

ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНОЙ ИНТЕГРАЦИИ В ИНКУБАТОРАХ ИЗ ПОРИСТОГО НИКЕЛИДА ТИТАНА (ТН-1П)Олег Викторович Кокорев¹, Валентина Николаевна Ходоренко¹, Сергей Геннадьевич Анিকেев¹,
Георгий Цыренович Дамбаев², Виктор Эдуардович Гюнтер¹¹Томский государственный университет, Томск, ректор — д.ф.-м.н., проф. Г.В.Майер, НИИ медицинских материалов и имплантатов с памятью формы, директор — д.т.н., проф. В.Э.Гюнтер; ²Сибирский государственный медицинский университет, Томск, ректор — акад. РАМН, д.м.н., проф. В.В.Новицкий, кафедра госпитальной хирургии, зав. — член-корр. РАМН, д.м.н., проф. Г.Ц. Дамбаев)

Резюме. Изучено развитие стандартной популяции клеток — линии фибробластов 3Т3 в пористой структуре инкубатора определенного состава, пористости и распределения пор по размерам. Показано, что объем пористого пространства определяет потенциал деления и функционирования клеток. Проанализирована особенность интеграции клеток фибробластов в пористых инкубаторах из никелида титана разного объема. Установлена взаимосвязь заселения клетками и роста тканей в пористых образцах из никелида титана в зависимости от глубины проникновения.

Ключевые слова: пористо-проницаемый инкубатор, никелид титана, тканевая биоинженерия.

CELLS INTEGRATION FEATURES IN INCUBATORS FROM POROUS TINI-BASED ALLOY (ТН-1П)O.V. Kokorev¹, V.N. Khodorenko¹, S.G. Anikeev¹, G.Ts. Dambaev², V.E. Gunther¹.
(¹Tomsk State University; ²Siberian state Medical University, Tomsk, Russia)

Summary. Developing of standard population of cells — line fibroblasts 3T3 in porous structure of incubator having fixed composition, porosity and pore size distribution has been studied. The volume of scaffold space was shown to determine the potential cell division and its function. The characteristic integration of fibroblasts in porous incubators from TiNi-based alloy having different volumes was analyzed. The relation of colonization by cells and growth of tissues in porous samples from titanium nickel depending on depth of penetration is determined.

Key words: scaffold, titanium-nickel, porous incubator, tissue engineering.

Наиболее перспективными биоинженерными конструкциями для биоинженерии являются объемные трехмерные пористые инкубаторы. Они должны иметь определенную поверхность, обеспечивать начальную адгезию необходимого количества клеток, большое поровое пространство, адекватный размер пор и необходимое распределение пор по размерам для стимуляции пролиферации клеток и повышения их жизнеспособности. Что особенно важно, необходимо взаимосвязанная, открытая (проницаемая) поровая система для обеспечения питания и вывода метаболитов. Физико-механические свойства конструкции инкубатора должны иметь сходные с реальной биологической тканью свойства, предполагающей к замещению [5,8,9]. Среди большого числа наиболее изученных биоматериалов требуемым параметрам удовлетворяют пористые сплавы на основе никелида титана, полученные методом самораспространяющегося высокотемпературного синтеза (СВС) [1,2].

Пористые материалы с проницаемыми порами обеспечивают необходимое пространство для врастания кровеносных сосудов, позволяя тканям образовываться и расти в порах имплантатов. Пористо-проницаемая структура материала особенно необходима на начальных этапах образования тканей для диффузии питательных веществ и вывода метаболитов. Однако конкретная пористость, размер пор, их взаимосвязанность и необходимый объем инкубаторов (скаффолдов) для развития тканей являются индивидуальными, зависящими, к тому же, и от типа клеток [6,7,10]. Выбор определенной комбинации малых и больших пор, т.е. определенного распределения пор по размерам, является необходимым условием для оптимизации роста клеток, их пролиферации и врастания сосудов [9,11].

Создание крупных участков биотканей посредством тканевого инженеринга требует соответствующей техники васкуляризации имплантата, для этого в пористой матрице необходимы связанные каналы для врастания сосудов. Соответственно, проблема доставки питательных веществ и вывода метаболитов для объемных тканеинженерных конструкций является важной задачей. В связи с этим целью работы явилось определение оптимального объема пористого инкубатора, необхо-

димо для наилучшего развития клеток линии 3Т3.

Для исследования данных показателей в пористых матрицах из никелида титана (ТН-1П) проведено сравнение заселения различных по объему инкубаторов клетками — фибробластами линии 3Т3. Фибробласты 3Т3 обладают свойствами мезенхимальных стволовых клеток (адгезия, быстрый рост в культуре), но единообразие и чистота линии могут обеспечить больше воспроизводимых и достоверных результатов по сравнению с мультипотентными мезенхимальными клетками.

