.И. // Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека. – 2011 г. – 83с.
2. Bouquegneau A. Bone disease after kidney transplatation / Bouquegneau A., Salam S., Delanaye P., Eastell P., Khwaja R. // Clinical journal of the american society of nephrology. – 2016. – Р. 1282-1296
3. Корнилов Н. Травматология и ортопедия / Корнилов Н.В., Грязнухин Э.Г., Шапиро К.И., Осташко В.И., Редько К.Г., Ломая М.П. – Изд. Санкт-Петербург: ГИППОКРАТ, 2001.
4. Preethanath R. Microbiome of dental implants and its clinical aspect / Preethanath R.S., AlNahas NW., Bin Huraib S.M., Al-Balbeesi H.O., Almalik N.K., Dalati M.H., Divakar D.D. // Microbial pathogenesis. – 2017. – Р. 1-22
5. McGovern J. Animal models for bone tissue engineering and modelling disease / McGovern J. A., Griffin M., Hutmacher D.W. // Disease Models & Mechanisms. – 2018. – Р. 1-14
6. Степанов О. Анатомия человека / Степанов О.И., Евремейшвили А.В., Степанов И.О. – Изд. Ярославль: РИО-Гранд, 1998.
7. Никулина Н.Б. Остеология / Никулина Н.Б., Никонова Н.А. - Изд: Пермь: ИПЦ «ПрокроСТЬ», 2019.
8. Сапин М. Анатомия человека / Сапин М.Р., Швецов Э.В. – Изд: Ростов-на-Дону: Феникс, 2008.
9. Kao S. A review of bone substitutes / Kao S.T., Scott D.D. // Oral and maxillofacial. – 2007. – Р. 513-521
10. Matsuo T. Bone substitutes and implantation depths for subchondral bone repair in osteochondral defects of porcine knee joints /

Matsuo T., Kita K., Mae T., Yonetani Y., Miyamoto S., Yoshikawa H., Nakata K. // Sports traumatology. – 2014. – P. 1401-1409

11. Шевцов В. И. и др. Аппарат Илизарова. Биомеханика // Курган: Периодика. – 1995.

12. Eugenio C. Autograft, allograft and bone substitutes in reconstructive orthopedic surgery / Eugenio C., Matteo C., Giuseppe T., Paola C., Carlotta C., Alba S., Sandro G. // Orthopaedic and Traumatologic Clinic. – 2013. – P. 101-103

13. Hull T. Why some organ allografts are tolerated better than others / Hull T.D., Benichou G., Madsen J.C. // Current opinion in organ transplantation. – 2018. – P. 49-57

14. Matthew J. ACL Allograft: Advantages and When to Use / Matthew J. B., Thomas C. // Sports Medicine and Arthroscopy Review. – 2018. – P. 75-78

15. Fen X. Microstructural properties of trabecular bone autografts: comparison of men and women with and without osteoporosis / Fen X., Bin Z., Jian W., Tang L., Xiyu W., Fang R., Kang Y., Ruchun D. // Archives of Osteoporosis. – 2018. – P. 1-10

16. Károly S. Bone-Albumin filling decreases donor site morbidity and enhances bone formation after anterior cruciate ligament reconstruction with bone-patellar tendon-bone autografts / Károly S., Dénes B.H., Attila D., Ernő M., Charlotte M. S., Lajos C., Géza A., László B., Zsombor L. // International Orthopaedics. – 2016. – P. 2097-2104

17. Shibuya N. Bone Grafts Substitute / Shibuya N., Jupiter D.C. // Clinics in podiatric medicine and surgery – 2014. – P. 21-34

18. Mahdi B. A glow of HLA typing in organ transplantation / Mahdi B.M. // Clinical and Translational Medicine – 2013. – P. 1-5

19. Alelign T. Kidney Transplantation: The Challenge of Human Leukocyte Antigen and Its Therapeutic Strategies / Alelign T., Ahmed, M. M.,

Bobosha, K., Tadesse, Y., Howe, R., & Petros, B. // Journal of Immunology Research – 2018. – P. 1–18.

