

## АГРЕГАЦИЯ ЧАСТИЦ НАНОРАЗМЕРНОГО ГИДРОКСИАПАТИТА И ИНГИБИРОВАНИЕ ИМ КЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ КАК КЛЮЧЕВЫЕ ФАКТОРЫ ОГРАНИЧЕНИЯ ЕГО БИОИНТЕГРАЦИИ

© 2019 г. В.В. Минайчев, П.О. Кирсанова, А.И. Звягина, А.С. Одинцова\*,  
И.С. Фадеева, В.С. Акатов

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
142290, Пушкино Московской области, Институтская ул., 3

\*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1

E-mail: fadееva.iteb@gmail.com

Поступила в редакцию 05.07.2019 г.

После доработки 23.07.2019 г.

Принята к публикации 26.07.2019 г.

В реконструктивной хирургии костной ткани в качестве остеопластических материалов для заполнения дефектов костной ткани используются различные синтетические кальциево-фосфатные соединения. Особый интерес представляет наноразмерный гидроксиапатит благодаря своей схожести с гидроксиапатитом костной ткани и потенциальной остеоиндуктивности. Однако известно, что наноразмерный гидроксиапатит может ингибировать процессы биоинтеграции материалов, и в настоящее время нет четкого представления о механизмах этого эффекта. Нами *in vitro* было показано, что наноразмерный гидроксиапатит подавляет адгезивность клеток к нему, и это может быть причиной аноиксиса. Исследования в модели гетеротопической имплантации материалов под кожу крысам показали, что наноразмерный гидроксиапатит в условиях *in vivo* образует слабрезорбирующийся агломерат, блокирующий миграцию клеток в материал, а также процессы неокollaгеноза по периферии образца наблюдаются только поверх плотного слоя мертвых клеток (клеточного дебриса), окружающих агломерировавшийся наноразмерный гидроксиапатит. Добавление деминерализованного костного коллагенового матрикса к наноразмерному гидроксиапатиту в качестве кондуктивного компонента способствует заселению материала клетками, резорбции наноразмерного гидроксиапатита и активному построению неокollaгенового матрикса. Представленные результаты указывают на необходимость модификации наноразмерного гидроксиапатита кондуктивным компонентом с целью предотвращения его агломерации и повышения его биоинтеграции и остеиндуктивного потенциала в организме.

*Ключевые слова:* остеопластические материалы, наноразмерный гидроксиапатит, биоинтеграция, адгезия, аноиксис.

DOI: 10.1134/S0006302919050156

На сегодняшний день в различных областях медицины, таких как ортопедия, травматология, челюстно-лицевая хирургия и др., широко востребованы остеопластические материалы для хирургического лечения повреждений костной ткани различной этиологии (травмы, остеопороз, новообразования и т.д.).

Одним из подходов к созданию остеопластических материалов является разработка имплантов на основе синтетических кальциево-фосфатных соединений. На сегодняшний день одним из наиболее используемых в медицинской практике

кальциево-фосфатных соединений является гидроксиапатит [1]. Благодаря своей схожести с гидроксиапатитом костной ткани и природным остеиндуктивным свойствам особый интерес представляет синтетический наноразмерный гидроксиапатит (нГАп) [2,3]. Однако нГАп также обладает рядом недостатков. Частицы нГАп могут инициировать развитие воспалительного ответа на материал вплоть до его отторжения, усугубляя, таким образом, процесс регенерации костной ткани [4–7]. Подобные противоречия говорят о недостаточности знаний о механизмах и факторах, определяющих успешную интеграцию подобных материалов в организме пациента и необходимости их изучения для дальнейшего

Сокращения: нГАп – наноразмерный гидроксиапатит, ДКК – деминерализованная костная крошка.

совершенствования материалов на основе кальцево-фосфатных соединений.

Исходя из вышесказанного, целью настоящего исследования являлось выявление биофизических факторов, влияющих на биоинтеграцию нГАп в организме.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Синтез и определение физико-химических характеристик нанокристаллического гидроксиапатита.** Синтез нГАп проводили по методике, описанной ранее [8,9]. Средний размер частиц полученного нГАп составлял 20 нм. Полученный гидроксиапатит представлял собой пастообразную водную суспензию с массовой долей нГАп 20%.

