

На правах рукописи

УДК: 616 314-089.834-74



003058133

— — — — — 2007

ТАТАРЕНКО-КОЗМИНА

Татьяна Юрьевна

**Патофизиологические механизмы применения мезенхимальных стволовых
клеток на синтетических композитах для оптимизации регенерации
костной ткани
(лабораторно-экспериментальное исследование)**

14 00 16- патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук**

Москва – 2007

Работа выполнена в Московском государственном медико-стоматологическом университете Росздрава, лаборатории биотехнологии минерализованных тканей НИМСИ при МГМСУ и Научно-исследовательском центре биомедицинских технологий ВИЛАР (г. Москва)

Научные консультанты:

Заслуженный деятель науки РФ, Лауреат Государственной премии РФ, доктор медицинских наук, профессор А И Воложин
доктор медицинских наук, профессор А.А Докторов

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор Инна Иосифовна Дементьева
доктор биологических наук, профессор Константин Никитич Ярыгин
доктор медицинских наук, профессор Рубен Карпович Чайлахан

Ведущая организация: Московская медицинская академия
им И М Сеченова

Защита диссертации состоится «30» декаб 2007 г
В « » часов на заседании диссертационного совета Д 212 203 06 при
ГОУ ВПО Российский университет дружбы народов
по адресу ул. Миклухо-Маклая, дом 6

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке университета
(ул Миклухо-Маклая, дом 6)

Автореферат разослан «12» декаб 2007

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук,
профессор



Г А Дроздова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Актуальной проблемой медицины является поиск и разработка остеопластических материалов для замещения костных дефектов. С этой целью активно производятся различные биостабильные и резорбируемые, а также комбинированные биосовместимые композиционные материалы, близкие по физико-механическим свойствам к костной ткани (Воложин А.И., Григорьян А.С., 2002, Топольницкий О.З., 2002, Григорьян А.С. и соавт., 2003, Жарков А.В., Краснов А.П., Воложин А.И., 2005; Хлусов И.А., Карлов А.В., Поженко Н.С. и соавт. 2006, Комлев В.С., С.М. Баринов, Сергеева Н.С. и соавт. 2006). Они успешно заменяют остеопластические материалы биологического происхождения в виду того, что ксеногенные материалы, используемые от животных, обладают высокой иммуногенностью, в результате чего они быстро резорбируются или отторгаются вследствие иммунного конфликта и воспалительного процесса. Использование аллотрансплантатов (взятие костного материала от трупов людей) встречает трудности из-за проблем этического характера и несет опасность инфицирования различными возбудителями трансмиссивных болезней. Также возникают сложности при стерилизации и хранении трансплантатов биологического происхождения. Среди биостабильных композитов заслуживает внимания полиметилметакрилат (ПММА), который используется в челюстно-лицевой хирургии, травматологии и ортопедии (Дробышев А.Ю., 2001, Чергештов Ю.И., 2001; Бирюкбаев Т.Т., 2002), а также сверхвысокомолекулярный полиэтилен (СВМПЭ), полиамид (ПА) и другие композиты (Ульянов С.А. и соавт., 2001; Алиев А.У., 2002, Свирко Е.В., 2002, Немерюк Д.А., 2002, Григорьян А.С., А.И. Воложин, А.П. Краснов, 2003). Они обладают многими позитивными свойствами, которые могут быть использованы для костной пластики механической прочностью, неспособностью к гидролизу в биологических средах, низкой иммуногенностью и токсичностью, а также безопасностью с точки зрения возможности переноса инфекции к реципиенту. Различия между материалами заключаются в особенностях технологии изготовления, в степени

остеоинтегративности и механических характеристиках. Для усиления остеоинтегративных свойств и биосовместимости синтетических материалов в их состав вводят синтетический гидроксиапатит, преимущественно в виде пористых гранул, а также β -трикальцийфосфат, которые имеют высокую биосовместимость, способствуют росту костной ткани на поверхности имплантата и обладают остеокондуктивной активностью (Орловский В.П. и др., 1990, Баринов С.М., Шевченко В.Я., 1996, Орловский В.П., Родичева Г.В., Романова Н.М., 2000, Barinov S.M., Shevchenko V.Ya., 1995).

В практической деятельности врачей разных специальностей, в особенности травматологов, стоматологов и челюстно-лицевых хирургов, нередко возникает необходимость в активизации формирования полноценной в функциональном отношении костной ткани. Особенно это касается лиц с врожденными и приобретенными нарушениями обмена веществ, сахарным диабетом, другими эндокринопатиями и общесоматическими заболеваниями. У таких людей снижен остеогенный потенциал костных клеток. Поэтому образование каркаса для регенерирующей костной ткани, обеспечение временной или постоянной компетентной основы, а также ускорение процесса репарации, являются главными требованиями к носителям, входящим в состав имплантируемых в кость конструкций (Воложин А.И., 2000, Amit M., 2000; Fleming J.E., 2000). В настоящее время недостаточно разработана технология, позволяющая выращивать костную ткань из остеогенных клеток-предшественников костного мозга, которая бы обладала необходимыми механическими и метаболическими свойствами, несмотря на то, что костномозговые стволовые клетки, обладая высоким пролиферативным потенциалом, являются глубоким резервом костной регенерации. Кроме того, количество образованной таким образом костной ткани недостаточно для восполнения костных дефектов.

В связи с этим в настоящее время можно считать особенно перспективными научные исследования, направленные на формирование костной ткани из клеток - предшественников на синтетических заменителях костной ткани нового поколения, обладающих необходимыми для практической

медицины свойствами. Не разработана технология заселения биостабильного остеопластического материала, используемого в качестве носителя остеогенных клеток-предшественников, а также способы индукции их дифференцировки, что требует проведения ряда фундаментальных и экспериментальных исследований. Они должны ответить на следующие вопросы: какова токсичность композитного материала по отношению к клеткам, их жизнеспособность, характер прикрепления к поверхности, способность к формированию монослоя на композитном материале, условия и эффективность дифференцировки клеток-предшественников в остеогенном направлении в условиях *in vitro*, а также в окружающих тканях реципиента. При разработке этого направления ведущим остается вопрос о патофизиологических механизмах взаимодействия мезенхимальных стволовых клеток с искусственными носителями и их комплексном влиянии на регенерацию костной ткани. Используемые в экспериментальных исследованиях ксеногенные стволовые клетки могут только инициировать репаративные процессы, благодаря выделению сигнальных молекул, стимулирующих клетки-предшественники реципиента. Достижение этого эффекта возможно при наличии активно функционирующих суперсемейств адгезивных молекул, факторов роста клеток и цитокинов, управляющих этими процессами. Имеющаяся литература раскрывает отдельные аспекты патофизиологических эффектов, наблюдаемых в лабораторных и экспериментальных исследованиях (J Street, Min Bao, Leo de Guzman et al, 2002, B D Boyan, S Lossdorfer, L Wang, 2003, B M. Whited, D Skrtic, B J. Love et al, 2006), однако целостная система взглядов пока отсутствует. Для достижения прогресса в этом актуальном медико-биологическом направлении была сформулирована цель нашего исследования и определены его задачи.

Цель исследования

Обосновать патофизиологические механизмы применения биостабильных синтетических композитов как носителей мезенхимальных стволовых клеток

костного мозга, с их эффективной остеогенной дифференцировкой и использовании для регенерации костной ткани

Задачи исследования:

1. Определить цитотоксичность синтетических заменителей костной ткани (полиметилметакрилата, сверхвысокомолекулярного полиэтилена и полиамида-12) по отношению к культурам фибробластов и мезенхимальных стволовых клеток костного мозга.
2. Провести идентификацию выделенных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга с помощью клеточных маркеров.
3. Использовать определение специфических маркеров (щелочная фосфатаза, коллаген I типа) для оценки эффективности остеогенной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток на полимерных материалах.
4. Количественно охарактеризовать адгезивные свойства поверхностей образцов синтетических композитов по отношению к фибробластам и мезенхимальным стволовым клеткам костного мозга
5. Изучить процесс пролиферации фибробластов и мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на синтетических заменителях костной ткани, используемых с целью остеопластики.
6. Охарактеризовать структурную организацию костной ткани в динамике ее формирования с участием мезенхимальных стволовых клеток на синтетических заменителях.
7. Оценить влияние синтетического гидроксиапатита в составе композитов на свойства образцов, используемых в качестве носителей мезенхимальных стволовых клеток костного мозга.
8. Применить метод экспериментального моделирования для оценки эффективности мезенхимальных стволовых клеток костного мозга на композиционных материалах в динамике заживления костного дефекта.
9. Сформулировать гипотетический механизм воздействия на репаративные процессы в костной ткани остеогенных клеток, заселенных на композиционные материалы

