



СОЗДАНИЕ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО ЭКВИВАЛЕНТА КОСТНОЙ ТКАНИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ТРАВМАТОЛОГИИ И ОРТОПЕДИИ

П.М. Ларионов¹, М.А. Садовой¹, А.Г. Самохин¹, О.М. Рожнова¹, А.Ф. Гусев¹, В.Я. Принц², В.А. Селезнев², С.В. Голод², А.В. Принц², И.А. Корнеев², А.И. Комонов², Е.В. Мамонова³, Ю.Н. Малютин⁴, В.А. Батаев⁴

¹Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна

²Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова

³Инновационный медико-технологический центр, Новосибирск

⁴Новосибирский государственный технический университет

Цель исследования. Анализ экспериментальных образцов тканеинженерного эквивалента костной ткани (ТЭКТ) на основе наноструктурированных биорезорбируемых синтетических полимерных клеточных матриц (БСПКМ) и остеогенных дифференцированных клеток для возмещения дефектов кости.

Материал и методы. Разработаны и получены наноструктурированные БСПКМ, которые послужили основой для создания ТЭКТ. Осуществлен перенос культивируемых клеток на поверхность БСПКМ, изучены закономерности клеточного роста, экспансии, клеточного поведения на поверхности БСПКМ. Выполнено изучение рельефа поверхности и заданных свойств образцов ТЭКТ с использованием методов светооптической, сканирующей электронной и атомно-силовой микроскопии.

Результаты. Показана возможность создания экспериментального образца ТЭКТ на основе БСПКМ, который максимально копирует структуру костной ткани на микро- и наномасштабах. Поверхность БСПКМ имела дополнительную наноструктурированность из-за нанесения продольных наноканавок, направленную на увеличение адгезивных и остеокондуктивных свойств.

Заключение. Разработана стратегия создания БСПКМ и ТЭКТ, получены экспериментальные образцы, пригодные для дальнейших исследований с целью формирования биodeградируемых имплантатов для нужд травматологии и ортопедии, вертебрологии.

Ключевые слова: матрица, скаффолд, кость, тканевая инженерия, фотолитография.

Для цитирования: Ларионов П.М., Садовой М.А., Самохин А.Г., Рожнова О.М., Гусев А.Ф., Принц В.Я., Селезнев В.А., Голод С.В., Принц А.В., Корнеев И.А., Комонов А.И., Мамонова Е.В., Малютин Ю.Н., Батаев В.А. Создание тканеинженерного эквивалента костной ткани и перспективы его использования в травматологии и ортопедии // Хирургия позвоночника. 2014. №3. С. 77–85.

CREATION OF TISSUE-ENGINEERED LIVING BONE EQUIVALENT AND PROSPECTS FOR ITS APPLICATION IN TRAUMATOLOGY AND ORTHOPAEDICS

P.M. Larionov, M.A. Sadovoy, A.G. Samokhin, O.M. Rozhnova, A.F. Gusev, V.Ya. Prinz, V.A. Seleznev, S.V. Golod, A.V. Prinz, I.A. Korneev, A.I. Komonov, E.V. Mamonova, Yu.N. Malyutina, V.A. Bataev

Objective. To present experimental prototypes of tissue-engineered bone equivalent (TEBE) based on nanostructured bioresorbable synthetic polymer cellular matrices (BSPCMs) and osteogenic differentiated cells created to repair bone defects.

Material and Methods. Nanostructured BSPCMs were developed and produced, which further served as the basis for creating TEBE. Cultured cells were transferred on the surface of nanostructured matrix, where patterns of their growth, expansion, and behavior were studied. Topography and surface properties of TEBE prototypes were investigated using methods of light-optical, scanning electron, and atomic force microscopy.

Results. A possibility of creating experimental TEBE prototype based on BSPCM, which copies to the maximum extent the bone structure at the micro- and nanoscales is shown. Surface of the BSPCM was additionally nanostructured by formation of longitudinally oriented nano-trenches, to increase adhesion and osteoconductive properties.

Conclusion. A strategy for creating nanostructured BSPCM and TEBE was developed, and experimental prototypes suitable for further investigations to form biodegradable implants for needs of traumatology, orthopaedics, and spine medicine were produced.

Key Words: matrix, scaffold, bone, tissue engineering, photolithography.

Hir. Pozvonoc. 2014; (3):77–85.

Одним из актуальных на сегодняшний день направлений в биологии и медицине является поиск специализированных биосовместимых и биодegradуемых композитных структур в качестве основы для тканевой инженерии и создания биоискусственных органов. Тканевой инжиниринг, использующий клетки, ростовые факторы и клеточные матрицы, является адекватным клиническим подходом для регенерации распространенных повреждений костной ткани в травматологии и ортопедии, вертебрологии, челюстно-лицевой хирургии. К основным требованиям, которыми должны обладать конструкции для клеточной инженерии, относят способность имитировать структуру и биологические функции утраченного органа или его части, способность обеспечения механической поддержки, дифференцировки и пролиферации клеток для управления структурой и функцией формирующейся ткани.

Сфера применения специализированных биосовместимых и биодegradуемых композиционных материалов может быть очень широкой [4]. Востребованными данные материалы будут в травматолого-ортопедической сфере, в челюстно-лицевой хирургии, нейрохирургии, нейроонкологии, важное применение, с нашей точки зрения, разрабатываемые материалы будут играть в вертебрологии при проведении органосохраняющих операций при травматических, онкологических и иных повреждениях позвоночника.

