

УДК 611.018.4+615.466

МАТРИЦЫ-НОСИТЕЛИ В ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ КОСТНОЙ ТКАНИ**Терещенко В.П., Кирилова И.А., Ларионов П.М.***ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна», Новосибирск, e-mail: tervp@ngs.ru*

Для производства тканеинженерного эквивалента костной ткани целесообразно повторение состава естественного внеклеточного матрикса кости в клеточной матрице для обеспечения оптимальных условий для жизнедеятельности клеток, а также для создания выгодных физико-механических свойств конечной конструкции. В статье выполнен анализ наиболее перспективных материалов для изготовления клеточных матриц. Биodeградируемые синтетические полимеры служат основой для матрицы, но в одиночку не могут обеспечить должных физико-механических свойств конструкции и выгодных условий для жизнедеятельности клеток. Добавление белков существенно улучшает прочностные характеристики и биореактивность конструкции. Из неорганических соединений наиболее широкое применение для создания клеточных матриц получили кальцийфосфаты, которые придают конструкции должную жесткость, а также существенно повышают ее остеоиндуктивную способность. Сигнальные молекулы не влияют на физико-механические свойства матрицы, но выгодно воздействуют на процессы адгезии, пролиферации и дифференцировки клеток.

Ключевые слова: тканевая инженерия костной ткани, клеточная матрица, биodeградирующие синтетические полимеры, натуральные полимеры, неорганические соединения костного матрикса, сигнальные молекулы

SCAFFOLDS-CARRIERS IN BONE TISSUE ENGINEERING**Tereschenko V.P., Kirilova I.A., Larionov P.M.***Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics n.a. Y.L. Tsivyan, Novosibirsk, e-mail: tervp@ngs.ru*

For production of tissue engineered bone equivalent advisable to create scaffolds similar in composition to natural extracellular matrix of the bone. This will provide optimal conditions for the cells, and produce favorable physico-mechanical properties of the final construction. This review article gives an analysis of the most promising materials for the manufacture of cell scaffolds. Biodegradable synthetic polymers are the basis for the scaffold, but it alone can not provide adequate physical and mechanical properties of the construction, and favorable conditions for the cells. Adding natural polymers improves the strength characteristics and bioactivity of constructions. Of the inorganic compounds, to create cell scaffolds the most widely used calcium phosphates, which give the structure adequate stiffness and significantly increase its osteoinductive capacity. Signaling molecules do not affect the physico-mechanical properties of the scaffold, but beneficial effect on the processes of adhesion, proliferation and differentiation of cells. Biodegradation of the materials will help to fulfill the main task of bone tissue engineering – the ability to replace synthetic construct by natural tissues that will restore the original anatomical integrity of the bone.

Keywords: bone tissue engineering, scaffold, biodegradable synthetic polymers, natural polymers, inorganic compounds of bone matrix, signaling molecules

Кость является твердым органом, состоящим из костной ткани, костного мозга, эндооста, периоста, хряща, нервов и кровеносных сосудов. Состав и строение кости напрямую зависят от ее локализации, прилагаемой нагрузки, возраста и пола индивида, а также заболеваний, которые он мог перенести. Являясь композитной структурой, кость на 70% состоит из минеральной фазы, на 9% из воды, оставшиеся 20% занимает органический матрикс из коллагена и других белков, 1% составляют клеточные элементы [1].

Минеральная фаза кости состоит из кальцийфосфата – гидроксипатита, представленного в виде нанокристаллов размером от 8–10 до 50 нм. 90% органической фазы костной ткани представлено коллагеном I типа, в виде волокон, формирующих тяжи, толщина которых исчисляется в нанометрах.

Именно такое композитное строение обеспечивает уникальные физико-механи-

ческие свойства кости – прочность и эластичность. Характеристика данных свойств приведена в табл. 1.