Научная новизна исследования

Впервые установлено отсутствие цитотоксичности поверхности биостабильных композиционных материалов ПА-12, ПММА, СВМПЭ, применяемых в качестве заменителей костной ткани, по отношению к постнатальным фибробластам и мезенхимальным стволовым клеткам (МСК). Новыми являются данные о том, что структура и рельеф поверхности композитных материалов существенно влияет на характер прикрепления и распределения на них фибробластов. На поверхности биостабильных композитов МСК сохраняют нормальную жизнеспособность и способность формировать плотный монослой клеток-предшественников. Введение синтетического ГАП в состав композиционных материалов приводит к увеличению общего числа МСК. Из ГАП-содержащих композитов ПА-12 создает самые хорошие условия для культивирования и развития МСК, далее следуют СВМПЭ и ПММА. Формирование коллагена I типа, гистохимическое выявление щелочной фосфатазы в клетках и образование костных узелков на поверхности изучаемых композитов к 21-м суткам культивирования МСК свидетельствуют об остеодифференцировке клеток-предшественников и создании костного матрикса.

Применение композитов со слоем костных клеток-предшественников на поверхности имплантатов способствует их интеграции с костной тканью челюсти в области создания искусственного дефекта в эксперименте. Научно обосновано, что обязательным условием хорошей остеоинтеграции является плотная фиксация имплантата к кости, а отсутствие такой фиксации исключает проявление остеоинтегративных свойств композитов с клетками-предшественниками.

Сформулирован гипотетический локальный механизм участия остеогенных ксеногенных клеток-предшественников в репаративном остеогенезе.

Практическое значение

Значение проведенных исследований для медицинской практики заключается в научном обосновании механизма применения стабильных, то

есть нерезорбируемых минералнаполненных композитов (ПА-12, ПММА, СВМПЭ) в качестве материалов для заселения МСК и с их последующей остеогенной дифференцировкой. Данные композиты заселенные МСК человека (в перспективе аутологичными или аллогенными) могут быть рекомендованы в практическое здравоохранение для клинических испытаний в травматологии и челюстно-лицевой хирургии. Практическое значение работы заключается также в разработке протокола технологии применения МСК, нанесенных на поверхность биостабильных композитов. Защищено патентом на изобретение РФ 2259851 от 24 июня 2004 года.

Протокол включает следующие этапы: исследование композитного материала на токсичность, идентификацию клеток с использованием специфических маркеров, оценку жизнеспособности и пролиферативной активности клеток, их способность к остеогенной дифференцировке, экспериментальное изучение остеointegrативных свойств. Выполнение данного протокола является условием предклинической апробации биостабильных имплантационных материалов с клетками-предшественниками костной ткани на поверхности

Внедрение результатов исследования

Основные положения работы внедрены в учебный процесс кафедры патологической физиологии стоматологического факультета МГМСУ, включены в план научной работы лаборатории биотехнологии минерализованных тканей НИМСИ при МГМСУ и Научно-исследовательского центра биомедицинских технологий (НИЦ БМТ ВИЛАР)

Положения, выносимые на защиту

1. Разработана технология заселения поверхности биостабильных композитов (ПА-12, ПММА, СВМПЭ) МСК, защищенная Патентом РФ на изобретение. Обоснованы методы исследования композитных материалов на токсичность, идентификацию клеток с помощью маркеров, оценку жизнеспособности и пролиферативной активности клеток, способность к

остеогенной дифференцировке и экспериментальное изучение остеоинтегративных свойств

2. Композиционные материалы ПА-12, ПММА и СВМПЭ, применяемые в качестве заменителей костной ткани не обладают токсичностью по отношению к культивированным постнатальным фибробластам и МСК, которые сохраняют нормальную жизнеспособность и формируют плотный монослой клеток-предшественников. Использование специфических маркеров МСК подтвердили фенотипическую принадлежность используемых в работе клеток к МСК.
3. По способности создавать оптимальные условия для культивирования и развития МСК композиты, содержащие синтетический ГАП, можно расположить по убывающей степени в следующем порядке: ПА -12, СВМПЭ, ПММА. Количество культивируемых МСК на поверхности образцов из ПММА по абсолютным показателям ниже по сравнению с ПА-12 и СВМПЭ. Введение в состав всех композитов ГАП увеличивает абсолютное число МСК на поверхности
4. Доказательством остеоидифференцировки МСК и синтеза костного матрикса является формирование коллагена 1 типа, гистохимическое выявление щелочной фосфатазы и образование костных узелков на поверхности композитов к 21-м суткам культивирования клеток на ГАП-содержащих композитах.
5. Необходимым условием хорошей остеоинтеграции имплантата является его плотная фиксация к кости, отсутствие фиксации исключает проявление остеоинтегративных свойств композитов с клетками-предшественниками. Применение композитов со слоем костных клеток-предшественников на поверхности имплантатов ускоряет их интеграцию с костной тканью челюсти в области создания искусственного дефекта в эксперименте

Апробация диссертации

Состоялась на совместной конференции НИЦ БМТ ВИЛАР, кафедр

патологической физиологии, анатомии и биологии МГМСУ. Основные положения диссертации доложены, обсуждены и одобрены на симпозиуме «Фундаментальные проблемы в стоматологии», посвященном 85-летию Заслуженного деятеля науки России, профессора С.С. Михайлова (Москва, 20 апреля 2004), Российско-Норвежском симпозиуме «Перспективы применения мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека для устранения дефектов кости при оперативном лечении заболеваний пародонта» (Москва, 23 сентября 2004), на Третьем Российском конгрессе по патофизиологии с международным участием (Москва, 9-12 ноября 2004), на III Международной конференции «Болезни цивилизации в аспекте учения В.И. Вернадского», (Москва 10-12 октября 2005), на Научной конференции с международным участием «Высокие медицинские технологии XXI века» (Испания, Бенидорм, 29 октября-4 ноября 2006)

По теме диссертации опубликовано 24 работы, в том числе 11 работ в изданиях рекомендованных ВАК.

Объем и структура диссертации

Диссертация написана на 268 страницах машинописного текста, состоит из введения, 5 глав, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы, в том числе 44 российских авторов и 217 иностранных. В диссертации представлено 5 таблиц, 1 схема и 163 рисунка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена в 2 этапа: на первом этапе – в лабораторных условиях разработан метод заселения биостабильных композитов МСК, на втором этапе – экспериментально изучены остеоинтегративные свойства композитов, заселенных МСК с последующей остеогенной дифференцировкой. Из биостабильных композиционных материалов, используемых в костной пластике, мы выбрали наиболее распространенные и изученные. К ним относятся следующие полимеры. Полиамид-12 (ПА-12) в разных модификациях («чистый», полиамид-12+ углеродное волокно, ПА-12+ углеродное волокно+

ГАП, ПА-12+ углеволокно+ ГАП + поливинилпирролидон (ПВП), ПА-12+ углеволокно + ГАП + ПВП + ПАК) **Полиметилметакрилат (ПММА)** в разных модификациях: «чистый», ПММА +30% ГАП немодифицированный, ПММА + 30% ГАП модифицированный, то есть в химической связи с полимером с помощью полиакриловой кислоты (ПК); **Сверхвысокомолекулярный полиэтилен (СВМПЭ):** «чистый», СВМПЭ + ГАП, СВМПЭ + ГАП + ПВП

Значение модификации композитов заключается в следующем ГАП (Гидроксиапатит ЗАО НПО «Полистом»), повышает остеointegrативные свойства полимера, углеволокно усиливает механические свойства и пластичность ПА-12. Поливинилпирролидон (ПВП) увеличивает биосовместимость материала, а полиакриловая кислота (ПК) создает химическую связь между полимером и кристаллами ГАП. Используемые полимеры в чистом виде и при их модификации практически не подвергаются в тканях деструкции. Все полимеры являются биосовместимыми, изучены их физико-химические свойства и способность к остеointegrации. В состав этих материалов был введен синтетический гидроксиапатит, который способствует остеointegrации и не препятствует делению стволовых клеток, их дифференцировке в клетки-предшественники и далее в зрелые костные клетки. Таким образом, свойства данных полимеров позволяют использовать их поверхности для культивирования МСК костного мозга. Приготовление композиции и изготовление образцов для исследования проведено в лаборатории полимеров Института элементоорганических соединений РАН им Несмеянова под руководством и с участием профессора А. П. Краснова. Характеристика исходных материалов представлена в таблице №1.