Материалы и методы*Пористо-проницаемые инкубаторы.*

Использовали пористо-проницаемые инкубаторы из никелида титана (ТН-1П), разработанные в НИИ медицинских материалов и имплантатов с памятью формы (г. Томск) [1,3,4].

Пористые инкубаторы размерами 0,4×10×10мм и 1×10×10мм, с проницаемой пористостью 60-70% получены методом СВС. Для исследования глубины проникновения фибробластов использовали плоские пористые диски размером 15×15мм с аналогичными параметрами пористости. Образцы стерилизовали в сухожарочном шкафу при 180 °С в течение 30 мин. Перед испытанием инкубаторы охлаждали и помещали в полную культуральную среду.

Культивирование клеток линии 3Т3.

Клетки 3Т3-фибробласты культивировались в культуральных флаконах «Nunc» в полной культуральной среде. Клетки в суспензии 50×10³ клеток/мл засевали на образцы и содержали их при 37°С, в условиях 100% влажности, с 5% CO₂, в течение 9 суток.

Сканирующая электронная микроскопия.

Тонкие секции образцов были зафиксированы в течение 1 часа в 2,5% глутаральдегиде (SIGMA), затем промыты 3 раза в PBS (15 мин. каждый). Далее фиксировали 1 час в 1% тетраоксиде осмия (SIGMA), промыли 3 раза в PBS и затем дегидратировали, пропуская через ряд растворов этанола (30%, 50%, 70%, 90%, 100%) по 15 минут в каждом. Фиксированные и дегидратированные образцы были высушены, каждый образец ин-

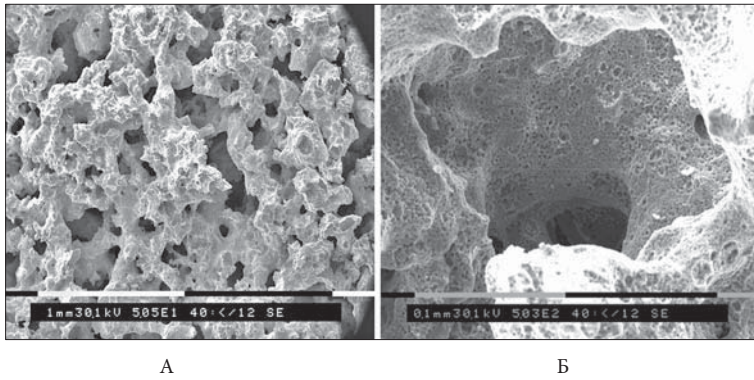


Рис. 1. Структура пористого проникаемого инкубатора из никелида титана
А — макроструктура; Б — микроструктура стенок пор

кубатора был исследован на растровом сканирующем электронном микроскопе Quanta 200 3D.

Статистическую обработку выполняли с использованием пакета статистических компьютерных программ «Statistica-6». По данным проверки критерием Колмогорова-Смирнова закон распределения числовых показателей отличался от нормального, поэтому различия изучаемых признаков проверяли при помощи непараметрического U-критерия Манна-Уитни (попарные сравнения независимых совокупностей показателей). За статистически значимое принималось значение $p < 0,05$.

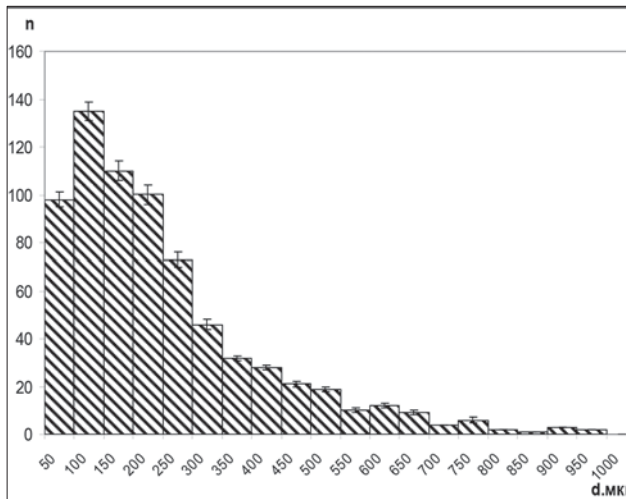


Рис. 2. Гистограмма распределения пор по размерам для образцов (n=15) со средними размерами пор 150 мкм.

Результаты и обсуждение

Структура клеточного инкубатора из пористо-проницаемого никелида титана представляет собой трехмерное поровое пространство, морфологическое строение которого типично для высокопористых материалов, полученных с участием жидкой фазы. Пористый материал имеет большую удельную поверхность, обусловленную наличием в нем системы открытых и взаимосвязанных пор (рис.1,а). За счет открытых пор (более 90%) и гидрофильной поверхности материал обладает высокой степенью проницаемости. Стенки пор имеют рельефную и шероховато-нанопористую поверхность (рис.1,б).