Несмотря на большое количество работ в области регенеративной медицины, до сих пор нет единого методического подхода к созданию матриц для выращивания искусственной костной ткани [1–4]. Однако в последнее время общей стратегией создания имплантатов и выращивания тканей становится копирование или имитация природных свойств биологических тканей и процессов, их формирующих. На сегодняшний день отсутствует возможность полноценного воспроизведения структуры создаваемого органа или ткани, что вызывает неадек-

ватную регенерацию в зоне дефекта [5]. При этом возникает ряд проблем, связанных с недостаточным регенеративным потенциалом и низкой биосовместимостью создаваемых имплантатов. Макропористость (больше 100 мкм) в структуре костей копируется в искусственно создаваемых материалах уже давно и является необходимой составляющей для роста клеток костей (поры могут занимать до 80 % объема костей) [1, 17, 18]. Наблюдающийся в последние годы значительный прогресс в решении проблем имплантации и выращивания тканей связан с переходом на микро- и наноуровень в копировании биологических тканей (например, переход к нанопорам с размерами от 500 до 30 нм). Напомним, что сама кость – это нанокомпозит, который содержит мягкий гидрогель на основе протеина, формирующий архитектуру и твердые неорганические компоненты. До 70 % матрицы костей – это композит с нанокристаллами с размерами от 20 до 80 нм и толщиной 2–5 нм [1]. Другие протеиновые компоненты кости также нанометровых размеров (коллагеновые волокна диаметром 80 нм).

Успехи мировой науки в исследовании структуры и свойств костной ткани позволили сформировать общую картину архитектуры костей, роста клеток и снабжения их питательными веществами. Результаты данных работ свидетельствуют о том, что, наряду с микровключениями и микropорами, важную роль при создании искусственной костной ткани играют нановключения, нанопоры [6, 17, 19]. Подобный подход, с нашей точки зрения, позволит увеличить биосовместимость создаваемых имплантатов и оказать влияние на клеточные реакции, связанные с дифференцировкой и ростом. До недавнего времени на эту часть проблемы не обращали должного внимания в связи с тем, что отсутствовали массовые методы формирования наноструктур. Однако быстрое развитие методов штамповой и импринт-микро- и импринт-нанополитографии привело к формированию целого направления в иссле-

довании и практическом применении наноструктур в области регенеративной медицины [14, 16, 20].

Цель исследования – анализ экспериментальных образцов тканеинженерного эквивалента костной ткани (ТЭКТ) на основе наноструктурированных биорезорбируемых синтетических полимерных клеточных матриц (БСПКМ) и остеогенных дифференцированных клеток для замещения дефектов кости.

Материал и методы

Основой для создания ТЭКТ послужили БСПКМ. Производство экспериментальных образцов БСПКМ было осуществлено на базе института физики полупроводников им. А.В. Ржанова Сибирского отделения Российской академии наук (ИФП СО РАН). Сырьем для выпуска экспериментальных образцов БСПКМ послужили три вида нетоксичного поли-L-лактида с доказанной биодegradуемостью марок «Purasorb PL 18», «Purasorb PL 36» и «Purasorb PL 65» («Purac Biochem bv», Нидерланды), с различными инкрементами плотности, что, в свою очередь, оказало влияние на скорость биодegradации образцов ТЭКТ. Для производства образцов БСПКМ был использован метод импринт-литографии с помощью специально разработанных и изготовленных ИФП СО РАН уникальных структурно-формирующих кремниевых штампов, содержащих микро- и нанорельеф с заданной плотностью выступов, отверстий и каналов, предназначенных для производства БСПКМ с заданными геометрическими параметрами рельефа, сформированного при помощи вышеуказанных штампов. Непосредственно производство БСПКМ осуществили на установке штамповой нанолитографии «Eitre 6 Nano Imprint Lithography System». Всего было произведено 35 образцов БСПКМ, использованных в настоящем исследовании.

Ведение культуры мезенхимальных стромальных клеток (МСК) с изучени-

ем их пролиферации и остеогенной индукции *in vitro* проводили с использованием роботизированного комплекса «Nikon BioStation CT» в соответствии с принятым протоколом наработки МСК, дифференцированных остеогенных клеток и инструкциями к роботизированному комплексу.

ТЭКТ получали путем нанесения суспензии в необходимом объеме, содержащем 3,5 млн ресуспендированных остеогенных клеток (жизнеспособность клеток не менее 86 %), на образцы БСПКМ.

Фоторегистрацию адгезии клеток на поверхности БСПКМ проводили техническими средствами комплекса «Nikon BioStation CT» методом фазово-контрастной микроскопии в режиме реального времени с интервалом 6 ч.

Изучение рельефа поверхности и заданных свойств образцов БСПКМ и ТЭКТ было выполнено с использованием методов световой оптической микроскопии с помощью светового оптического инвертированного микроскопа «Zeiss Axio Observer», ска-

нирующей электронной микроскопии с помощью микроскопа «Zeiss Evo 50», атомно-силовой микроскопии с помощью атомно-силового микроскопа фирмы «НТ-МДТ».

Оценку адгезии клеточных элементов на БСПКМ проводили в условиях роботизированного комплекса при температуре 36,5 °С и концентрации CO₂ 5 % с использованием культуральных флаконов объемом 25 мл и подготовленных вариантов матриц при насаивании 25 мл дифференцировочной культуральной среды «MesenCult» («StemCells», США), содержащей 30 тыс. ресуспендированных дифференцированных остеогенных клеток на см² для каждой исследуемой поверхности клеточной матрицы. Инкубацию образцов ТЭКТ, сформированных на основе БСПКМ, после заселения дифференцированными остеогенными клетками, полученными из МСК костно-мозгового происхождения, осуществляли в условиях роботизированного комплекса с 5 % содержанием CO₂ и температу-

рой 37 °С, в дифференцировочной среде «MesenCult» с добавлением гентамицина (100 мкг/мл). Замену 2/3 среды осуществляли через сутки. После инкубирования фиксировали участки ТЭКТ в 10 % нейтральном забуференном формалине.

Для определения остеогенных свойств ТЭКТ методом иммуоцитохимического анализа изучали экспрессию щелочной фосфатазы и окраску дифференцированных остеогенных клеток, полученных в культуре и экспрессированных на ТЭКТ на 14-е и 28-е сут культивирования (для определения остеогенных дифференцированных клеток, потенциальных предшественников остеобластов из МСК), выполняли анализ экспрессии KI 67 (определение пролиферативного потенциала клеточной популяции), экспрессии коллагена I типа (определение клеток, потенциальных предшественников остеобластов, ориентированных на синтез коллагена I типа).