Из композитных материалов были изготовлены пластины размером 10x10 мм и толщиной 1 мм в количестве 300. Поверхность пластин полировали с помощью зуботехнической пасты. Для оценки возможного воздействия органических растворителей на поверхность образцов для электронно-микроскопических исследований мы проводили их предварительное тестирование на действие 100⁰ спирта, 100⁰ ацетона, смеси спирта и эфира в соотношении 1:1, а также окиси пропилена.

Таблица № 1

Спецификация исследованных групп образцов

№ группы	№ Подгруппы	Состав образцов
I	I 1	Полиамид – 12 (ПА - 12) чистый
	I 2	Полиамид – 12 + углеволокно
	I 3	Полиамид – 12 + углеволокно + ГАП 30%
	I.4	Полиамид – 12 + углеволокно + ГАП 30% + ПВП
	I 5	Полиамид - 12 + углеволокно + ГАП 30% + ПВП + ПАК
II	II 6/1	Полиметилметакрилат (ПММА) чистый
	II.6	ПММА + 30% ГАП (немодифицированный-механическая связь ПММА и ГАП)
	II.7	ПММА + 30% ГАП (модифицированный- химическая связь ПММА и ГАП с помощью полиакриловой кислоты)
III	III 8	Сверхвысокомолекулярный полиэтилен (СВМПЭ) чистый
	III.9	СВМПЭ + ГАП 30%
	III.10	СВМПЭ + ГАП 30% + ПАК

Оценка цитотоксичности тестируемых материалов, их влияние на эффективность прикрепления и пролиферации клеток

Для оценки цитотоксичности тестируемых материалов и их влияния на эффективность прикрепления и пролиферации клеток, были взяты культуры диплоидных постнатальных фибробластов и клеток стромы костного мозга человека. Клетки культивировали на среде ДМЕМ с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (фирма ПанЭко, РФ) в пластиковых одноразовых флаконах и в 24 или 96-луночных планшетах (фирма Nunk, Дания) при 37°C в условиях насыщающей влажности в атмосфере с 5%CO₂. Оценка количества клеток в слое, формирующемся на поверхности композитов, осуществлялась с применением метода фотометрии и с помощью прямого подсчета в камере Горяева после снятия раствором трипсина.

В оценке *цитотоксичности* образцов композитов использовали скрининговый (МТТ) тест МТТ-(3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолил бромид) восстанавливается в митохондриях живых клеток под действием сукцинатдегидрогеназы до водонерастворимого

темноокрашенного формазана Формазан элюируется из клеток с помощью органических растворителей (ДМСО) Оптическая плотность элюата при длине волны 570 нм пропорциональна количеству жизнеспособных клеток на образце Клетки высевали в 24-луночные пластины с плотностью 50 тыс кл /луна Через 24 часа, после распластывания клеток, в лунки вносили образцы на 72 часа Затем клетки инкубировали в присутствии МТТ (0,25 мг/мл) в течение 3-х часов Формазан элюировали с помощью ОМ80 в течение 30 мин при 37°C и проводили измерение оптической плотности элюата на планшетном фотометре «ЭФОС 93 05» (фирма «ЭФОС», РФ) при длине волны 570 нм Для подсчета элюат из одной лунки 24-луночной пластины переносили на 3 лунки 96-луночного планшета в объеме 100 мкл для получения статистически более достоверных результатов Контролем служили лунки с клетками без образцов

Эффективность прикрепления клеток к поверхности образцов оценивали по количеству прикрепленных клеток, их морфологии, жизнеспособности и распределению по поверхности образца Оптимальное время прикрепления мезенхимальных стволовых клеток и фибробластов к культуральному пластику составило - 120 мин (Рис 1) За это время клетки полностью прикреплялись к субстрату и начинали распластываться

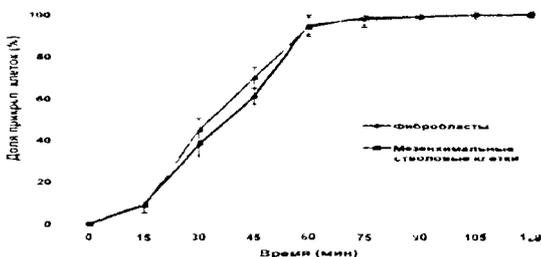


Рис 1 Кинетика прикрепления клеток к подложке

Затем образцы помещали в 24-луночные пластины, на их поверхность наносили по 100 мкл суспензии клеток из расчета 50 тысяч на образец Через 120 минут образцы промывали культуральной средой, освобождаясь от не прикрепившихся клеток, и переносили на новые пластины со свежей средой. Через

24 часа количество клеток на образцах оценивали с помощью МТТ-теста и стандартного подсчета в камере Горяева после снятия клеток с образцов раствором трипсина

Для *по клеточного метода оценки жизнеспособности in situ* применяли окрашивание флуоресцеиндиацетатом и бромистым этидием (ФДА-ЭБ). ФДА – гидрофобное нефлуоресцирующее соединение, легко проникающее через клеточную мембрану внутрь клеток, где метаболизируется цитоплазматическими эстеразами до флуоресцеина, обладающего зеленой флуоресценцией. Флуоресцеин не проходит через неповрежденные мембраны и сохраняется в цитоплазме клеток с целостной мембраной. Бромистый этидий используется для визуализации погибших клеток, проникает в них через поврежденную цитоплазматическую мембрану и связывается с ДНК клеточного ядра. Флуоресцирует в красной области спектра. Клетки высевали на образцы по 50 тысяч, культивировали в течение суток, затем инкубировали в течение 5 мин при 37° С в 1мг/мл ФДА, 25мг/мл бромистого этидия. В последующем образцы промывали 2 раза культуральной средой, просматривали на флуоресцентном микроскопе Jenalunar (объектив x 25) при длине волны возбуждения флуоресценции 450 нм и запирающим фильтром G 247. Изображение документировали с помощью цветной CCD телекамеры Sanyo 6975

Для визуализации клеток, оценки их морфологии и плотности заселения образцов, использовали также окрашивание прикреплённых клеток акридиновым оранжевым. Акридиновый оранжевый, взаимодействуя с нуклеиновыми кислотами образует с ДНК комплексы, люминесцирующие зеленым, а с РНК красным. Клетки высевали на образцы плотностью 25 тысяч/образец, культивировали в течение суток, дважды промывали культуральной средой без сыворотки, фиксировали 10% водным раствором формалина в течение 15 мин. при комнатной температуре. Далее образцы дважды отмывали культуральной средой, окрашивали раствором акридинового оранжевого (0,1 мг/мл) в фосфатно-солевом буфере (PBS), промывали PBS и просматривали на флуоресцентном микроскопе Opton (объектив X10) при длине

волны возбуждающего света 450 нм Изображение фиксировали с помощью системы видеодокументирования Kodak MDS-290.