**Получение деминерализованной костной крошки.** Деминерализованная костная крошка (ДКК) была получена путем измельчения деминерализованных костных блоков, изготовленных из губчатой костной ткани. Изготовление деминерализованных костных блоков проводили по авторской методике (Патент на изобретение № 2686309), включающей щадящую делипидизацию и деминерализацию костной ткани [10]. После обработки осуществляли лиофильную сушку материала на установке «ИНЕЙ-6» (ИБП РАН, Пушкино, Россия) и его последующее измельчение.

**Культура клеток.** Анализ биосовместимости образцов нГАп в условиях *in vitro* проводили с использованием стромальных клеток пульпы зуба человека, полученных в соответствии с методикой, описанной в работе [11]. Клетки культивировали в питательной среде DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10%-й эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 80 мкг/мл сульфата гентамицина (Sigma-Aldrich, США) при 37°C, в условиях 5%-го содержания CO<sub>2</sub> в воздухе.

**Цитотоксический тест и морфологический анализ адгезии и распластывания клеток *in vitro*.** Для проведения экспериментов *in vitro* на покровное стекло наносили тонкий слой пастообразного нГАп. В качестве контроля использовали покровные стекла, не покрытые материалом. Стекла помещали в чашку Петри, добавляли культуральную среду и производили посев клеток на поверхность покрытых и непокрытых нГАп стекол при плотности посева  $1 \cdot 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>.

Цитотоксический тест и морфологический анализ адгезии и распластывания клеток на материале или вблизи него проводили через 24 ч после посева, используя флуоресцентные красители Bisbenzimidazole Hoechst 33342, йодид пропидия и кальцеин АМ. Клетки окрашивали путем добавления в культуральную среду 1 мкг/мл Hoechst

33342, 1 мкг/мл йодида пропидия и 2 мкМ кальцеина АМ с последующей инкубацией в течение 20 мин при температуре 37°C. После окрашивания клетки отмывали раствором Хэнкса с добавлением 10 мМ органического буфера HEPES («ПанЭко», Россия). Затем проводили оценку морфологии и жизнеспособности клеток с использованием конфокального микроскопа TCS SP5 (Leica, Германия).

**Экспериментальные животные.** Для исследования *in vivo* использовали самцов крыс стока Wistar массой 180–200 г, полученных из Клиники экспериментальных животных Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (ИТЭБ РАН). В ходе эксперимента животных содержали в стандартных условиях (температура 21–23°C, влажность 30–70%, 12-часовой период освещения, корм и вода — *ad libitum*). Все манипуляции с животными осуществляли в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 10993-2-2009. Гетеротопическую имплантацию биоматериалов проводили на срок в восемь недель в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 10993-6-2011.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Оценка выживаемости, прикрепления и распластывания клеток на нанокристаллическом гидроксиапатите *in vitro*.** Цитотоксическое действие пастообразного материала, а также прикрепление и распластывание клеток на нем определяли, основываясь на окрашивании клеток флуоресцентными красителями Hoechst 33342 (окрашивает ядра живых и погибших клеток в голубой цвет), йодидом пропидия (окрашивает ядра погибших клеток в красный цвет) и кальцеином АМ (окрашивает цитоплазму живых клеток в зеленый цвет). На рис. 1 представлена микрофотография клеток через 24 ч после посева на покровное стекло и на покровное стекло, покрытое нГАп.

При микроскопическом анализе клеток, высеянных на покровные стекла (контрольные условия), было обнаружено, что все клетки были прикрепленными и распластанными и имели типичную фибробласто-подобную морфологию (рис. 1а). При анализе клеток, высеянных на нГАп (рис. 1б), наблюдалось значительно меньшее число прикрепившихся клеток по сравнению с контролем, при этом у прикрепившихся к материалу клеток были нарушены процессы адгезии и распластывания. Таким образом, было обнаружено, что в условиях *in vitro* нГАп подавляет адгезию и распластывание клеток, что в конечном итоге может приводить к индукции апоптоза — клеточной гибели, опосредованной ингибированием прикрепления клеток к твердому субстрату.