Пористость исследуемого материала составляла 60-70%, размеры пор в диапазоне $10^{-1} - 10^3$ мкм, распределением пор по размерам представлено на рис.2.

При сравнительных исследованиях тонких (0,4 мм) и утолщенных (1 мм) пористых образцов показано, что рост фибробластов в более тонких пористых образцах в течение всего периода культивирования идет

более активно. Это объясняется изначально увеличением концентрации клеток в малом объеме образца. При этом отмечено, что крупные поры в тонких образцах зарастают медленнее по сравнению с утолщенными образцами. Это говорит о несостоятельности фибробластов в короткий промежуток времени обволакивать большие открытые поры тонкого образца или невозможности создания в больших открытых порах необходимой концентрации ростовых факторов. По сравнению с утолщенными образцами, где пространство в таких порах замкнуто и ограничено, возникает большая возможность создания локально ростовых факторов необходимой концентрации (рис.3).

На рис. 4а показано развитие тканевой структуры фибробластами на глубине 1 мм от поверхности на 9-е сутки после засева клеточной суспензии на образец. По мере увеличения глубины проникновения в пористую структуру инкубатора отмечали уменьшение как темпов роста фибробластов и межклеточного вещества, так и уменьшение количества клеточной массы. На глубине 2 мм видны завершающие этапы формирования монослоя с незаполненным поровым пространством (рис.4б).

На глубине 3 мм от поверхности образца наблюдали редкие очаги новообразованной ткани (рис.5а), а более 4 мм — лишь отдельные прикрепившиеся клетки (рис. 5б).

Необходимо подчеркнуть, что технически трудной задачей является откорректировать распределение клеток во всем пористом пространстве инкубатора. Распределение оседающих из суспензии клеток будет неравномерным: основная масса клеток под действием сил гравитации будет оседать на верхней поверхности образца и, соответственно, наиболее интенсивный процесс роста ткани будет идти в верхних поверхностных слоях инкубатора, что и показала наша работа. Таким образом, наиболее высокая концентрация клеток находится на глубине до 2 мм от верхней поверхности и соответствующее развитие тканей здесь усилено. Глубже 2 мм от поверхности изначально засеянное количество фибробластов снижается и развитие тканевых структур происходит гораздо медленнее. Следовательно, при спонтанном насыщении пористых инкубаторов из никелида титана клетками размер инкубатора должен быть ограничен 3-мя мм от поверхности.

Таким образом, показано, что объем пористого пространства определяет потенциал деления и функционирования клеток. В более тонких материалах плотность клеток больше и, соответственно, процесс инициализации роста гораздо выше. Однако в тонких образцах крупные поры, имеющие большое открытое пространство, заселяются фибробластами медленнее, чем крупные поры в толстых образцах, имеющих чаще всего замкнутую пространственную конфигурацию. Таким образом, регулируя толщину инкубатора, можно ре-

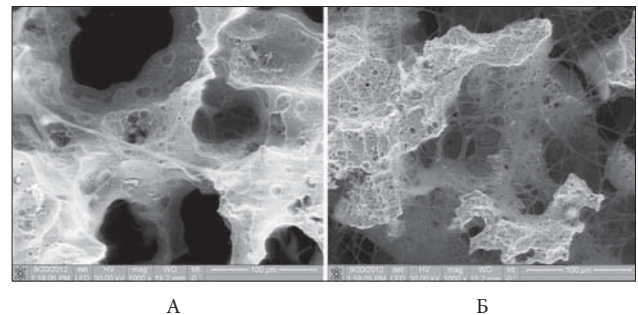
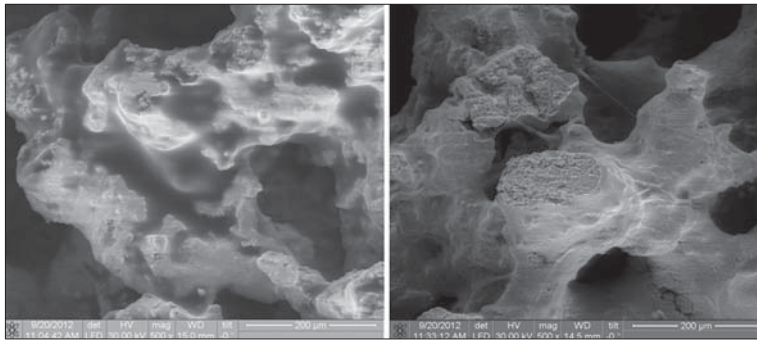