Эффективность пролиферации клеток на образцах оценивались по количеству клеток, их морфологии и характеру распределения по поверхности образцов Количество клеток, выращенных на тестируемых образцах, оценивалось двумя способами прямым подсчетом в камере Горяева и с помощью МТТ-теста. Производили калибровочную оценку зависимости оптической плотности элюата (МТТ-тест) от количества мезенхимальных стволовых клеток, подсчитанных в камере Горяева

Получение мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга крыс

Мезенхимальные стволовые клетки получали из костного мозга крыс. Выделение мезенхимальных стволовых клеток производили из эпифизов берцовых костей, взятых под эфирным наркозом у взрослых крыс (линия Wistar) Выделенные кости промывали в среде с большим количеством антибиотиков. Для выделения из костного мозга мезенхимальных стволовых клеток использовали механическую и энзиматическую дезагрегацию На каждые 10^6 костно-мозговых клеток приходилось не более 3 мезенхимальных стволовых клеток Полученную суспензию клеток центрифугировали 5 мин при 1500 тыс. об/мин. Фракционирование МСК проводили в градиенте плотности 70% перкола Суспензия МСК находилась в самой легкой фракции Суспензию клеток дважды промывали средой и осаждали центрифугированием Производили подсчет количества выделенных костномозговых клеток и полученную суспензию клеток помещали в пластиковые одноразовые флаконы площадью 25 см^2 («Nunk», Дания) из расчета порядка 10^5 клеток на 1 см^2 поверхности культурального матраса. Клетки культивировали на среде DMEM с добавлением 10% ЭТС и 2% Ultraser G («Gibco BRL») при 37°C в CO_2 - инкубаторе с 5% CO_2 в условиях насыщающей влажности. Смену среды производили каждые три дня. При достижении плотного монослоя культуру рассеивали 1:3, используя стандартные растворы Версена и трипсина Морфологическое состояние растущих клеток оценивали с помощью инвертированного микроскопа («Opton», Германия)

Индукция остеогенной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток

Для индукции остеогенной дифференцировки использовали основной фактор роста фибробластов (ФРФ) (Sigma, США) в концентрации 20 нг/мл и дексаметазон (Dex) (Sigma, США) в концентрации 10^{-8} М

Оценка остеогенной дифференцировки клеток по интенсивности минерализации и с помощью окраски на щелочную фосфатазу

Цитохимическое выявление щелочной фосфатазы проводили с использованием нафтол-AS-фосфата и прочного синего РР по стандартной схеме (Терехова С М, Гринберга К.Н., Черникова В Г., Гецадзе Х А. 1984). Осаждение минерала в матриксе регистрировали по методу Косса. Клетки обрабатывали раствором 1%-водного азотнокислого серебра в течение 20 мин, промывали водой и фиксировали 2,5% раствором тиосульфата натрия

Изучение организации клеточного слоя на поверхности тестируемых материалов методом сканирующей электронной микроскопии

Образцы полимеров, с расположенными на их поверхности клетками, после 14 дней культивирования фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида на 0,13 М какодилатном буфере с рН=7,4. Затем их дофиксировали 2% раствором OsO_4 , обезвоживали и высушивали методом перехода критической точки на аппарате «Hitachi HCP-2». Препараты наклеивали с помощью токопроводящего клея на столики, напыляли медью в атмосфере аргона на приборе «Balzers SCD 040» и исследовали в сканирующем электронном микроскопе «Philips SEM-515».

Методика экспериментальной оценки остеоннтегративных свойств имплантатов из композитов

Экспериментальные исследования были проведены на двух видах лабораторных животных крысах и кроликах.

Опыты на крысах В опыт было взято 48 крыс-самцов Вистар весом 180 - 220 грамм Под гексеналовым наркозом в асептических условиях делали полулунный разрез кожи головы Поднакостнично укладывали образец полимера с заселенными клетками, направленными в сторону теменной кости Использовали образцы группы ПА-12 и СВМПЭ. В опытных группах использовали образцы с живыми клетками, а в контрольной – клетки, убитые этанолом. Животных выводили из опыта через 15 суток, 1 месяц и 2 месяца после операции.

Опыты на кроликах

Материалом для изготовления имплантатов для кроликов были те же композиты, что и у крыс - образцы композитов группы ПА-12 и образцы группы СВМПЭ Экспериментальные образцы были заселены МСК и индуцированы к остеогенной дифференцировке в течение 2 недель.

В эксперименте было использовано 48 половозрелых кроликов «шиншилла» весом около 3 кг, Под гексеналовым наркозом обнажали угол и ветвь челюсти. В области угла челюсти с помощью фрезы, при малых оборотах с постоянным охлаждением физиологическим раствором, создавали дефект. Дефект закрывали одним из имплантатов, который фиксировали по краям к кости с помощью титановых шурупов через заранее приготовленные отверстия В опытных группах использовали на образцах живые клетки, в контрольной – клетки, убитые этанолом. Животных выводили из опыта через 1,2 и 4 месяца после операции. Фиксированные фрагменты челюстей изучали методом сканирующей электронной и световой микроскопии.

Изучение остеонтегративных свойств и клеточных реакций тестируемых материалов методом сканирующей электронной и световой микроскопии

Методика сканирующей электронной микроскопии (СЭМ)

Исследовали теменные кости крыс в участках, прилежащих к поверхности образцов из полиамида-12 и СВМПЭ Теменные кости крыс вместе с имплантатами фиксировали в нейтрализованном 4% растворе формальдегида в течение 3 суток. Фиксированные образцы помещали в холодный 5-10% раствор

гипохлорита натрия марки А (ГОСТ 11086-76) (Boyd et al 1974) для деорганификации Образцы высушивали на воздухе, приклеивали на столики токопроводящим клеем (Watford, England), напыляли медью или золотом в напылителе Balzers SCD 040 (Лихтенштейн) в атмосфере аргона. Исследование всех образцов проводили в микроскопе Philips SEM-515 (Голландия) при ускоряющем напряжении 15 kv

Методика световой микроскопии

Фрагменты теменной кости и нижней челюсти кроликов с имплантатами фиксировали в 4% нейтрализованном растворе формальдегида в течение 1 недели Образцы ткани помещали в Трилон Б для декальцинации, обезвоживали и заливали в парафин по стандартной схеме (Волкова О.В и др 1982) Срезы окрашивали гематоксилин-эозином

Статистическая обработка данных

Обработка полученных результатов проведена на компьютере IBM PC Pentium IV с использованием пакета прикладных программ. Данные обрабатывали с помощью метода вариационной статистики - программы Statistica. Вычислялась средняя арифметическая, ошибка средней арифметической (m), коэффициент достоверности существующей разницы (t) и вероятность ошибки (p) Цифровые данные, полученные в ходе исследований, подвергались статистической обработке с использованием t -критерия Стьюдента для сравнения средних величин, определения погрешности измерений и достоверности различий параметров между исследуемыми группами Различия между группами считали достоверными при $p \leq 0,05$

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для достижения поставленной цели представлялось необходимым решение двух групп задач. Первая задача включала оценку поверхности разных по химическому составу и физическим свойствам биостабильных полимеров,

цитотоксичности по отношению к фибробластам и стволовым клеткам человека, их способности к пролиферации и дифференцировки В эту же группу задач входила оценка характеристики CD-профиля выделенных МСК. Без научного обоснования возможности применения полимеров для заселения их поверхности МСК и идентификации нельзя было решить основные задачи, заключающиеся в формировании слоя молодых костных клеток (и костных клеток-предшественников) на композитах для их испытания в качестве имплантационного материала при замещении костных дефектов и стимулирования их заживления в эксперименте.

Характеристика рельефа поверхности образцов композитов и влияние на них органических растворителей

Было показано, что рельеф поверхности образцов полимеров ПА-12 и СВМПЭ достаточно гладкий и имеет участки с доступными для клеток открытыми частицами ГАП. По сравнению со СВМПЭ рельеф поверхности образцов из ПММА оказывается значительно более неровным. Различия в структуре поверхности материалов обусловлено особенностями технологии изготовления пластин для исследования. Устойчивость к воздействию на полимеры кислот также оказалась выше для ПА-12 и СВМПЭ по сравнению с ПММА. При подготовке поверхности образцов с целью изучения МСК костного мозга, мы использовали этиловый спирт, так как он не приводит к выраженному растворению полимеров, что было показано с помощью электронной сканирующей микроскопии.

Цитотоксичность полимеров и эффективности прикрепления клеток к их поверхности

Полученные нами данные показали, что выделенные по обычному протоколу клетки оказались положительными по CD 90 и CD 44 (молекула адгезии), CD 54 (ICAM-1) экспрессировали непостоянно. Клетки не экспрессировали CD 31, CD 34, CD 62l, CD 62e, CD 117, HLA-DR, CD 71. Незначительная доля клеток несла на поверхности CD 105. По данным (Tuli et

al., 2003; Zikuan et al., 2001) клетки положительные по CD 44 и отрицательные по CD 34 и HLA-DR могут быть отнесены к МСК костного мозга. Эти данные подтвердили фенотипическую принадлежность используемых в нашей работе клеток.

Анализ полученных результатов показал, что исследуемые композиты в культуре не оказывают цитотоксического действия ни на фибробласты, ни на мезенхимальные стволовые клетки. Об этом свидетельствует отсутствие статистически достоверных отличий между группами образцов и контролем (рис.2).