С целью создания матрицы для тканевой инженерии костной ткани необходимо использовать материалы, способные наиболее приближенно имитировать физико-механические свойства натуральной костной ткани.

В аналитическом исследовании от 2015 года компьютерными методами были проанализированы 1458 статей по тематике тканевой инженерии костной ткани. Результат показал, что наиболее часто при производстве матриц к синтетическим биоразлагаемым полимерам добавляют: белки естественного внеклеточного матрикса кости, кальцийфосфаты и факторы роста [35]. Более перспективные из перечисленных материалов будут описаны ниже.

Таблица 1
Физико-механические свойства компактной и губчатой кости [6, 11].

Показатели	Компактная кость	Губчатая кость
Предел прочности при растяжении	50–150 МПа	10–100 МПа
Прочность при сжатии	130–230 МПа	2–12 МПа
Модуль продольной упругости (модуль Юнга)	7–30 ГПа	0,02–0,5 ГПа
Растяжение до разрыва	1–3 %	5–7 %
Модуль сдвига	3 ГПа	3 ГПа

Синтетические полимеры

Синтетические полимеры по сравнению с другими материалами обеспечивают огромную гибкость синтеза разнообразных конструкций и их модифицирования. Биоактивность этих полимеров очень мала, что позволяет устранить неблагоприятные воздействия на организм.

Для производства тканеинженерного аналога костной ткани наибольшее распространение получили полилактид (в D и L хиральных формах) [3, 25], полилактид-когликолид [15], поликапролактон [32], полипропилен фумарат [27], полиэтилен гликоль [33], полиэтилен оксид [31].

Все перечисленные полимеры отличаются по своим физико-механическим, химическим и биологическим свойствам. Характеристики основных из них представлены в табл. 2.

Натуральные полимеры и их мономеры

Целью добавления **натуральных полимеров и их мономеров** к синтетическим полимерам является имитация свойств натурального внеклеточного матрикса кости. В целом **натуральные полимеры и их мономеры** являются биоактивными веществами, что положительно сказывается на адгезии, пролиферации и дифференцировке клеток на конструкциях. На данный момент широкое распространение в тканевой инженерии костной ткани получили такие вещества, как хитозан [27], коллаген [18], желатин [10], эластин [12], шелк [14]. Хорошо изучено их влияние как на свойства конструкции, так и поведение клеток.

В недавних исследованиях показана возможность применения и минорных белков натуральной костной ткани, среди которых фибронектин и остеокальцин [38].

Таблица 2
Основные характеристики синтетических полимеров [5, 26, 28]

Материал	Прочность при сжатии/растяжении (МПа)	Модуль Юнга (ГПа)	Элонгация (%)	Температура плавления (°C)	Период биодegradации (месяцы)
Поли-L-лактид	28–2300	4,8	5–10	175	24–68
Поли-D,L-лактид	29–150	1,9	3–10	165–180	12–16
Полигликолид	350–920	12,5	15–20	200	6–12
Полилактид-когликолид (85/15)	41,4–55,2	2,0	3–10	–	5–6
Полилактид-когликолид (50/50)	41,4–55,2	2,0	3–10	–	1–2
Поликапролактон	23	0,4	300–500	57	> 24

Синтетические полимеры используются как основа для матриц, в которую возможно добавление адъювантов существенно изменяющих физико-механические свойства конструкций, а также поведение на них клеток. Постепенная биодegradация такой основы должна обеспечить возможность замещения конструкции естественной тканью организма.

Натуральные полимеры и их мономеры применяются в тканевой инженерии костной ткани как адъювантные вещества. Массовая доля их в конструкции обычно не превышает 10 %. Однако даже такого количества достаточно для существенного улучшения свойств самой конструкции, а также для создания оптимальных условий для жизнедеятельности

клеток по сравнению с чистыми синтетическими полимерами.