20. Serrano Mendez C. Comparison of allografts and xenografts used for alveolar ridge preservation. A clinical and histomorphometric RCT in humans / Serrano Mendez C.A., Lang N.P., Caneva M., Ramirez Lemus G., Mora Solano G., Botticelli D. // Clinical implant dentistry and related research – 2017. – P. 608-615

21. Daniel N. Investigating the Osteoinductive Potential of a Decellularized Xenograft Bone Substitute / Daniel N.B., Alexander H. J., Jeffrey S.W., Thorsten M.S., Ian D.H., Patrick W.W., Thomas L.S., Kerry A.D., Cynthia L.E., Bethany A.K. // Tissue Engineering: Regenerative Medicine. – 2019. – P. 97-113

22. Margherita T. Synthetic Blocks for Bone Regeneration: A Systematic Review and Meta-Analysis / Margherita T., Paolo S., Massimo D.F. // International journal of molecular sciences. – 2019. – P. 1-19

23. Kawecki F. Biomimetic Tissue-Engineered Bone Substitutes for Maxillofacial and Craniofacial Repair: The Potential of Cell Sheet Technologie / Kawecki F., Clafshenkel W.P., Fortin M., Auger F.A., Fradette J. // Advanced healthcare materials. – 2017 . – P. 1-16

24. Vieira S. Nanoparticles for Bone Tissue Engineerin / Vieira S., Vial S., Reis R.L. // Cell Culture and Tissue Engineering. – 2017 г. – P. 590-611

25. Kim H. Biomimetic Materials and Fabrication Approaches for Bone Tissue Engineering / Kim H.D., Amirthalingam S., Kim S.L. // Advanced healthcare materials. – 2017. – P. 1-18

26. Robbins S. Use of Nanocrystalline Hydroxyapatite With Autologous BMA and Local Bone in the Lumbar Spine / Robbins S., Lauryssen C. // Journal of Spinal Disorders & Techniques. – 2014. – P. 192-197

27. Lim J. Emerging bone tissue engineering via Polyhydroxyalkanoate (PHA)-based scaffold / Lim J., You M., Li J. // Materials Science & Engineering C. – 2017. – P. 917-929
28. Brunello G. Powder-based 3D printing for bone tissue engineering / Brunello G., Sivolella S., Meneghelli R. // Biotechnology Advances. – 2016. – P. 740-753
29. Барановский Д. Интерлейкин IL-1 β стимулирует ревитализацию хрящевого матрикса назальными хондроцитами человека *in vitro* / Барановский Д.С., Люндуп А.В., Баласин М.В. и др. // ВЕСТНИК ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ. – 2019. – 88-95 с.
30. Cornelsen M. Infiltration of 3D printed tricalciumphosphate scaffolds with biodegradable polymers and biomolecules for local drug delivery / Cornelsen M., Petersen S., Dietsch K. // Biomedical Technology. – 2013. – P. 58-59
31. Wubneh A. Current State of Fabrication Technologies and Materials for Bone Tissue Engineering / Wubneh A., Tsekoura E., Ayranci C. // Acta Biomaterialia. – 2018. – P. 1-30
32. Кузнецова Д.С. Костные имплантаты на основе скаффолдов и клеточных систем в тканевой инженерии / Кузнецова Д.С, Тимашев П.С., Баграташвили В.Н., Загайнова Е.В. // Костные имплантаты на основе скаффолда и клеточных систем. – 2014. – 201-212 с.
33. Kantaros A. 3D printing-assisted design of scaffold structures / Kantaros A., Chatzidai N., Karalekas D. // The International Journal of Advanced Manufacturing Technology. – 2015. – P. 559-571
34. Bohner M. Theoretical model to determine the effects of geometrical factors on / Bohner M., Baumgart F. // Biomaterials. – 2004. – P. 3569-3582