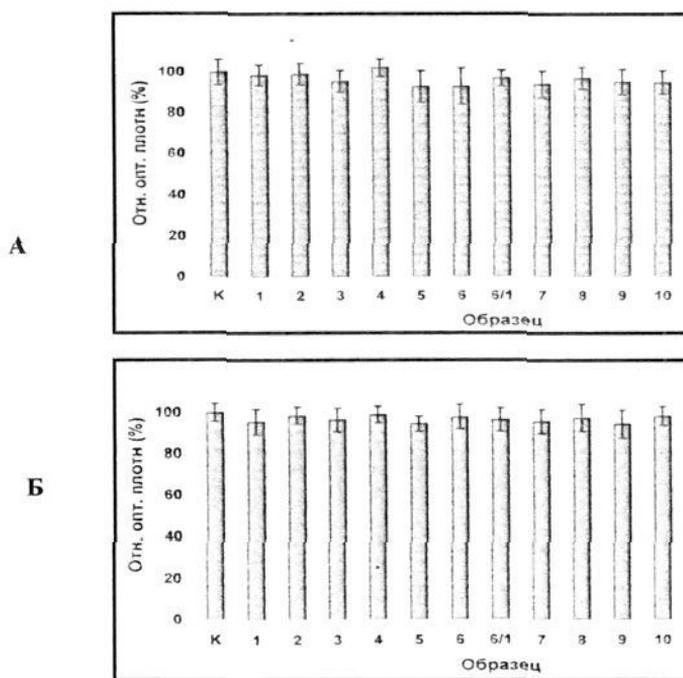


Рис. 2. Относительные оптические плотности элюата для каждого образца. А – фибробласты. Б – мезенхимальные стволовые клетки.

При оценке эффективности прикрепления фибробластов и мезенхимальных стволовых клеток к поверхности образцов выявлено, что более высокие показатели наблюдались на образцах из ПА-12 и СВМПЭ, тогда как на образцах из ПММА их значения были существенно ниже и не превышали 60%

относительно контроля Результаты стандартного подсчета в камере Горяева количества клеток, снятых с каждого образца (представлены в таблице 2) и данные по оценке количества клеток на образцах при помощи МТТ-теста дали сходные результаты Следует отметить одинаковую направленность изменения показателей при исследовании реакции на полимеры фибробластов и мезенхимальных стволовых клеток

Таблица 2

Результаты подсчета в камере Горяева количества клеток, снятых с каждого образца при оценке эффективности их прикрепления.

№ образца Клетки (x 10)	1	2	3	4	5	6	6/1	7	8	9	10
Фибробласты	44	41	41	43	43	29	42	30	41	39	41
МСК	47	39	43	39	46	28	38	31	42	36	40

При оценке жизнеспособности клеток *in situ* с помощью окрашивания ФДА-ЭБ на поверхности всех исследованных образцов регистрировались единичные погибшие клетки. Во всех образцах Полиамида-12 и СВМПЭ клетки располагались равномерно по поверхности полимеров, а в случае образцов из группы ПММА формировали тяжи.

Эффективность пролиферации клеток и организации клеточного слоя на поверхности полимеров

При изучении влияния образцов на эффективность пролиферации фибробластов и мезенхимальных стволовых клеток суммировали результаты трех независимых экспериментов по подсчету количества клеток в камере Горяева и по МТТ-тесту На рисунке 3 приведены результаты экспериментов по подсчету количества фибробластов в камере Горяева на 7-е и 14-е сутки культивирования на поверхности тестируемых образцов Самые высокие показатели прироста фибробластов наблюдались на образцах 1, 2, 5, 8, 10, а самые низкие - на образцах 6 и 7 На рисунке 4 представлены данные по оценке эффективности пролиферации фибробластов по МТТ-тесту Сохраняются основные тенденции изменения показателей пролиферации, выявленные при прямом подсчете количества клеток: на образцах 6 и 7 самые низкие показатели прироста клеток, на образцах 1, 2, 5, 8 – самые высокие При определении

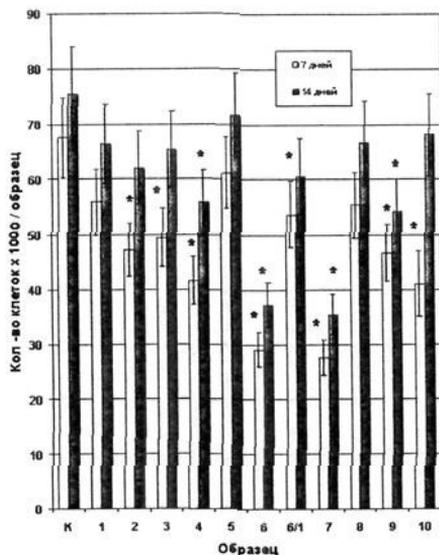


Рис. 3. Эффективность пролиферации фибробластов. Подсчёт числа клеток в камере Горяева. Знаком * отмечены образцы, в которых значения количества клеток достоверно ниже контрольного ($P < 0,05$).

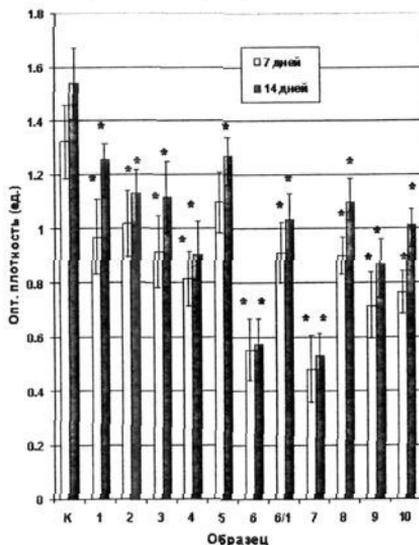


Рис. 4. Эффективность пролиферации фибробластов. МТТ-тест. Знаком * отмечены образцы, в которых значение оптической плотности достоверно ниже контрольного ($P < 0,05$).

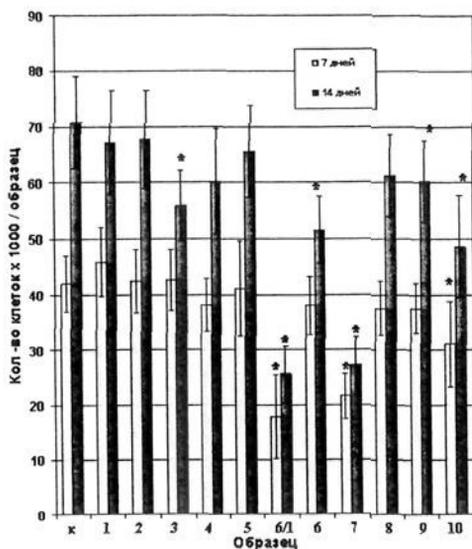


Рис. 5. Эффективность пролиферации мезенхимальных стволовых клеток. Подсчёт числа клеток в камере Горяева. Знаком * отмечены образцы, в которых значение количества клеток достоверно ниже контрольного ($P < 0,05$).

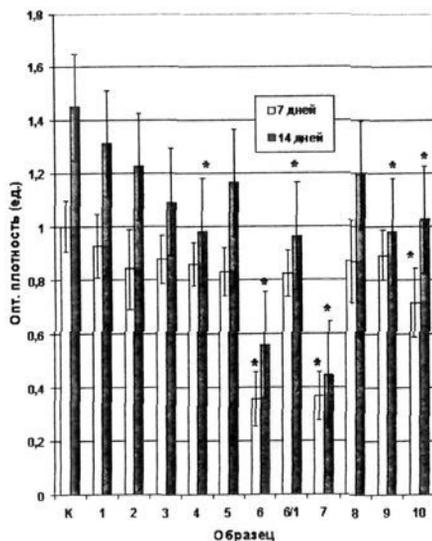


Рис. 6. Эффективность пролиферации мезенхимальных стволовых клеток. МТТ-тест. Знаком * отмечены образцы, в которых значение оптической плотности достоверно ниже контрольного ($P < 0,05$).