Кальцийфосфаты и другие неорганические соединения

Кальцийфосфаты являются семейством минералов, содержащих ионы Ca^{2+} и PO_4^{3-} . Данные соединения в большом количестве содержатся в натуральном внеклеточном матриксе кости, что обеспечивает его жесткость. Кальцийфосфаты, являясь биоактивным материалом, способствуют экспрессии генов, отвечающих за остеогенную дифференцировку клеток. Вдобавок показана возможность кумулирования в кальцийфосфатах различных сигнальных молекул, что придает материалу остеоиндуктивные свойства [34].

В тканевой инженерии костной ткани кальцийфосфаты используются как самостоятельное вещество, формирующее матрицу с различной пористостью, как адъювант к синтетическим полимерам с целью улучшения механических свойств конструкции, как модификатор поверхности для металлических изделий [2].

Наибольшее распространение в тканевой инженерии получили гидроксиапатит [19] (в т.ч. и наногидроксиапатит), β -трикальцийфосфат [13] и карбонат кальция [7].

Перечисленные вещества могут использоваться в тканеинженерных конструкциях в виде порошков, нанопорошков, цементов, а также покрытий.

Среди других неорганических соединений в тканевой инженерии широкое распространение получили соединения различных металлов: MgO, SrO, Au. Являясь естественными минорными соединениями костной ткани, данные материалы положительно влияют на пролиферацию и дифференцировку клеток в конструкциях, предположительно за счет возникновения электромагнитных стимулов. Для золотых наночастиц показаны различные эффекты на культуры клеток в зависимости от валентности металла [36, 22].

Так же показано положительное влияние и неметаллов на жизнедеятельность клеток в культуре. С данными целями были исследованы кремний [23] и бор [16]. Оба вещества показали положительное влияние на адгезию, пролиферацию и дифференцировку клеток. Остеоиндуктивные свойства бора оказались крайне высокими.

Сигнальные молекулы

Сигнальные молекулы являются веществами, регулирующими в организме про-

цессы на клеточном уровне. Таким образом, добавление таких материалов в биодеградирующие матрицы для тканевой инженерии костной ткани способно направить клетки по костному пути развития и усилить их адгезию и пролиферацию.

В тканевой инженерии костной ткани наибольшее распространение получили белки семейства костного морфогенетического белка (bone morphogenetic protein, BMP). BMP ответственны за пролиферацию хондро- и остецитов, а также увеличивают продукцию этими клетками внеклеточного матрикса. BMP поддерживают дифференцирование стволовых клеток по остеогенному пути. BMP 2, 4, 7 вызывают наработку внеклеточного матрикса *in vitro*. BMP 1–3 увеличивают выработку клетками коллагена I типа и остеокальцина. Исследования с заключением BMP в биодеградирующую матрицу показали, что добавление данной сигнальной молекулы вызывает образование костной ткани внутри конструкции [6, 9, 17, 24].

Факторы роста фибробластов (Fibroblast growth factors, FGFs) стимулируют пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток, остеобластов и хондробластов. FGF способствуют образованию различных тканей в связи с их ангиогенным потенциалом. FGF-2 наиболее изученный цитокин в тканевой инженерии костной ткани [9].

Инсулиноподобные факторы роста (Insulin-like growth factors, IGFs) способствуют пролиферации хондро- и остеобластов, а также стимулируют секрецию естественного внеклеточного матрикса обоими типами клеток. IGF вызывает синтез коллагена и минерализацию внеклеточного матрикса в костной ткани [30].

Факторы роста, полученные из тромбоцитов (Platelet-derived growth factors, PDGFs), усиливают пролиферацию хондро- и остеобластов. Однако имеют дозозависимый эффект. Так, при определенных концентрациях их эффект носит резорбтивный характер по отношению к костной ткани. PDGFs действует как митотический фактор в отношении остеобластов и других типов клеток [9].