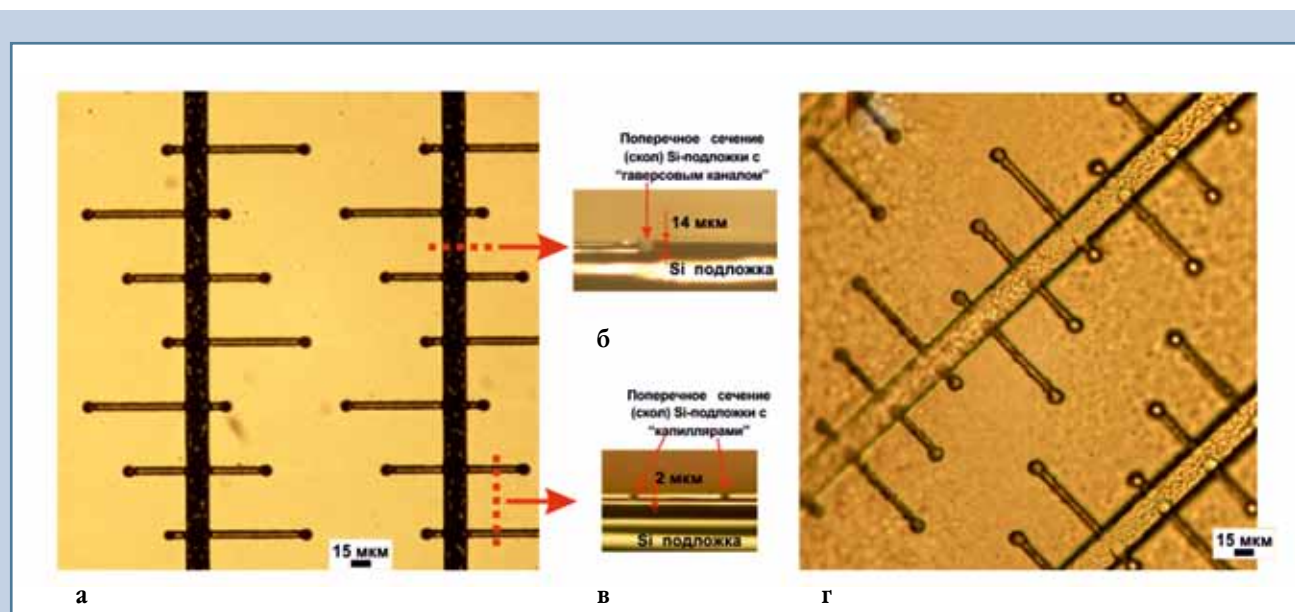


Рис. 1

Оптические фотографии: **а** – кремниевый мастер-штамп с вертикальным расположением областей для формирования лакун; **б** – поперечное сечение подложки штампа в области, предназначенной для формирования гаверсового канала; **в** – области, предназначенные для формирования капилляров, соединяющих гаверсовы каналы с лакунами; **г** – 2D-клеточная матрица, изготовленная в пленке полилактида с помощью промежуточного силиконового штампа

Результаты

Принято решение формировать ТЭКТ как многомерную конфигурацию БСПКМ, одновременно несущих несколько вариантов поверхностей, с добавлением различных действующих агентов и субстратов, что в конечном итоге позволяет не только подробно воспроизвести трехмерную структуру костной ткани, но и сразу же придать конечному изделию ряд необходимых свойств [8, 9, 11, 23]. С учетом имеющихся на сегодняшний день сведений о строении кости сформировали два типа топологии микро- и нанорельефа поверхностей БСПКМ.

Микро- и нанорельефы были спроектированы таким образом, чтобы имитировать гаверсовы каналы кости для доступа питательных веществ ко всем участкам в трехмерных вариантах матриц. Было получено два типа поверхности БСПКМ: в первом типе была заложена имитация горизонтального расположения лакун, во втором – вертикального. На рис. 1 приведена иллюстрация фрагмента поверхности БСПКМ с открытыми гаверсовыми каналами, имеющими ширину не более 16 мкм и глубину не более 16 мкм, при этом имитируемый гаверсов канал сообщается с гаверсовыми лакунами канальцевой системой (длина канальцев не менее 8 мкм, глубина и ширина не более 2 мкм) или непосредственно. Рис. 2, 3 отражают этапы производства, печати образцов БСПКМ на пластинах полилактида.

В соответствии с протоколом ведения клеток, МСК после культивирования и выполнения всех необходимых исследований (оценки жизнеспособности, митотического индекса, морфометрии) были ресуспендированы в дифференцировочной среде «Mesencult», ведение клеток продолжилось в течение 4 недель, после чего дифференцированные остеогенные клетки были высажены на БСПКМ.

По результатам морфологического анализа культуры МСК, культивированных в соответствии с описанной ранее методикой в течение 21 сут, получили популяцию клеток, облада-

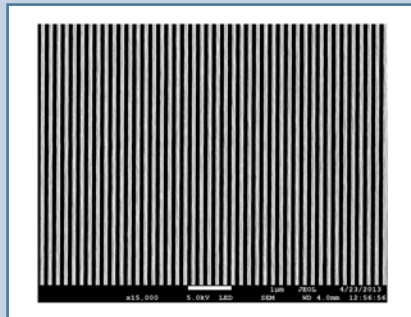


Рис. 2

Электронно-микроскопическое изображение отпечатка наноканавок в пленке полилактида после штамповки: период 200 нм, исходная 2D-матрица, площадь штампа до 160 см²



Рис. 3

Трехмерное изображение полилактидной 2D-матрицы (давление при штамповке 80 атм.), выполненное на атомно-силовом микроскопе фирмы «НТ-МДТ»: период 200 нм, размер углублений 180 × 140 нм