эффективности пролиферации мезенхимальных стволовых клеток на 7-е и 14-е сутки как при прямом подсчете в камере Горяева, так и по МТТ-тесту самые высокие показатели прироста клеток наблюдались на образцах 1,2,5 (ПА-12) и 8,10 (СВМПЭ), а самые низкие - на образцах 6 и 7 (ПММА) (рис.5,6) Эти данные в целом соответствуют результатам, полученным при использовании фибробластов. В то же время выявлено различие в скорости роста фибробластов и мезенхимальных стволовых клеток. Так, на 7 сутки количество фибробластов достигало более высоких значений по сравнению с мезенхимальными стволовыми клетками, а к 14-м суткам культивирования количество клеток выравнивалось. Это может быть объяснено эффектом контактного торможения при формировании полного монослоя. Исследование методом СЭМ (рис.7) поверхности образцов из ПА-12 и СВМПЭ показывает, что после 7 суток культивирования обычно МСК расположены в один слой, резко уплощены, имеют полигональную форму (7а). Тыльная поверхность таких клеток гладкая, но чаще на ней выявляется различное количество коротких микроворсинок (рис 7б). Встречаются клетки, находящиеся в состоянии митоза (рис 7в) Их очертания более округлые, а рельеф тыльной поверхности микроворсинчатый. Как правило, тела клеток и их отростки переплетаются, образуя почти непрерывный слой. На поверхности этих композитов не выявляется открытых для клеток областей с ГАП, что, по-видимому, объясняет отсутствие прироста клеток в процессе их пролиферации по сравнению с контролем.

На неровной поверхности образцов из ПММА клеточный слой более рыхлый и имеет разрывы, в которых прослеживаются шарообразные структуры композита (7г), при этом отростки клеток проникают в пространство между гранулами

В образцах ПММА, содержащих кристаллы ГАП, скопления кристаллов находятся на поверхности, они доступны для клеток, которые создают значительный слой в ГАП содержащих участках композита. Тела МСК расположены на некотором расстоянии друг от друга

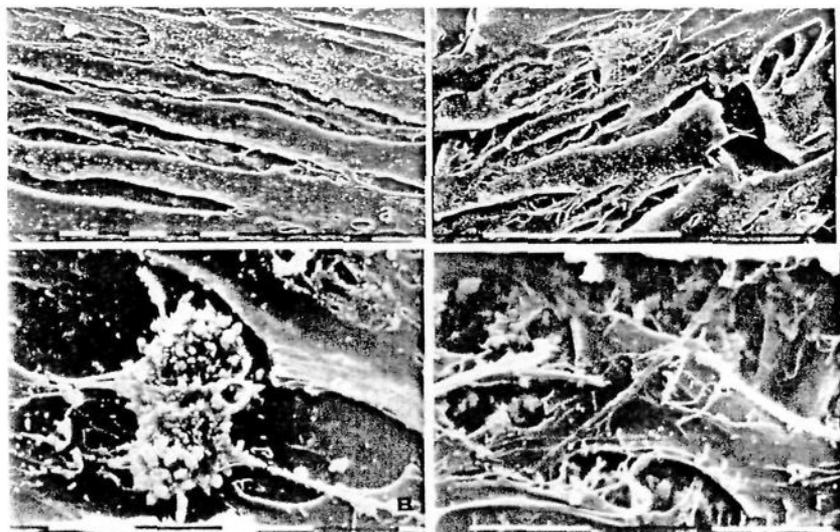


Рис.7. а.- Резко уплощенные мезенхимальные стволовые клетки на поверхности образца из полиамида-12 на 7 сутки культивирования. СЭМ. Метка: 100 мкм;
 б.- Различное количество коротких микроворсинок на тыльной поверхности мезенхимальных стволовых клеток в образце из полиамида-12 +углеволокно + ГАП + ПВП на 7 сутки культивирования. СЭМ. Метка: 10 мкм;
 в.- Клетка в состоянии митоза на поверхности образца из полиамида-12 +углеволокно + ГАП на 7 сутки культивирования. СЭМ. Метка: 10 мкм;
 г.-Содержащие ГАП участки под мезенхимальными стволовыми клетками на поверхности образца из не модифицированного ПММА + ГАП на 7 сутки культивирования. СЭМ. Метка: 10мкм.

Через 14 суток культивирования основные закономерности организации клеток на поверхности образцов сохраняются. Однако клетки более плотно упакованы и часто расположены в несколько слоев. Митозы встречаются несколько реже, чем на сроке 7 суток.

Цитогенетическое обоснование применения мезенхимальных стволовых клеток на композитных материалах для оптимизации репаративной регенерации костной ткани

Результаты лабораторного этапа исследования послужили основой для уточнения протокола индукции остеогенной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток на композитах и их испытания как средств замещения костных дефектов и стимулирования заживления в эксперименте.

Индукция остеогенной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток на композиционных материалах

Клетки, полученные из костного мозга крысы, имели фибробластоподобную морфологию, длинные, нередко разветвляющиеся отростки, располагались небольшими группами, контактируя между собой. Они характеризовались выраженной способностью к остеогенезу, которая проявлялась при внесении в среду основного фактора роста фибробластов в концентрации 20 нг/мл и дексаметазона в концентрации 10^{-8} М в качестве индуктора.

Первые признаки остеогенной дифференцировки (позитивное окрашивание на щелочную фосфатазу) обнаруживались на 21-е сутки после внесения индуктора. В ходе дальнейшего культивирования эти признаки усиливались, и на 28-е сутки отмечалось значительное окрашивание на щелочную фосфатазу, также появление зон положительной импрегнации серебром по методу Косса. В это же время отмечалось появление остеогенных узелков, представляющих собой трехмерные клеточные агрегаты, вокруг которых активность щелочной фосфатазы и интенсивность окрашивания по методу Косса были максимальными.

Остеоинтегративные свойства заселенных мезенхимальными стволовыми клетками образцов полимеров на модели поднадкостничного введения в теменную кость крысы

С учетом апробации композитов, заселенных МСК, целесообразно использовать материалы, показавшие наилучшие результаты по показателям эффективности прикреплению и пролиферации клеток, в эксперименте на животных. Это были модифицированные ПА-12 и СВМПЭ.

Экспериментальные исследования на крысах показали, что процессы остеointеграции образцов полимеров с поверхностью теменных костей отсутствовали как в контрольном материале (образцы с убитыми МСК), так и в эксперименте (образцы, заселенные живыми МСК с индукцией остеогенной

дифференцировки в течение 2 недель) Несмотря на то, что остеогенные резервы резко повышаются после операции, на примере теменной модели на крысах эти процессы не выявлены Можно полагать, что причиной этого являются неполноценная фиксация образцов с костной поверхностью и отсутствие костной травмы

Изучение интегративных свойств заселенных мезенхимальными стволовыми клетками образцов полимеров на модели нижней челюсти кролика

Проведенное экспериментальное исследование на кроликах показало наличие признаков костно-фиброзной интеграции имплантатов, выявленных при их фиксации в область дефекта челюсти, как у экспериментальных, так и контрольных образцов Костный компонент интеграции обусловлен прямым контактом минерализованных костных структур с поверхностью композитов На признаки фиброзной интеграции указывает щель между имплантатами и костными структурами, по краю которой выявляются многочисленные прободающие волокна, расположенные параллельно прилежащей поверхности имплантатов Выраженность костной интеграции возрастала с увеличением продолжительности эксперимента Количество участков прямого контакта костных структур с поверхностью композита, а также количество новообразованных трабекул на ее поверхности оказалось больше в образцах, заселенных живыми МСК, чем в контроле. Закрытие дефекта, нанесенного на угол нижней челюсти, происходило быстрее и более полно при использовании имплантатов, заселенных живыми МСК, чем в контроле.

Отмеченная интеграция с костными структурами титановых винтов, фиксирующих имплантаты к челюсти, выражалась лучше при использовании образцов композитов, заселенных живыми МСК, чем в контроле Размеры наростов на наружную и торцевую поверхность имплантатов, а также количество участков их прямого контакта с поверхностью композита отмечалось больше в образцах, заселенных живыми МСК, чем в контроле Наряду с титановыми винтами и участками интеграции кости с поверхностью

полимеров, костные наросты являются дополнительным механизмом фиксации имплантатов в тканях

ВЫВОДЫ

- 1 В патогенетическом механизме формирования слоя остеогенных клеток из МСК (мезенхимальных стволовых клеток) на композитах важная роль принадлежит их химическим свойствам, наличию в составе ГАЦ, а также структуре поверхности.
2. Разработан протокол технологии заселения МСК, нанесенных на биостабильные композиты, который включает следующие этапы: исследование композитного материала на токсичность, идентификацию клеток с использованием специфических маркеров, оценку жизнеспособности и пролиферативной активности клеток, способность к остеогенной дифференцировке, экспериментальное изучение остеоинтегративных свойств. Выполнение протокола является условием предклинической апробации биостабильных имплантационных материалов с клетками-предшественниками костной ткани на поверхности.
3. Биостабильные композиционные материалы: ПА-12, ПММА, СВМПЭ, применяемые в качестве заменителей костной ткани, не обладают цитотоксичностью по отношению к постнатальным фибробластам и МСК человека и пригодны для заселения клеток-предшественников
- 4 Структура и рельеф поверхности композитных материалов оказывает существенное влияние на характер прикрепления и распределения на них фибробластов и МСК. На поверхности биостабильных композитов МСК сохраняют жизнеспособность и способность формировать плотный монослой клеток-предшественников.
5. Равномерность и плотность заселения МСК зависит от пористости образцов и оказывается выше на поверхности композитных материалов, имеющих поры мелкого и среднего размера. На образцах с крупными порами клетки не образуют монослоя МСК, размещенные и культивированные на образцах всех

модифицированных видах композитов ПА-12,СВМПЭ И ПММА, сохраняют нормальную жизнеспособность.