Трансформирующий фактор роста – β (Transforming growth factoris- β , TGFs- β) вызывает дифференцирование мезенхимальных стволовых клеток в хондроциты, также оказывает положительное влияние на пролиферацию хондро- и остеобластов. Так же как и PDGF, в определенных концентрациях может оказывать резорбтивное действие на костную ткань, что связано с его ролью

в регуляциях процессов образования и резорбции костной ткани [11].

RGD белки, содержащие в себе последовательность Аргинин – Глицин – Аспарагиновая кислота, являются белками клеточной адгезии и вызывают прикрепление к себе остеобластов и дальнейший остеогенез. Добавление RGD белков в конструкцию существенно повышает адгезию, пролиферацию клеток, а также способствует их дифференцировке по остеогенному пути, вызывает усиленное отложение внеклеточного матрикса [37].

Таким образом, сигнальные молекулы, являясь высоко биоактивными естественными соединениями, оказывают сильнейшее влияние на жизнедеятельность клеток на матрицах. Однако их воздействие на физико-механические свойства конструкции настолько мало, что не берется учеными в расчет.

Заключение

На сегодняшний день технологии тканевой инженерии костной ткани позволяют создавать клеточные матрицы, достаточно приближенные по своему составу к композитному натуральному внеклеточному матриксу кости, что создает благоприятные условия для адгезии, пролиферации и дифференцировки клеток различных линий, а также обеспечивает выгодные физико-механические свойства конструкции.

Группы материалов, использующихся в тканевой инженерии костной ткани, повторяют группы веществ, содержащихся в натуральном внеклеточном матриксе кости. Наиболее широкое распространение для создания тканеинженерного эквивалента костной ткани получили синтетические биоразлагаемые полимеры, натуральные белки, неорганические соединения и сигнальные молекулы. Добавление веществ из каждой группы существенно влияет на свойства конечной продукции. Такой «композитный» подход поможет обеспечить выгодные физико-механические свойства конечных клеточных матриц, а также создаст оптимальные условия для адгезии, пролиферации и дифференцировки клеточных элементов внутри конструкции. Биодegradация применяемых материалов поможет обеспечить выполнение главной задачи тканевой инженерии костной ткани – возможность замещения конструкций естественными тканями организма, что приведет к восстановлению исходной анатомической целостности кости.

Ввиду большого количества нарабатанных материалов и методов, возможных к применению на данный момент, дальнейшее производство должно двигаться по пути тщательной отработки протоколов создания готовой продукции, содержание которых будет зависеть от конкретного создаваемого вида конструкций.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ проекта № 15-29-04849.