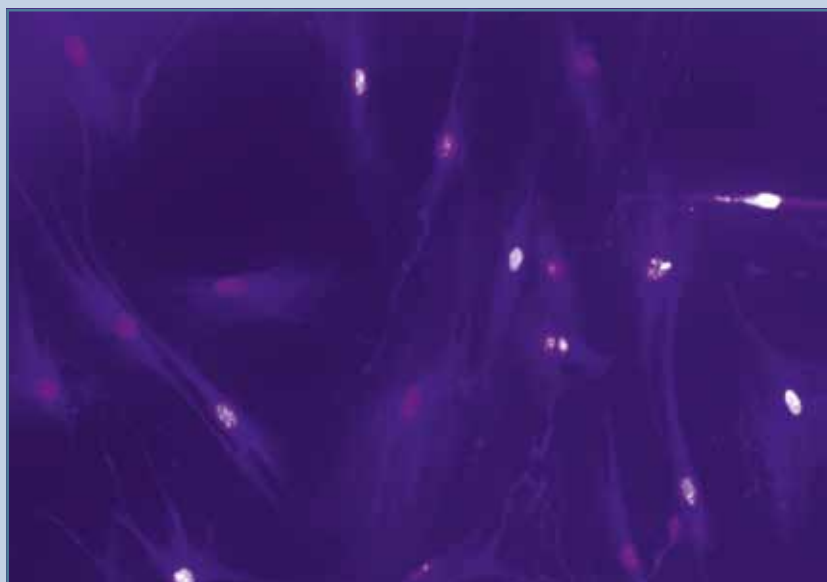


Рис. 4

Дифференцированные остеогенные клетки 4 недель культивирования, 14-е сут ведения на дифференцировочной среде, флуоресцентная микроскопия, DAPI-окрашивание, ув. 20, AF 488 filter; крупные фибробластоподобные клетки, хорошо флуоресцирующие ядра, видны митотические клетки

ющих следующими характеристиками: веретеновидные клетки диаметром 15–20 мкм с гомогенной цитоплазмой, низким ядерно-цитоплазматическим соотношением, центрально расположенным ядром, содержащим 4–7 ядрышек (рис. 4).

Митотический индекс рассчитывали в фазе логарифмического роста как соотношение количества митозов к общему количеству клеток, его величина составила 33,5 %. Время цитогенерации 29 ч.

Для исследования закономерностей формирования ТЭКТ и изучения его свойств были выбраны образцы БСПКМ на основе poly-L-lactide с инкрементом вязкости 6,81 дл/г («Purasorb PL 65»). Для оценки биологической активности ТЭКТ изучили экспериментальные образцы в следующие сроки: 1-е, 3-е, 14-е, 28-е сут после заселения, в ходе которых регистрировали динамику клеточных реакций дифференцированных осте-

огенных клеток, заселенных на ТЭКТ, с оценкой пролиферативной активности. В результате заселения поверхности БСПКМ дифференцированной остеогенной фракцией была получена устойчивая адгезия клеток на поверхности с последующей экспансией, выражавшейся в распластывании клеток на поверхности БСПКМ в течение первых суток с момента заселения (рис. 5), активными процессами клеточного деления, присутствием

большого количества клеток, находящихся в различных стадиях митоза (рис. 4) и высоким синтетическим потенциалом клеток ТЭКТ. Высокая биосовместимость обусловлена биомиметическим подобием микроархитектоники костной ткани БСПКМ 1-го типа и формирует высокий регенераторный потенциал ТЭКТ, определяя высокую жизнеспособность клеток в структуре ТЭКТ. Для уточнения особенностей клеточной экспансии

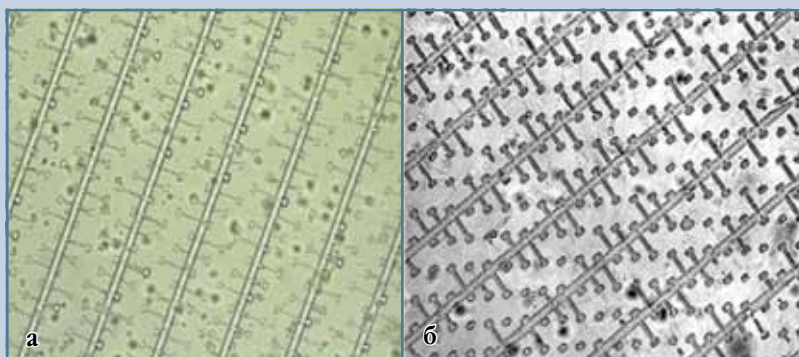


Рис. 5

Результаты изучения адгезии и экспансии клеток на поверхности биорезорбируемых синтетических полимерных клеточных матриц; световая микроскопия инвертированная, ув. 10: **а** – спустя 2 ч; **б** – спустя 24 ч, визуализируется адгезия мезенхимальных стромальных клеток к поверхности исследуемого образца

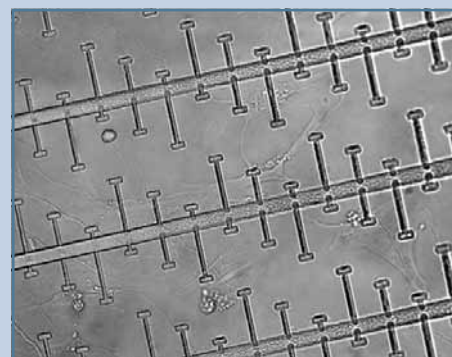


Рис. 6

Клеточная популяция образца тканеинженерного эквивалента костной ткани на основе биорезорбируемых синтетических полимерных клеточных матриц на 3-е сут после заселения, ув. 20; световая микроскопия, инвертированная микроскопия

Таблица

Результаты проверки адгезии клеточных элементов на поверхности тканеинженерного эквивалента костной ткани ($M \pm m$)

Тип поверхности матрицы	Остеогенные дифференцированные клетки, количество адгезированных клеток на 1 см ² поверхности
Пленка из поли-L-лактида без сформированного рельефа поверхности (контрольный образец)	1930 \pm 186
Биорезорбируемая синтетическая полимерная клеточная матрица второго типа и тканеинженерный эквивалент костной ткани на ее основе: массив локальных углублений размером 6 на 6 на 16 мкм, расположенных по обе стороны продольных углублений	9400 \pm 270*
Биорезорбируемая синтетическая полимерная клеточная матрица первого типа и тканеинженерный эквивалент костной ткани на ее основе: массив наноканалов, проходящих по всей поверхности. Глубина наноканалов 140 нм, ширина 140 нм, период 200 нм	19 600 \pm 373*/**

* $P < 0,05$ по сравнению с контролем;

** $P < 0,05$ по сравнению с исследуемыми экспериментальными образцами биорезорбируемой синтетической полимерной клеточной матрицы / тканеинженерного эквивалента костной ткани.