6. Введение синтетического ГАП в состав композиционных материалов приводит к увеличению пролиферативного потенциала МСК на поверхности. По способности создавать оптимальные условия для культивирования и развития МСК композиты, имеющие в своем составе синтетический ГАП, можно расположить по убывающей степени в следующем порядке: ПА -12, СВМПЭ, ПММА
7. Количество культивируемых МСК на поверхности образцов из СВМПЭ ниже по сравнению с ПА-12 и выше чем на поверхности ПММА Число культивируемых МСК на поверхности образцов из ПММА по абсолютным показателям ниже по сравнению с ПА-12 и СВМПЭ
8. Формирование коллагена I типа, выявление щелочной фосфатазы и образование минерализованных костных узелков на поверхности композитов к 21-м суткам культивирования МСК доказывает остеодифференцировку клеток
- 9 В патогенезе репаративного остеогенеза важная роль принадлежит клеткам – предшественникам из МСК, нанесенных на композитные материалы, ускоряет их интеграцию с костной тканью челюсти в области создания искусственного дефекта в эксперименте на кроликах. Обязательным условием хорошей остеоинтеграции является плотная фиксация имплантата к кости, микроподвижность препятствует проявлению остеоинтегративных свойств композитов

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

- 1 Исследуемые биостабильные композиционные материалы, применяемые в качестве заменителей костной ткани, могут быть рекомендованы для заселения МСК человека с целью оптимизации остеогенеза.
2. Выполнение протокола технологии заселения поверхности биостабильных композитов клетками-предшественниками костной ткани человека является условием их практического применения в травматологии и челюстно-

лицевой хирургии при замещении костных дефектов и устранении деформаций.

- 3 При выборе композиционного материала для костной пластики с использованием клеточных технологий следует отдавать предпочтение композиту ПА-12, на поверхности которого происходит активное развитие МСК человека, способных к остеогенной дифференцировке. Несколько отстает от модифицированного композита ПА-12 по этим свойствам СВМПЭ. Композит на основе ПММА можно рекомендовать к использованию в качестве носителя клеток–предшественников костной ткани после удаления из него веществ, препятствующих прикреплению и пролиферативной активности клеток.
- 4 Условием хорошей остеоинтеграции имплантата с заселенными на поверхности костными клетками-предшественниками является его прочная фиксация к кости в области дефекта, отсутствие надежного соединения исключает проявление остеоинтегративных свойств композитов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Патент на изобретение № 2259851. Приоритет изобретения 24 июня 2004 г. “Способ определения *in vitro* остеointegrативных свойств пластических материалов для имплантантов” Авторы: Лосев Ф Ф, Денисов-Никольский Ю И., Докторов А.А, Матвейчук И в, Жилкин Б А, Терехов С.М, Воложин А.И, Татаренко-Козмина Т.Ю, Матвеева В.Н.
2. Денисов-Никольский Ю И, Лосев Ф Ф, Татаренко-Козмина Т Ю, Матвеева В.Н, Докторов А.А, Дружинина Р А, Воложин А И. Оценка цитотоксичности разных биостабильных композитов, применяемых в костной пластике Сборник научных трудов Башкирской Государственной академии. Т.3, № 1, 2004. С.25-26
3. Воложин А.И, Лосев Ф Ф., Татаренко-Козмина Т Ю., Денисов-Никольский Ю И, Матвеева В Н, Докторов А.А, Дружинина Р.А, Матвейчук И.В., Жилкин Б.А. Трансплантация мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на биостабильные композиты как метод усиления остеointegrативной активности. Третий российский Конгресс с международным участием 60-летию Российской академии медицинских наук посвящается ”Дизрегуляционная патология органов и систем”. Сб. материалов съезда. Москва, 9-12 ноября 2004 С 222.
4. Татаренко-Козмина Т.Ю, Порадовская Т П., Кудинова В.Ф, Павлова Т Е. Исследование жизнеспособности мезенхимальных стромальных клеток костного мозга – предшественников остеобластов на биостабильных композитах. Сборник научных работ Сибирского государственного медицинского университета “Естествознание и гуманизм”. Томск, 2005,Т 2, № 2 С.19.
5. Татаренко-Козмина Т Ю. Культивирование фибробластов и мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на биостабильных полимерах. Международная конференция “Современные наукоемкие технологии” Египет, Хургада, 21-28 февраля 2005 года. Журнал “Успехи современного естествознания”, № 3, 2005. С.117.
6. Воложин А И, Лосев Ф Ф, Татаренко-Козмина Т Ю., Матвеева В Н. Оценка жизнеспособности мезенхимальных стромальных клеток на биостабильных композитах, используемых в остеопластике. Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Материалы XIII Международной конференции и дискуссионного научного клуба. Украина, Крым, Гурзуф. 8-13 мая 2005 года. С. 90-91.
7. Воложин А И, Денисов-Никольский Ю И, Татаренко-Козмина Т Ю, ЛосевФ Ф, Матвеева В Н., Докторов А.А, Терехов С М., Дружинина Р.А., Матвейчук И В, Жилкин Б Н, Краснов А.П. Создание имплантационных материалов нового поколения на основе биостабильных композитов с костными клетками, полученными из стромальных клеток костного мозга. I Московский научный форум. 5-я научно - практическая конференция “Московская наука – проблемы и перспективы ” Материалы форума Сентябрь 2005 года. С. 32-34
8. Татаренко-Козмина Т Ю Перспективы использования клеточных технологий в создании костной ткани на синтетических биостабильных композитах.

- Материалы третьей международной конференции “Болезни цивилизации в аспекте учения В И Вернадского” Москва, 10-12 октября 2005 года. С 312-315.
- 9 Воложин А.И, Денисов-Никольский Ю И, Татаренко-Козмина Т.Ю, Лосев Ф.Ф., Матвеева В Н, Докторов А А, Дружинина Р А, Матвейчук И В, Жилкин Б А. Клеточные технологии в создании новых материалов для костной пластики Материалы третьей международной конференции ”Болезни цивилизации в аспекте учения В И.Вернадского”. Москва, 10-12 октября 2005 года. С 35-37
 - 10.Воложин А И, Татаренко-Козмина Т.Ю, Матвеева В Н. Стволовые клетки: перспективы применения в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Журнал “Cathedra” № 2 (14), 2005 С 54-58.
 - 11.Воложин А И., Докторов А А., Татаренко-Козмина Т.Ю, Матвеева В Н. Технология формирования стволовых мезенхимальных клеток-источника костных клеток на синтетических остеопластических композитных материалах. Журнал “Cathedra” № 3 (15), 2005.С.70-71.
 - 12 Лосев Ф.Ф, Воложин А И, Татаренко-Козмина Т.Ю, Денисов-Никольский Ю И, Матвеева В.Н, Докторов А.А., Терехов С.М, Дружинина Р.А., Матвейчук И.В., Жилкин Б.А., Воложин Г А. Стромальные мезенхимальные клетки-источник создания костной ткани для повышения эффективности дентальной имплантологии (ближайшие и отдаленные перспективы). Журнал “Российский вестник дентальной имплантологии” № ½ (9/10), 2005.С. 38-43.
 - 13.Денисов-Никольский Ю И, Лосев Ф.Ф., Докторов А.А., Воложин А.И, Терехов С.М, Матвейчук И В, Жилкин Б А., Татаренко-Козмина Т Ю Применение мезенхимальных стволовых клеток для усиления интегративных свойств имплантационных материалов на основе композитов пластмасс. Журнал “Здравоохранение ” № 8 (22), 2005.С.27.
 - 14 Татаренко-Козмина Т Ю., Матвеева В.Н. Роль современных биостабильных композитов в сочетании с клеточными технологиями в репарации костных дефектов Журнал РАЕН «Фундаментальные исследования» № 3, 2006 С. 41-42
 - 15.Воложин А.И., Татаренко-Козмина Т.Ю., Денисов-Никольский Ю И., Лосев Ф.Ф, Мальгинов Н Н, Докторов А А Возможности применения стволовых мезенхимальных клеток костного мозга в стоматологии. В кн.: Актуальные вопросы стоматологии Материалы межрегиональной конференции, посвященной 100-летию создания Саратовского одонтологического общества 2006 С.113-114
 - 16 Воложин А.И, Денисов-Никольский Ю И, Лосев Ф.Ф., Докторов А А, Татаренко-Козмина Т.Ю, Мальгинов Н Н, Холодов С.А Оптимизация костной регенерации с помощью стволовых клеток-предшественников остеобластов, фиксированных на композитных материалах. Журнал “Cathedra”.Том 5 № 1, 2006 С.37-42.
 17. Воложин А И., Денисов-Никольский Ю.И, Лосев Ф.Ф,Докторов А А ,Татаренко-Козмина Т.Ю.,Матвеева В Н, Холодов С В., Вольперт У В. Применение мезенхимальных стволовых клеток для придания