35. Kumar A. Low temperature additive manufacturing of three dimensional scaffolds for bone-tissue engineering applications: Processing related challenges and property assessment / Kumar A., Mandal S., Barui S. // Materials Science and Engineering: R: Reports. – 2016. – P. 1-39
36. Les allongements progressifs de l'avant-bras chez l'enfant. À propos d'une série de 14 cas / F. Launay, J.L. Jouve, E. Guillaume et al. // Rev. Chir. Orthop. 2001. Vol. 87. P. 786-795
37. Лечение переломов плечевой кости с применением биоактивных и биоинертных имплантатов Попов В.П. Бюллетень сибирской медицины 2012
38. Saeed R. Smart scaffolds in bone tissue engineering: A systematic review of literature / Saeed R.M., Sepanta H., Mitra G.A., Arash K. // World journal of stem cells. – 2015. – P. 657-668
39. Glenske K. Applications of Metals for Bone Regeneration / Glenske K., Donkiewicz P., Köwitsch A., Milosevic-Oljaca N., Rider P., Rofall S. // International Journal of Molecular Sciences. – 2018. – P. 1-32
40. Bernhardt A. Osteoclastic differentiation and resorption is modulated by bioactive metal ions Co²⁺, Cu²⁺ and Cr³⁺ incorporated into calcium phosphate bone cements / Bernhardt A., Schamel M., Gbureck U., Gelinsky M. // PLOS ONE. – 2017. – P. 1-18
41. Exley C. Human exposure to aluminium / Exley C. // Environ. Sci.: Processes Impacts – 2013. – P. 1807-1816
42. Hadjicharalambous C. Porous alumina, zirconia and alumina/zirconia for bone repair: fabrication, mechanical and in vitro biological response / Hadjicharalambous C., Buyakov A., Buyakova S., Kulkov S., Chatzinikolaidou M. // Biomedical materials. – 2015. – P. 1-13
43. Schrock K. Co(II)-Mediated Effects of Plain and Plasma Immersion Ion Implanted Cobalt-Chromium Alloys on the Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells / Schrock K., Lutz J.,

Mandl S., Hacker M.C. // JOURNAL OF ORTHOPAEDIC. – 2014. – P. 325-333

44. Ning J. The cytotoxicity of chromium in osteoblasts: effects on macromolecular synthesis / Ning J., Henderson C., Grant M.H. // Journal of materials science. – 2002. – P. 47-52
45. Zhang J. Calcium Phosphate Cements (CPCs) for bone substitution: chemistry, handling and mechanical properties / Zhang J., Liu W., Schnitzler V., Tancret F., Bouler J-M. // Acta Biomaterialia. – 2014. – P. 1035-1049
46. Yu-Tzu Tsao. Knockdown of SLC41A1 magnesium transporter promotes mineralization and attenuates magnesium inhibition during osteogenesis of mesenchymal stromal cells / Yu-Tzu Tsao, Ya-Yi Shih, Yu-An Liu. // Stem Cell Research and Therapy. – 2017. – P. 1-10
47. Ding W. Opportunities and challenges for the biodegradable magnesium alloys as next-generation biomaterials / Ding W. // Regenerative Biomaterials – 2016. – P. 79-86
48. Hench L. Bioceramics / Hench L. L. // Journal of the American ceramic society. – 2005. – P. 1705-1728
49. Sarkar S. Hard tissue regeneration using bone substitutes: an update on innovations in materials / Sarkar S.K., Lee B.T. // Korean J Intern Med. – 2015. – P. 279-293
50. Masanobu K. Preparation and evaluation of spherical Ca-deficient hydroxyapatite granules with controlled surface microstructure as drug carriers / Masanobu K., Ryohei I., Koji I. // Materials Science and Engineering. – 2013. – P. 2446-2450
51. Laschkeab M. In vitro and in vivo evaluation of a novel nanosize hydroxyapatite particles/poly(ester-urethane) composite scaffold for bone

tissue engineering / Laschkeab M.W., Stroheab A., Menger M.D. // Acta Biomaterialia. – 2009. – P. 2020-2027

52. Eshraghi S. Micromechanical finite-element modeling and experimental characterization of the compressive mechanical properties of polycaprolactone–hydroxyapatite composite scaffolds prepared by selective laser sintering for bone tissue engineering. / Eshraghi S., Das S. // Acta Biomaterialia. – 2012. – P. 3138-3143

53. Henao J. Bio-active glass coatings manufactured by thermal spray: a status report / Henao J., Poblano-Salas C., Monsalve M. // Journal of Materials Research and Technology. – 2019. – P. 4965-4984

54. Park J. The use of hydrogels in bone-tissue engineering / Park J. // Medicina oral patologia oral y cirugia bucal – 2011. – P. 115-118