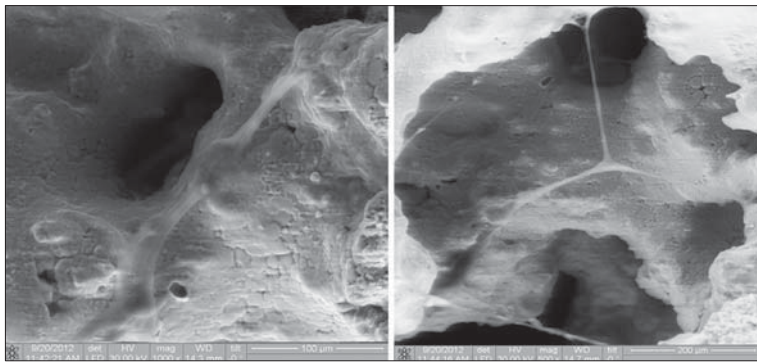
Рис. 3. Рост клеток фибробластов: А — на тонких образцах (0,4мм), Б — на утолщенных образцах (1мм), после 3-х суток культивирования.



А

Б

Рис. 4. Образование тканевой структуры фибробластами: А — на глубине в 1 мм; Б — завершающие этапы формирования монослоя на глубине в 2 мм (9 сутки).



А

Б

Рис. 5. Образование тканевой структуры фибробластами: А — на глубине 3 мм, Б — на глубине 4 мм (9-е сутки).

гулировать механизм пролиферации клеток. Тонкие пористые материалы могут найти применение для экстренной замены дифференцированных тканей, а объемные конструкции могут использоваться в увеличении необходимой недифференцированной клеточной массы, при патологических состояниях, не требующих быстрого восстановления органа или ткани.

Установлено, что образование ткани идет в поверхностных слоях инкубатора гораздо быстрее и интервал нестимулированного клеточного заселения составляет около 3-х мм от поверхности для данного материала.

Информация об авторах: Кокорев Олег Викторович — научный сотрудник, к.м.н.,

634034, г.Томск, ул. 19-Гв.дивизии, 17, тел. (3822) 413815, факс. (3822) 413442, e-mail: kokorevov@yandex.ru; Ходоренко Валентина Николаевна — старший научный сотрудник, к.ф.-м.н.; Анисеев Сергей Геннадьевич — аспирант; Дамбаев Георгий Цыренович — член-корреспондент РАМН и РАГН, доктор медицинских наук, профессор кафедры; Гюнтер Виктор Эдуардович — директор, д.т.н., профессор.

Использование конструкций инкубаторов, имеющих большие размеры, терапевтически неэффективно, так как это приведет или к более долгому заселению имплантированными клетками поровых пространств инкубатора, или даст возможность заселять эти поры ненужными клетками организма-хозяина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гюнтер В.Э., Ходоренко В.Н., Чекалкин Т.Л. и др. Медицинские материалы с памятью формы. Медицинские материалы и имплантаты с памятью формы / Под ред. В.Э. Гюнтера. — Томск: Изд-во «НПП МИЦ», 2011. — Т.1. — 534 с.
2. Материалы с памятью формы и новые медицинские технологии / Под ред. В.Э. Гюнтера. — Томск: Изд-во «НПП МИЦ», 2010. — 360с.
3. Пат. №2191607, РФ. Носитель клеточных культур искусственных внутренних органов / Гюнтер В.Э., Дамбаев Г.Ц., Ходоренко В.Н., Загребин Л.В., Хлусов И.А., Ясенчук Ю.Ф. Опубл. в БИ. 2002. №30.
4. Пат. №2200205, РФ. Пористый проницаемый сплав на основе никелида титана / Гюнтер В.Э. Опубл. в БИ. 2003. №7
5. Bettinger C.J., Bruggeman J.P., Misra A., et al. Biocompatibility of biodegradable semiconducting melanin films for nerve tissue engineering // *Biomaterials*. — 2009. — Vol.30. №17. — P. 3050-3057.
6. Harley A.C., Kim H.-D., Zaman M.H., et al. Micro-architecture of three-dimensional scaffolds influences cell migration behavior via junction interactions // *Biophys. J.* — 2008. — Vol.95. — P. 4013-4024.
7. Karageorgiou V., Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis // *Biomaterials*. — 2005. — Vol.26. №27. — P. 5474-5491.
8. Mitravotri S., Lahann J. Physical approaches to biomaterial design // *Nature Mater.* — 2009. — №8. — P. 15-23.
9. Murphy C. M., Haugh M. G., O'Brien F. J. Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds // *Cell Adhesion & Migration* Vol. 4. №3. — 2010. — P. 377-381.
10. O'Brien F.J., Harley B.A., Yannas I.V., et al. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds // *Biomaterials*. — 2005. — Vol.26. №4. — P.433-441.
11. Peroglio M., Gremillard C., Gauthier C., et al. Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives // *Acta Biomater.* — 2010. — Vol.31. №7. — P. 4369-4377.