Список литературы

1. Костно-пластические биоматериалы и их физико-механические свойства / И.А. Кирилова, В.Т. Подорожная, Е.В. Легостаева, Ю.И. Шаркеев, П.В. Уваркин, А. М. Аронов // Хирургия позвоночника. – 2010. – № 1. – С. 81–87. Электронный ресурс: http://www.spinesurgery.ru/netcat_files/481/425/h_9ad0c11ddb8d161fa2d3f89d5b689225.
2. A cellular perspective to bioceramic scaffolds for bone tissue engineering: the state of the art / T. Guda, M. Appleford, S. Oh, J.L. Ong // Current Topics in Medicinal Chemistry. – 2008. – Vol.8. – P. 290–299.
3. A Comparative Study on In Vitro Osteogenic Priming Potential of Electron Spun Scaffold PLLA/HA/Col, PLLA/HA, and PLLA/Col for Tissue Engineering Application/ H.R.B. Raghavendran, S. Puvaneswary, S. Talebian, M.R. Murali et. Al // PloS One. – 2015. – Vol. 9. – P. 16.
4. Bandyopadhyay A., Ghosh P., Bone as a collagen-hydroxyapatite composite and its repair // Trends in Biomaterials and Artificial Organs. – 2008. – Vol. 22. – P. 116–124.
5. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering / S.Wu, X. Liu, K.W.K. Yeung, C. Liu, X. Yang // Materials Science and Engineering R: Reports. – 2014. – Vol. 80. – P. 1–36.
6. Bone regeneration using a microstereolithography-produced customized poly(propylene fumarate)/diethyl fumarate photopolymer 3D scaffold incorporating BMP-2 loaded PLGA microspheres / J.W. Lee, K.S. Kang, S.H. Lee, J.-Y. Kim, B.-K. Lee, D.W. Cho // Biomaterials. – 2011. – Vol.32. – P. 744–752.
7. Bohner M. Resorbable biomaterials as bone graft substitutes // Materials Today. – 2010. – Vol. 13. – P. 24–30.
8. Bai Y., Yin G., Huang Z. Localized delivery of growth factors for angiogenesis and bone formation in tissue engineering // International Immunopharmacology. – 2013. – Vol. 16. – P. 214–223.
9. Bai Y., Yin G., Huang Z. Localized delivery of growth factors for angiogenesis and bone formation in tissue engineering // International Immunopharmacology. – 2013. – Vol. 16. – P. 214–223.
10. Deng C., Zhang P., A Collagen–Chitosan Hydrogel for Endothelial Differentiation and Angiogenesis // TISSUE ENGINEERING. – 2010. – Vol. 16. – P. 3099–3109.
11. Effect of different growth factors on human osteoblasts activities: a possible application in bone regeneration for tissue engineering / M. Bosetti, F. Boccafoschi, M. Leigheb, M.F. Cannas // Biomolecular Engineering. – 2007. – Vol. 24. – P. 613–618.
12. Elastin-Coated Biodegradable Photopolymer Scaffolds for Tissue Engineering Applications / R. Barenghi, S. Beke, I. Romano, P. Gavazzo et al. // BioMed Research International. – 2014. – P. 9.
13. Electrospun composite poly(L-lactic acid)/tricalcium phosphate scaffolds induce proliferation and osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells / S.D. McCullen, Y. Zhu, S.H. Bernacki, R.J. Narayan, B. Pourdeyhimi, R.E. Gorga, E.G. Lobo // BIOMEDICAL MATERIALS. – 2009. – Vol. 4. – P. 9.
14. Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering / C. Li, C. Vepari, H. Jin, H.J. Kim, D.L. Kaplan // Biomaterials. – 2006. – Vol. 27. – P. 3115–3124.
15. Fabrication and characterization of 3-dimensional PLGA nanofiber/microfiber composite scaffolds / S.J. Kim,