Полученные *in vitro* результаты дают основание предполагать ограниченную биосовместимость

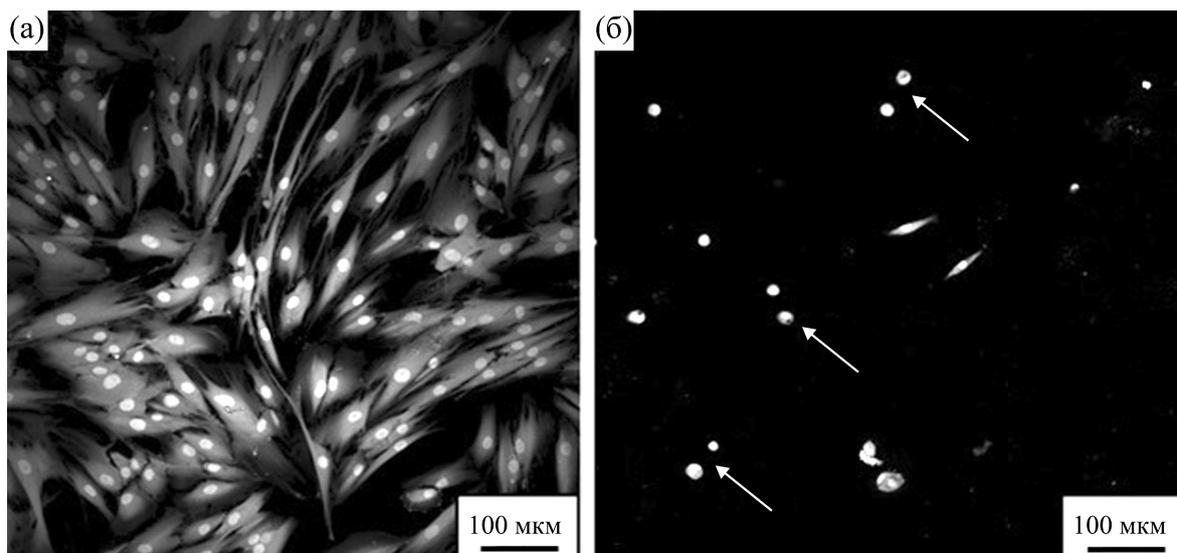


Рис. 1. Микрофотографии клеток, культивируемых на покровном стекле (а) и на покровном стекле, покрытом нГАп (б). Стрелками указаны ядра живых, нераспластанных клеток, утративших основную часть цитоплазмы.

мость наноразмерного гидроксиапатита вследствие нарушения адгезии клеток к этому материалу. Нарушение адгезии клеток к нГАп может ограничивать его биоинтеграцию и в условиях *in vivo*.

**Исследование остеогенных свойств пастообразного нГАп и его сочетания с деминерализованным костным коллагеновым матриксом в модели гетеротопической имплантации.** С целью изучения остеогенных свойств материалов на основе нано-

размерного гидроксиапатита была проведена гетеротопическая имплантация образцов пастообразного материала с содержанием нГАп, равным 20%. На основании полученных *in vitro* данных было предложено использование деминерализованной костной крошки, полученной из деминерализованных костных матриксов, в качестве адгезивного проводника (кондуктивного компонента).

Через восемь недель гетеротопической имплантации в образцах пастообразного нГАп материала без дополнительных компонентов получение криосрезов образцов было невозможным, так как нГАп, сливаясь в сплошной агломерат, блокировал миграцию клеток в образец и процессы неокollaгенеза, в результате чего вокруг материала ингибировался даже стандартный процесс образования фиброзной капсулы. Также в данных образцах материала не было обнаружено каких-либо признаков биоинтеграции в организме экспериментальных животных. Помимо этого, было отмечено развитие асептического воспаления на месте имплантированных образцов и отторжение материала через формирование кожной фистулы.

В свою очередь, результаты, полученные для образцов группы нГАп с добавлением ДКК (нГАп/ДКК) на сроке восемь недель имплантации, показали, что введение в пастообразный нГАп остеокондуктивного компонента способствовало заселению материала клетками и инициации начальных процессов биоинтеграции нГАп в организме реципиента. В образцах нГАп/ДКК наблюдались частичная резорбция гидроксиапатита и активные процессы неокollaгенеза (рис. 2), однако образование соединитель-