на ТЭКТ провели специальные эксперименты с видеорегистрацией в заранее определенных участках ТЭКТ с фиксированным увеличением и высокой плотностью заселения дифференцированных остеогенных клеток (250 тыс. клеток на 1 см²), с временными интервалами видеофиксации от 2 до 112 ч от начала заселения ТЭКТ (рис. 5, 6). Из полученных результатов следует, что наиболее показательными являются результаты, полученные через 88 ч экспансии на ТЭКТ заселяемых дифференцированных остеогенных клеток, когда достигнута максимальная плотность заселения, что, вероятно, является дифференцированным показателем для подобного типа искусственных тканей (табл.). Если рассуждать о возможности клеточной экспансии, то во временном интервале с 14 до 112 ч определенно можно говорить именно о клеточной экспансии на ТЭКТ. В то же время мы получили результат, который может стать элементом дальнейшей оценки перспектив применения технологии ТЭКТ, поскольку поставленный эксперимент показал, что 24-часовой период от начала заселения ТЭКТ является периодом адаптации клеток к новым условиям и, вероятно, является прогностическим для оценки регенераторного потенциала ТЭКТ в целом.

Подобный рост адгезивного потенциала имеет существенное значение с учетом того, что было подтверждено адгезирование остеогенных дифференцированных клеток к поверхности экспериментальных образцов БСПКМ и ТЭКТ. Это позволило произвести селекцию матриц по признаку их пригодности для адаптации остеогенных клеток и сделать выбор в пользу БСПКМ первого типа как наиболее пригодного для производства ТЭКТ не только по причине наиболее полного копирования микро- и нанорельефа костной ткани, но и как более предпочтительного типа поли-L-лактидных матриц для размещения на их поверхности клеточных популяций из-за большего адгезивного потенциала. Таким образом, зарегистрированный адгезивный потенциал обеспечивает остеоиндуктивный и остеокондуктивный потенциал разработанной матрицы за счет фиксации на поверхности изделий остеогенных клеток.

При изучении культуры мезенхимальных стромальных клеток видны крупные фибробластоподобные клетки с хорошо флуоресцирующими ядрами, среди популяции видны митотические клетки (рис. 7). Полученные результаты свидетельствуют о высокой жизнеспособности получаемой культуры МСК.

Распределение клеток и клеточных реакций через сутки после проведения адгезии на ТЭКТ выглядело следующим образом: клетки формировали слой крупных клеток, часто неправильной формы, за счет наличия псевдоподий, с четко очерченными контурами, хорошо просматриваемой цитоплазмой и ядром (рис. 5, 6), с высокой пролиферативной активностью.

Значительные различия между первым и вторым днем абсорбции ТЭКТ заключались в формировании дифференцированных остеогенных клеток на поверхности

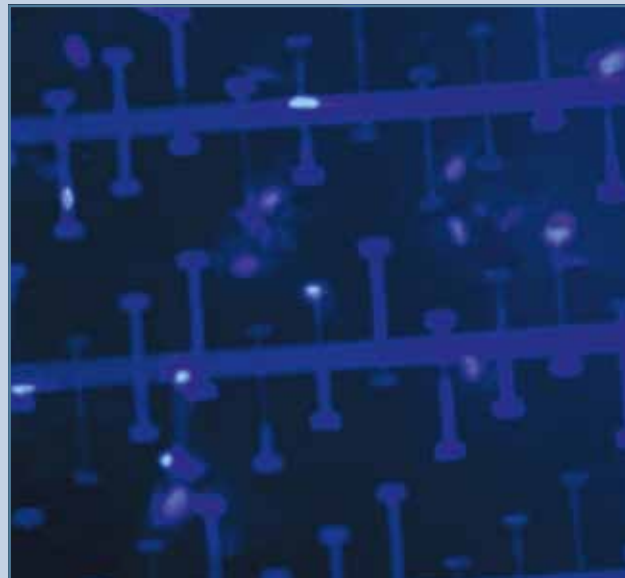


Рис. 7

Заселение популяцией дифференцированных остеогенных клеток образца тканеинженерного эквивалента костной ткани на основе биорезорбируемых синтетических полимерных клеточных матриц с инкрементом вязкости в 6,81 дл/г, 14-е сут, ув. 10, флуоресцентная микроскопия: отчетливо прослеживается пространственно-размерная ориентация клеточных элементов относительно гаверсовых траншей

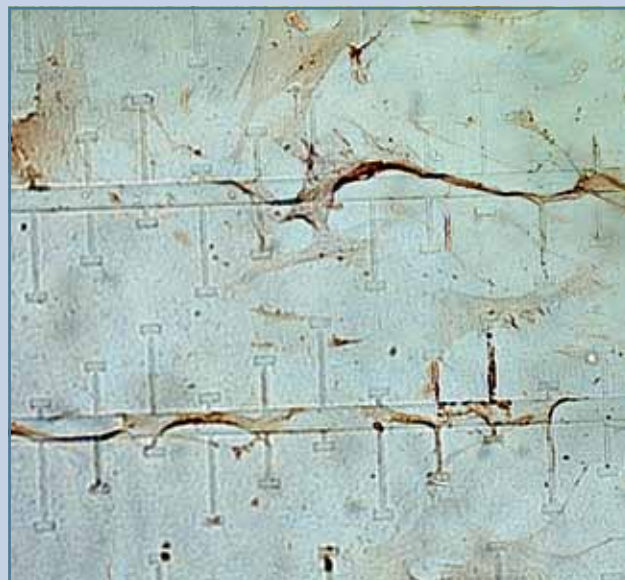


Рис. 8

Дифференцированные остеогенные клетки 7-й недели культивирования на поверхности тканеинженерного эквивалента костной ткани; светооптическая микроскопия, ув. 10

монослоя, в котором начинали преобладать крупные клетки с вытянутыми псевдоподиями (до 50 мкм), появлялась высокая пролиферативная активность в популяции адгезированных клеток (от 5 до 10 %).