- D.H. Jang, W.H. Park, B. Min // *Polymer*. – 2010. – Vol. 51. – P. 1320–1327.
16. Gumusderelioglu M., Tuncay E.O., Encapsulated boron as an osteoinductive agent for bone scaffolds // *Trace Elements*. – 2015. – P. 32.
17. Grgurevic L., Macek B., Mercep M., Bonemorphogenetic protein (BMP) 1–3 enhances bone repair // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2011. – Vol. 408. – P. 25–31.
18. Gautam S., Dinda A.K., Mishra N.C. Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method // *Materials Science and Engineering C*, 2013. – Vol. 33. – P. 1228–1235.
19. Haider A., Gupta K.C., Kang I. PLGA/nHA hybrid nanofiber scaffold as a nanocargo carrier of insulin for accelerating bone tissue regeneration // *Nanoscale Research Letters*. – 2014. – Vol. 9. – P. 12.
20. Kaigler D., Avila G., Wisner-Lynch L. Platelet-derived growth factor applications in periodontal and peri-implant bone regeneration // *Expert Opinion on Biological Therapy*. – 2011. – Vol. 11. – P. 375–385.
21. Knudson D., *Fundamentals of Biomechanics* // Springer, Boston, Mass, USA. – 2007.
22. Li J.J., Kawazoe N., Chen G. Gold nanoparticles with different charge and moiety induce differential cell response on mesenchymal stem cell osteogenesis // *Biomaterials*. – 2015. – P. 11.
23. Luo Z., Denga Y., Zhang R. Peptide-laden mesoporous silica nanoparticles with promoted bioactivity and osteodifferentiation ability for bone tissue engineering // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2015. – Vol. 131. – P. 73–82.
24. Lee J.-Y., Choo J.-E., Choi Y.-S. Osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells in self-assembled BMP-2 receptor-binding peptide-amphiphiles // *Biomaterials*. – 2009. – Vol. 30. – P. 3532–3541.
25. Melchels F.P.W., Feijen J., Grijpma D.W. A poly(D,L-lactide) resin for the preparation of tissue engineering scaffolds by stereolithography // *Biomaterials*. – 2009. – Vol. 30. – P. 3801–3809.
26. Middleto J.C., Tipton A.J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices // *Biomaterials*. – 2000. Vol. 21. – P. 2335–2346.
27. Moreau J.L. Xu H.H.K. Mesenchymal stem cell proliferation and differentiation on an injectable calcium phosphate – Chitosan composite scaffold // *Biomaterials*. – 2009. – Vol. 30. – P. 2675–2682.
28. Maurus P.B., Kaeding C.C. Bioabsorbable implant material review // *Operative Techniques in Sports Medicine*. – 2004. – Vol. 12. – P. 158–160.
29. McCarthy T.L., Centrella M., Canalis E. Insulin-like growth factor (IGF) and bone // *Connective Tissue Research*. 1989. – Vol. 20. – P. 277–282.
30. Nanofibrous Chitosan-Polyethylene Oxide Engineered Scaffolds: A Comparative Study between Simulated Structural Characteristics and Cells Viability / M.K. Pilehrood, M. Dilamian, M. Mirian, H. Sadeghi-Aliabadi, L. Maleknia, P. Nousiainen, A. Harlin // *BioMed Research International*. – 2014. – P. 9.
31. Poly (propylene fumarate) bone tissue engineering scaffold fabrication using stereolithography: effects of resin formulations and laser parameters / Lee K.-W., Wang S., Fox B.C., Ritman E.L., Yaszemski M.J., Lu L. // *Biomacromolecules*. – 2007. – Vol. 8. – P. 1077–1084.
32. Preparation of poly(ϵ -caprolactone)-based tissue engineering 3D-printed scaffolds / T. Serra, M. Ortiz-Hernandez, R. Hakala, H. Korhonen, D.W. Grijpma, J.V. Seppälä // *Acta Biomaterialia*. – 2011. – Vol. 7. – P. 3850–3856.
33. Relevance of PEG in PLA-based blends for tissue engineering 3D-printed scaffolds / T. Serra, M. Ortiz-Hernandez, E. Engel, J.A. Planell, M. Navarro // *Materials Science and Engineering C*. – 2014. – Vol. 38. – P. 55–62.
34. S. Samavedi, A. R. Whittington, A. S. Goldstein, Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior // *Acta Biomaterialia*. – 2013. Vol.9. – P. 8037–8045.
35. Smart scaffolds in bone tissue engineering: A systematic review of literature / S.R. Motamedian, S. Hosseinpour, M.G. Ahsaie, A. Khojasteh // *World Journal of Stem Cells*. – 2015. – Vol. 7. – P. 657–668.
36. Understanding in vivo response and mechanical property variation in MgO, SrO and SiO₂ doped β -TCP / S. Bose, S. Tarafder, S.S. Banerjee, N.M. Davies, A. Bandyopadhyay // *Bone*. – 2011. – Vol. 48. – P. 1282–1290.
37. Venkatesan J., Bhatnagar I., Manivasagan P., Kang K., Kim S. Alginate composites for bone tissue engineering: A review // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2014. – P. 64.
38. Won J., Yun Y., Jang J. Multifunctional and stable bone mimic proteinaceous matrix for bone tissue engineering // *Biomaterials*. – 2015. – Vol. 56. – P. 46–57.