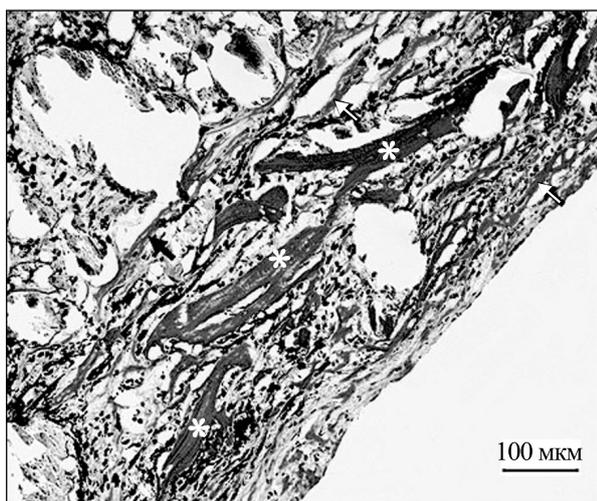
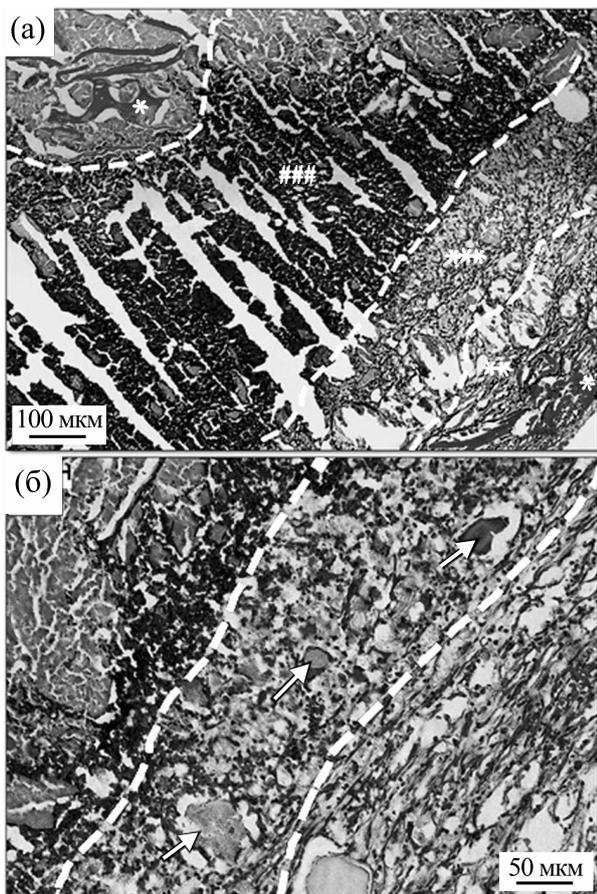


Рис. 2. Микрофотографии криосрезов образцов группы нГАп/ДКК через 8 недель гетеротопической имплантации крысам. Световая микроскопия, окраска трихром по Лилли. \* – Материал деминерализованной костной крошки, стрелками указан зрелый неокollaген.



**Рис. 3.** Влияние кондуктора и нГАп на миграцию клеток в материал. Микрофотографии криосрезов образцов группы нГАп/ДКК через восемь недель имплантации крысам. Световая микроскопия, окраска трихром по Лилли. (а) – Гистотопограмма материала нГАп/ДКК; (б) – увеличенный фрагмент материала нГАп/ДКК в зоне клеточного дебриса. \* – Деминерализованная костная крошка, \*\* – неоколлагеновый матрикс, \*\*\* – клеточный дебрис, ### – слой гидроксиапатита, стрелками указаны агломераты гидроксиапатита в клеточном слое.

ной ткани происходило только по периферии образца поверх плотного слоя клеточного дебриса и непосредственно вблизи ДКК.

На рис. 3 показано влияние кондуктивного компонента и нГАп на миграцию клеток в материал. В образцах нГАп/ДКК наблюдалась выраженная гетерогенность: по периферии образца наблюдалось частичное вытеснение ДКК (рис. 3а, обозначено звездочкой) за счет агломерации частиц нГАп и формирование на фрагментах ДКК и в контактных зонах зрелого неоколлагена (рис. 3а, обозначено двумя звездочками). Ближе к центру образцов наблюдалось значительное уменьшение количества неоколлагена и формирование зоны интенсивного скопления клеточного дебриса (погибших клеток) (рис. 3а,

обозначено тремя звездочками) с фрагментами частично резорбированного нГАп (рис. 3б, стрелки), под которым наблюдался следующий, пропитанный ДНК, плотный слой агломерировавшего нГАп (интенсивно окрашенные гематоксилином области на рис. 3а, обозначены тройной решеткой), в котором как клетки реципиента, так и клетки клеточного дебриса не обнаружены. В центральной части материала отсутствовали признаки резорбции нГАп, а также признаки миграции клеток к фрагментам ДКК через слой плотно агломерировавших частиц гидроксиапатита.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в проведенных исследованиях показано, что биоинтеграция нГАп в организме может быть лимитирована двумя основными факторами – слабыми адгезивными свойствами самого нГАп и образованием плотных, непроницаемых для клеток агломератов частиц нГАп, вследствие чего происходит ингибирование процессов резорбции и биоинтеграции материала в организме реципиента. В свою очередь, добавление биосовместимого кондуктивного компонента обеспечивает заселение материала клетками и построение неоколлагенового матрикса как на фрагментах кондуктора, так и на месте резорбированного гидроксиапатита.