На 7-е сут от начала абсорбции клеток на поверхности ТЭКТ начинали отчетливо появляться зоны межклеточных контактов за счет псевдоподий, визуализируется большое количество клеток, находящихся в разных стадиях митотической активности (рис. 8).

На 14-е сут экспансии клеток в структуре ТЭКТ определяли маркеры, характеризующие клеточный компонент ТЭКТ как остеогенные дифференцированные клетки и подтверждающие его остеоиндуктивный и остеокондуктивный потенциал: определялась экспрессия щелочной фосфатазы (рис. 9) и коллагена 1-го типа (рис. 10). Результаты исследования были положительными по сравнению с контрольными образцами – недифференцированными клетками мезенхимальной фракции (МСК).

Вместе с тем адгезивный потенциал БСПКМ всех типов и ТЭКТ на их основе существенно превышал таковой по сравнению с контрольным образцом, в качестве которого выступала пленка из poly-L-lactide без сформированного рельефа поверхности. Было зарегистрировано более чем четырехкратное превосходство по степени адгезии для БСПКМ второго типа и ТЭКТ на ее основе по сравнению с контролем ($P < 0,05$), независимо от используемых клеточных популяций, и более чем пяти- и двенадцатикратное превосходство по степени адгезии для БСПКМ первого типа и ТЭКТ на ее основе по сравнению с контролем для популяции МСК.

Полученные в ходе выполнения НИР результаты свидетельствуют о необходимости проведения доклинических исследований ТЭКТ на экспериментальных моделях с целью определения регенераторного потенциала тканеинженерных конструкций *in vivo* и определения направлений создания на их основе биodeградиру-

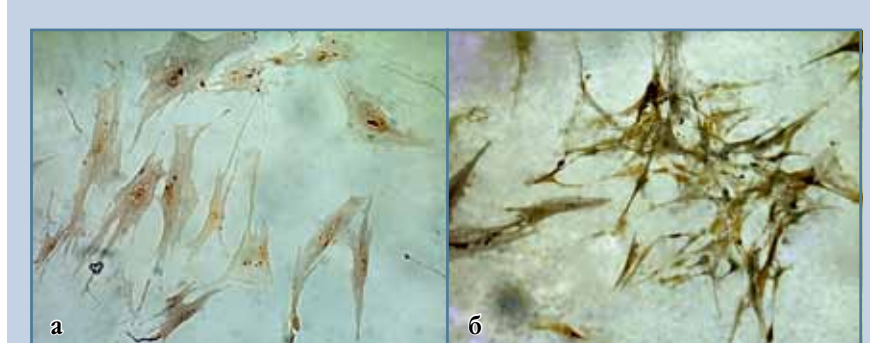


Рис. 9

Мезенхимальные стромальные клетки 4 недель культивирования, отрицательная реакция на щелочную фосфатазу (а) и дифференцированные остеогенные клетки 7 недель культивирования, положительная реакция на щелочную фосфатазу (б); 14-е сут ведения на дифференцировочной среде, светооптическая микроскопия, ув. 10

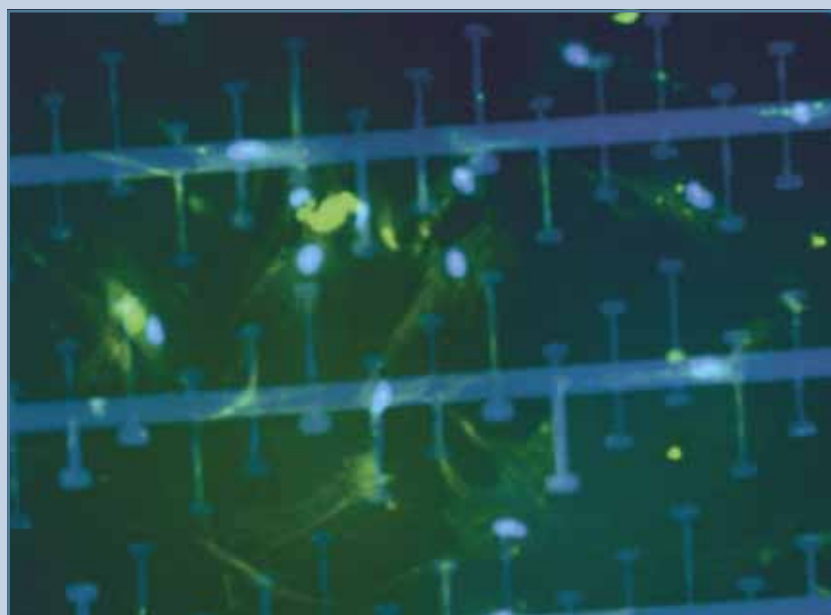


Рис. 10

Экспрессия дифференцированными остеогенными клетками антигена коллагена первого типа на 28-е сут экспансии на поверхности тканеинженерного эквивалента костной ткани (цитоплазматическая и внецитоплазматическая локализация); флуоресцентная микроскопия; докрасивание ядер DAPI, ув. 20

емых имплантатов для нужд травматологии и ортопедии, вертебрологии.