- остеоинтегративных свойств имплантационным материалам Материалы Всероссийской и международной конференции «Стволовые клетки и перспективы их использования в здравоохранении» 24-25 мая 2006, Москва, РАМН, РГМУ С. 56-58
- 18 Татаренко-Козмина Т Ю. Испытания цитотоксичности синтетических полимеров, как носителей мезенхимальных клеток костного мозга. **Сб. материалов международной научной конференции «Высокие медицинские технологии XXI века» Испания, Бенидорм 29 октября-4 ноября 2006 С 28-29**
- 19 Денисов-Никольский Ю И , Татаренко-Козмина Т Ю , Воложин А.И , Лосев В Ф , Лосев Ф Ф., Докторов А.А , Мальгинов Н Н., Холодов С В , Вольперт У.В , Фролова Е Н. Технология применения мезенхимальных стромальных клеток для усиления остеоинтеграции имплантационных материалов. **Сб. материалов международной научной конференции «Высокие медицинские технологии XXI века» Испания, Бенидорм 29 октября-4 ноября 2006 С 29.**
- 20 Татаренко-Козмина Т.Ю , Де Хи Чер, Воложин А.И Характеристика CD-профиля мезенхимальных стромальных клеток из челюсти человека. **Международная конференция Греция октябрь 2005 Журнал «Фундаментальные исследования», № 3, 2006. С 115**
- 21 Де Хи Чер, Т.Ю Татаренко-Козмина Т Ю. Особенности поверхностных маркеров мезенхимальных стромальных клеток взятых из верхней челюсти человека Актуальные проблемы стоматологии М, 2006. С.75- 76.
- 22 Т.Ю.Татаренко-Козмина, А И.Воложин, Т П Порадовская, В Ф Кудинова, Т.Е Павлова Влияние биостабильных нерезорбируемых композитов на жизнеспособность мезенхимальных стромальных клеток костного мозга В сб научных трудов «Методологические и социальные проблемы медицины и биологии» Вып № 14. 2006 С 135
- 23 Татаренко-Козмина Т.Ю , Матвеева В Н., Лосев В Ф , Холодов С В., Мальгинов Н Н. Применение мезенхиальных стромальных клеток нанесенных на композиционные материалы для оптимизации регенерации костной ткани. **«Патологическая физиология и экспериментальная терапия», 2007. № 1.С. 8-10**
- 24 Докторов А А , Денисов-Никольский Ю И., Воложин А И , Лосев Ф Ф., Терехов С.М ,Татаренко-Козмина Т Ю , Жилкин Б А ,Матвейчук И.В , Мальгинов Н Н,Тетюхин Д В , Вольперт У.В,Фролова Е Н , Янушевич О.О.Пролиферативные потенции мезенхимальных стволовых клеток костного мозга на поверхности титана и золота Матер Британско-Российского совещания в сотрудничестве с Европейской Комиссии **«Стволовые клетки: законодательство, исследования и новации. Международные перспективы сотрудничества» 15-16 марта 2007, г.Москва С 1-5**

Список используемых сокращений:

ПА-12 – полиамид-12
СВМПЭ – сверхвысокомолекулярный полиэтилен
ПММА - полиметиметакрилат
ГАП- гидроксипатит
ПВП- поливинилпирролидон
ПАК- полиакриловая кислота
МСК- мезенхимальные стволовые клетки
Дек - дексаметазон
FGF (ФРФ)- фактор роста фибробластов
VEGF-фактор роста сосудов
ВМП- морфогенетические белки
TGF- β s-трансформирующий фактор роста
НБК- неколлагеновые белки костной ткани
CD 29 – молекула адгезии, рецептор фибронектина
CD 44 – молекула адгезии, рецептор гиалуроновой кислоты
CD 166 – молекула адгезии ALCAM
CD 105 – эндоглин, белок внеклеточного матрикса
CD 144 – VE-cadherin
Ulex europaeus- маркер эндотелиальных клеток
CD 34 – GРIИb, присутствует на гемопоэтических стволовых клетках и клетках-предшественниках, а также на эндотелиальных клетках
CD 45 – присутствует на белых клетках крови
HLA-DR – присутствует на антиген-презентирующих клетках и активированных Т-клетках
CD 31 – маркер гемопоэтических и эндотелиальных клеток
CD 54 – ICAM-1
CD 71 – рецептор трансферрина, маркер пролиферации
CD 117 – c-kit, SCFR
CD 90 – Thy-1
CD 62e – селектин E, маркер эндотелиальных клеток
CD 62l – селектин L, маркер эндотелиальных клеток
CD 106 – VCAM1

АННОТАЦИЯ

Татаренко-Козмина Татьяна Юрьевна (Россия)

Патофизиологические механизмы применения мезенхимальных стволовых клеток на синтетических композитах для оптимизации регенерации костной ткани.

Обоснованы патофизиологические механизмы применения биостабильных минералонаполненных композитов в качестве материала для заселения МСК с их последующей остеогенной дифференцировкой. Комплексно исследовано и установлено отсутствие цитотоксичности поверхности биостабильных композиционных материалов. ПА-12, ПММА, СВМПЭ по отношению к мезенхимальным стволовым клеткам. Показано существенное влияние структуры и рельефа поверхностей композитных материалов на характер прикрепления и пролиферации на них МСК. Определен рельеф поверхности биостабильных композитов для сохранения нормальной жизнедеятельности клеток и условия для формирования плотного монослоя клеток-предшественников, в том числе на ГАП-содержащих композитных материалах. Обосновано применение синтетических композитов с нанесенным слоем костных клеток-предшественников на поверхности имплантатов и ускорение их интеграции с костной тканью в области создания искусственного дефекта в эксперименте.

SUMMARY

Tatarenko-Kozmina Tatiana Yurievna (Russia)

Pathophysiological mechanisms of the application of mesenchymal stem cells on the synthetic composites for the osteogenesis optimization.

Pathophysiological mechanisms of the application of the biostatic mineral filled composites have been proved as the material for the colonization of the mesenchymal stem cells (MCS) with their further osteogenic differentiation. The absence of the cytotoxicity of the surface of biostatic composite materials PA-12 (polyamides-12), polymethylmethacrylate (PMMA), ultra-high molecular polyethylene (UHMPE) in relation to the mesenchymal stem cells (MCS) has been researched and reasoned. Considerable influence of the structure and of the surface relief of the composite materials on the character of the attachment and proliferation of the MCS on them has been demonstrated. The surface relief of biostatic composites for the preservation of normal life activity of the cells and the conditions for the formation of solid monolayer of the precursor cells have been determined, including those on hydroxyapatite (HAP)-containing composite materials. The application of the synthetic composites with the layer of bone precursor cells on the surface of the implants and the acceleration of their integration with the bone tissue in the area of artificial defect creation in the experiment have been reasoned.

Подписано в печать _____ Тираж 120 экз
Отпечатано в типографии «ГЕЛИОПРИНТ» Заказ № 430