Полученные данные указывают на необходимость использования кондуктивного компонента совместно с нГАп и учета его оптимальной концентрации для снижения степени агломерации нГАп, уменьшения воспалительного ответа организма и повышения степени биоинтеграции материала.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием приборной базы ЦКП ИТЭБ РАН.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Совета по грантам Президента РФ (СП-1275.2019.4) и Фонда содействия инновациям.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными осуществлялись в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 10993-2-2009 и были одобрены этическим комитетом ИТЭБ РАН.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. S. Pankratov, I. S. Fadeeva, V. V. Minaychev, et al., *Genes and Cells* XIII (3), 46 (2018).

2. X. Shi, K. Zhou, F. Huang, et al., *Int. J. Nanomedicine* **13**, 1457 (2018).
3. M. N. Lee, H. S. Hwang, S. H. Oh, et al., *Exp. Mol. Med.* **50**, 142 (2018).
4. N. J. Hallab and J. J. Jacobs, *Bull. Hosp. Jt. Dis.* **67** (2), 182 (2009).
5. P. Laquerriere, A. Grandjean-Laquerriere, S. Addadi-Rebbah, et al., *Biomaterials* **25** (13), 2515 (2004).
6. J. M. Anderson and K. M. Miller, *Biomaterials* **5** (1), 5 (1984).
7. F. Velard, D. Laurent-Maquin, C. Guillaume, et al., *Acta Biomater.* **5** (5), 1708 (2009).
8. V. V. Minaychev, A. T. Teleshev, V. N. Gorshenev, et al., *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*, **347**, 012045 (2018).
9. A. T. Teleshev, V. A. Fomichev, V. N. Gorshenev, et al., *Biomed. Eng.* **52** (1), 19 (2018).
10. А. С. Сенотов, В. С. Акатов, И. С. Фадеева и др., Патент РФ №2686309, Б.И., №12 (2019).
11. Р. А. Полтавцева, Ю. А. Никонова, И. И. Селезнева и др., *Клеточные технологии в биологии и медицине*, № 3, 190 (2014).

## Aggregation of Nanosized Hydroxyapatite Particles and Inhibition of Cell Adhesion on This Bio-Active Material as Key Factors Limiting Its Biointegration

V.V. Minaychev\*, P.O. Kirsanova\*, A.I. Zvyagina\*, A.S. Odintsova\*\*, I.S. Fadeeva\*, and V.S. Akatov\*

*\*\*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

*\*\*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Leninskie Gory 1, 119991 Russia*

Different synthetic calcium phosphate compounds are used as osteoplastic materials for filling of bone defects in surgical reconstruction of bone. Of particular interest is synthetic nanosized hydroxyapatite because of its similarity to the chemical composition of the bone and osteoinductive potential. However, it is also known that nanosized hydroxyapatite can inhibit the processes of biointegration of biomaterials but we have no clear understanding of the mechanisms responsible for this effect. In our *in vitro* studies suppression of cell adhesion on nanosized hydroxyapatite that may lead to anoikis was shown. Studies, in which rat subcutaneous heterotopic implantation methods were used, showed that nanosized hydroxyapatite *in vivo* formed a slightly resorbable agglomerate that blocks cell migration into the material as well as neocollagenesis processes in it, including the processes of encapsulation of the material. In this case, the processes of neocollagenesis along the periphery of the sample were observed only over of a dense layer of dead cells (cellular debris) surrounding the agglomerated nanosized hydroxyapatite. An addition of demineralized bone collagen matrix to nanosized hydroxyapatite as a conductive component contributed to colonization of the material by the cells, resorption of nanosized hydroxyapatite and active construction of the neocollagen matrix. The presented results show that modification of nanosized hydroxyapatite with a conductive component is required in order to prevent its agglomeration and thus increase its biointegration and osteoinductive potential in the body.

*Keywords: osteoplastic materials, nanosized hydroxyapatite, biointegration, adhesion, anoikis*