Обсуждение

С позиции идеологии тканевой инженерии, матрицы-носители (скаффол-

ды) являются ключевыми элементами тканевой инженерии. Помимо обеспечения целевой доставки необходимых агентов, матрицы должны быть биологически совместимыми и обладать требуемой механической прочностью. В современной тканевой инженерии

основной упор делается на разработку матриц из биорезорбируемых материалов, обладающих биологической активностью [7–9, 12, 13, 20]. С этой целью внутрь матрицы могут быть введены биологически активные вещества: протеины, способствующие адгезии и росту клеток, лекарственные препараты, а также клеточные культуры [12, 23]. Новым направлением модификации поверхности клеточных матриц является обработка физическими факторами или химическими реагентами с целью улучшения механических и биомедицинских свойств, что позволяет добиться повышения адгезионных свойств поверхности по отношению к культивируемым клеточным популяциям, улучшения газодинамических свойств изделий и повышения их проницаемости для субстратов и продуктов обмена клеток [7, 8, 21]. Свойства поверхности матриц также играют большую роль для прикрепления и пролиферации клеток [9, 11, 21]. Для повышения адгезионных свойств поверхности по отношению к клеткам, улучшения газодинамических свойств изделий и повышения их проницаемости для субстратов и продуктов обмена клеток применяют различные подходы, включая обработку изделий физическими факторами или химическими реагентами [10, 11].

В мировой литературе есть несколько обзоров, которые анализируют преимущества и недостатки известных и развиваемых методов формирования матриц [2, 4, 5, 17–19, 22]. К таким методам относят самоформирование структуры матриц, например, с применением перехода сверхкритического CO_2 , направленное формирование матриц, например с помощью полимерных волокон, формируемых с помощью электроспиннинга или микро- и наносфер и т.д. Методы самоформирования не воспроизводимы, имеют целый ряд ограничений и далеки от оптимальных. Известно большое количество статей, в которых исследуются возможности формирования матриц с помощью методов литографии. Эти методы позволяют

формировать строго воспроизводимые запланированные массивы функционально связанных макро- и нанообъектов [14, 23]. Мы приверженцы данного направления, которое применимо к любым конструкциям, любым полимерам и позволяет формировать разнообразные высокоточные матрицы. С учетом того что массовое производство с помощью методов литографии уже зарекомендовало себя в полупроводниковой отрасли, вполне логично предположить, что это направление может оказаться в будущем главным, именно поэтому оно было положено в основу данного исследования. К настоящему времени в мире имеются установки непрерывной штамповой импринт-фотолитографии, позволяющие печатать сотни квадратных метров микро- и наноструктурированных пленок в час. Пока это еще дорогой процесс, однако на историческом примере использования фотолитографии в полупроводниковой технологии можно говорить о том, что за короткое время стоимость процессов может уменьшиться в миллион раз, тогда на смену спонтанным процессам самоформирования придут высокотехнологические методы формирования самых разнообразных матриц из различных материалов. Нами сознательно выбран именно этот путь создания матриц с использованием имеющегося у нас оборудования фотолитографии и штамповой импринт-нанофотолитографии, поскольку это принципиальным образом отличает такой подход от других, ныне существующих, так как позволяет сформировать максимально полное подобие структуры кости в формируемых изделиях, что является собой один из отличительных признаков научной новизны подобной работы.

Законы развития технических систем привели к возможности регистрировать нанообъекты, создавать их и управлять ими. За последние три года опубликован ряд обзоров, посвященных результатам использования нанотехнологий для решения задач инженерии тканей, прежде всего,

костной [16, 19, 20, 22]. Имеются также сообщения, что создаваемая нанопористость на поверхности имплантатов (поры диаметром 30 нм) гарантирует их многолетнее использование [7, 8, 10, 12, 14, 21]. Надо признать, что проблема выращивания кости и формирования тканеинженерных имплантатов является комплексной, для ее решения необходимо привлекать специалистов из различных областей, включая клеточных биологов, специалистов в области биоматериаловедения, специалистов по формированию гетерограниц и поверхностей, по изучению взаимодействия клеток и материалов и т.д.

Полученные результаты еще раз обосновывают целесообразность разработки тканеинженерных конструкций, обладающих биомиметическими свойствами и позволяющих формировать управляемый процесс регенерации костной ткани с последующей трансляцией в область практического здравоохранения. Регенераторный потенциал созданной тканеинженерной конструкции обеспечивает возможность подготовки пациента к имплантации, включающей забор аутологичных клеток мезенхимальной фракции, получения на их основе пула остеогенных дифференцированных клеток, премедикации пациента, направленной на коррекцию возможных дисметаболических нарушений, а также выполнение оперативных вмешательств с управляемыми характеристиками. Например, операция проведения управляемого спондилодеза возможна за счет четкого понимания жизнеспособности клеток, их пролиферативного потенциала, регулируемой биodeградации ТЭКТ и исходного состояния тканей позвоночника пациента.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007–2013 гг.», государственный контракт № 14.512.11.0013