55. Slaughter B. Hydrogels in Regenerative Medicine / Slaughter B.V., Khurshid S.S., Fisher O.Z. // Advanced materials. – 2009. – P. 3307-3329

56. F Yuan. Preparation and properties of polyvinyl alcohol (PVA) and hydroxylapatite (HA) hydrogels for cartilage tissue engineering / F Yuan, M Ma, L Lu, Z Pan. // Cell Molecular Biology. – 2017. – P. 32-35

57. Pal P. Drug-Loaded Elastin-Like Polypeptide–Collagen Hydrogels with High Modulus for Bone Tissue Engineering / Pal P., Nguyen Q.C., Benton A.H., Marquart M.E., Janorkar A.V. // Macromolecular Bioscience. – 2019. – P. 1-13

58. Nguyen T. A Combination of Biphasic Calcium Phosphate Scaffold with Hyaluronic Acid-Gelatin Hydrogel as a New Tool for Bone Regeneration / Thuy Ba Linh Nguyen, Byong-Taek Lee. // TISSUE ENGINEERING: Part A. – 2014. – P. 1993-2004

59. Sokolsky M. Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering / Sokolsky-Papkov M., Agashi K., Olaye A. // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2007. – P. 187-206

60. Okamoto M. Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds / Okamoto M., John B. // Progress in Polymer Science. – 2013. – P. 1487-1503
61. Quirk R. Supercritical fluid technologies and tissue engineering scaffolds / Quirk R.A., France R.M., Shakesheff K.M., Howdle S.M. // Curr Opin SolidState Mater Sci. – 2004. – P. 313-321
62. Rimondini L. In vivo experimental study on bone regeneration in critical bone defects / Rimondini L., Nicoli-Aldini N., Fini M. // Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. – 2005. – P. 148-154
63. Toosi S. PGA-incorporated collagen: Toward a biodegradable composite scaffold for bone-tissue engineering / Toosi S., Naderi-Meshkin H., Kalalinia F. // Journal of Biomedical Materials Research: Part A. – 2016. – P. 2020-2028
64. Young C. Tissue-Engineered Hybrid Tooth and Bone / Young C.S., Abukawa H., Asrican R. // Tissue Engineering. – 2005. – P. 1599-1610
65. Lim J. Emerging bone tissue engineering via Polyhydroxyalkanoate (PHA)-based scaffold / Lim J., You M., Li J. // Materials Science & Engineering C. – 2017. – P. 917-929
66. Dwivedi R. Poly hydroxyalkanoates (PHA): Role in bone scaffolds / Dwivedi R. Pandey R., Kumar S., Mehrota D. // Journal of Oral Biology and Craniofacial Research . – 2020. – P. 389-392.
67. Zhao K. Polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds with good mechanical properties and biocompatibility / Zhao K., Deng Y., Chen C.j., Chen Guo-Qiang // Biomaterials. – 2003. – P. 1041-1045.
68. Волова Т. Полиоксиалканоаты (ПОА) - биоразрушаемые полимеры для медицины // Волова Т.Г., Севастьянов В.И., Шишацкая Е.И. – Изд. Новосибирск: СО РАН, 2003.

69. Wei D-X. A Micro-Ark for Cells: Highly Open Porous Polyhydroxyalkanoate Microspheres as Injectable Scaffolds for Tissue Regeneration / Wei D-X., Dao J-W., Chen G-Q. // Advanced materials. – 2018. – P.1-10

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
институт
Базовая кафедра биотехнологии
кафедра

УТВЕРЖДАЮ

 Т.Г. Волова
Подпись, инициалы фамилия
«28» июня 2021г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

Изучение биоразрушаемых биоматериалов для целей тканевой инженерии
костной ткани

тема

06.04.01 Биология

код и наименование направления

Научный руководитель



Зав. каф., д.б.н.

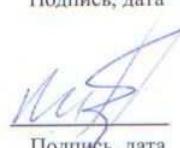
Подпись, дата

должность, ученая степень

Е.И. Шишацкая

инициалы, фамилия

Выпускник



Подпись, дата

А.В. Мякишева

инициалы, фамилия

Красноярск 2021