Литература

1. Внутренняя архитектура кости [Электронный ресурс]. <http://www.medical-enc.ru/anatomy/vnutrennyaya-arhitektura-kosti.shtml> [The internal architecture of bone]. URL: <http://www.medical-enc.ru/anatomy/vnutrennyaya-arhitektura-kosti.shtml>. In Russian].
2. Деев Р.В., Цупкина Н.В., Бозо И.Я. и др. Тканеинженерный эквивалент кости: методологические основы создания и биологические свойства // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011. Т. VI. № 1. С. 63–67. [Deev RV, Tsupkina NV, Bozo IYa, et al. [Tissue-engineered bone equivalent: methodological bases of creation and biological properties]. Cell Transplantation and Tissue Engineering. 2011;(6)1:63–67. In Russian].
3. Костная ткань [Электронный ресурс]. http://hystology.ru/kostnaja_tkan.html [Bone Tissue]. URL: http://hystology.ru/kostnaja_tkan.html. In Russian].
4. Севастьянов В.И., Перова Н.В., Довжик И.А. Основные принципы подхода к доклинической оценке имплантатов // Технология живых систем. 2009. Т. 6. № 4. С. 10–20. [Sevast'yanov VI, Perova NV, Dovzhik IA. [Main principles of approach to preclinical implant assessment]. Tehnologiya zhyvyh sistem. 2009;(6)4:10–20. In Russian].
5. Хенч Л., Джонс Д. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей / Под ред. А.А. Лушниковой. М., 2007. [Hench L, Jones J. [Biomaterials. Artificial Organs and Tissue Engineering. Ed. by A.A.Lushnikova. Moscow, 2007. In Russian].
6. Anselme K, Ponche A, Bigerelle M. Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 2: biological aspects. Proc Inst Mech Eng H. 2010;224:1487–1507.
7. Biggs MJ, Richards RG, Gadegaard N, et al. The use of nanoscale topography to modulate the dynamics of adhesion formation in primary osteoblasts and ERK/MAPK signalling in STRO-1+ enriched skeletal stem cells. Biomaterials. 2009;30:5094–5103. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.05.049.
8. Cai Y, Liu P, Tang R. Recent patents on nano calcium phosphates. Recent Patents on Materials Science. 2008;1:209–216.
9. Dalby MJ, Macintyre A, Roberts JN, et al. Nanoporous titanium substrates for osteogenesis. Nanomedicine (Lond). 2012;7:19.
10. Kingham EJ, Tsimbouri PM, Gadegaard N, et al. Nanotopography induced osteogenic differentiation of human stem cells. Bone. 2011;48:S108–S109. doi: 10.1016/j.bone.2011.03.177.
11. Martins AM, Alves CM, Kasper FK, et al. Responsive and in situ-forming chitosan scaffolds for bone tissue engineering applications: an overview of the last decade. J Mater Chem. 2010;20:1638–1645. doi: 10.1039/B916259N.
12. McNamara LE, Sjöström T, Burgess K, et al. Characterisation of mesenchymal stem cell responses to titanium nanopillars for orthopaedic applications. Eur Cell Mater. 2011;22(Suppl 2):7.
13. Morris HL, Reed CI, Haycock JW, et al. Mechanisms of fluid-flow-induced matrix production in bone tissue engineering. Proc Inst Mech Eng H. 2010;224:1509–1521.
14. Navarro M, Planell JA. Composite scaffolds for bone tissue regeneration. In: Wiley Encyclopedia of Composites. 2011:1–14.
15. Ponche A, Bigerelle M, Anselme K. Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 1: physico-chemical effects. Proc Inst Mech Eng H. 2010;224:1471–1486.
16. Smith IO, Liu XH, Smith LA, et al. Nanostructured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2009;1:226–236. doi: 10.1002/wnan.26.
17. Special Issue on Bone Tissue Engineering. Proc Inst Mech Eng H: Journal of Engineering in Medicine. 2010;224:1329–1566.
18. Tanner KE. Bioactive composites for bone tissue engineering. Proc Inst Mech Eng H. 2010;224:1359–1372.
19. Tare RS, Kanczler J, Aarvold A, et al. Skeletal stem cells and bone regeneration: translational strategies from bench to clinic. Proc Inst Mech Eng H. 2010;224:1455–1470.
20. Thompson MS, Epari DR, Bieler F, et al. In vitro models for bone mechanobiology: applications in bone regeneration and tissue engineering. Proc Inst Mech Eng H. 2010;224:1533–1541.
21. Willie BM, Petersen A, Schmidt-Bleek K, et al. Designing biomimetic scaffolds for bone regeneration: why aim for a copy of mature tissue properties if nature uses a different approach? Soft Matter. 2010;6:4976–4987. doi: 10.1039/C0SM00262C.
22. Zhang L, Webster TJ. Nanotechnology and nanomaterials: promises for improved tissue regeneration. Nano Today. 2009;4:66–80. doi: 10.1016/j.nantod.2008.10.014.
23. Zorlutuna P, Annabi N, Camci-Unal G, et al. Microfabricated biomaterials for engineering 3D tissues. Adv Mater. 2012;24:1782–1804.

Адрес для переписки:

Рожнова Ольга Михайловна
630091, Новосибирск, ул. Фрунзе, 17,
НИИТО,
ORognova@niito.ru

Статья поступила в редакцию 02.10.2013

Петр Михайлович Ларионов, д-р мед. наук, проф.; Михаил Анатольевич Садовой, д-р мед. наук, проф.; Александр Геннадьевич Самохин, канд. мед. наук; Ольга Михайловна Рожнова, канд. мед. наук; Аркадий Федорович Гусев, канд. мед. наук, Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна; Виктор Яковлевич Принц, д-р физ.-мат. наук, проф.; Владимир Александрович Селезнев, канд. физ.-мат. наук; Сергей Владиславович Голод, канд. физ.-мат. наук; Александр Викторович Принц, мл. науч. сотрудник; Иван Александрович Корнеев, инженер; Александр Иванович Комонов, инженер, Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова, Новосибирск; Екатерина Владимировна Мамонова, канд. эконом. наук, Инновационный медико-технологический центр, Новосибирск; Юлия Николаевна Малюткина, аспирант; Владимир Андреевич Батаев, д-р техн. наук, проф., Новосибирский государственный технический университет.

Piotr Mikbailovich Larionov, MD, DMSc, Prof.; Mikhail Anatolyevich Sadovoy, MD, DMSc, Prof.; Aleksandr Gennadyevich Samokhin, MD, PhD; Olga Mikbailovna Rozhnova, MD, PhD; Arkady Fedorovich Gusev, MD, PhD, Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n.a. Ya.L. Tsiyuan; Viktor Yakovlevich Prinz, DSc in Physics/Mathematics, Prof.; Vladimir Aleksandrovich Seleznev, PhD in Physics/Mathematics; Ivan Aleksandrovich Korneev, engineer; Aleksandr Ivanovich Komonov, engineer, Rzhonov Institute of Semiconductor Physics, SB RAS, Novosibirsk; Ekaterina Vladimirovna Mamonova, PhD in Economy, Innovation Medical Technology Center, Novosibirsk; Yulia Nikolayevna Mal'yutina, fellow; Vladimir Andreyevich Bataev, DSc in Technics, Prof., Novosibirsk State Technical University.