

УДК 616.314-089.843:611.018.4+615.464:666.597.001.365+546.28

МАЛАНЧУК В.О.<sup>1</sup>, ПАНЧЕНКО Л.М.<sup>2</sup>, ЖУКОВЦЕВА О.І.<sup>1</sup>, КИСЕЛЬОВ В.С.<sup>3</sup>, ЧЕПУРНИЙ Ю.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ

<sup>2</sup>ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», м. Київ

<sup>3</sup>Інститут фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова НАН України, м. Київ

## ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ БІОМОРФНОЇ КЕРАМІКИ НА ОСНОВІ КАРБІДУ КРЕМНІЮ НА КУЛЬТУРУ ОСТЕОГЕННИХ КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ КІСТКОВОГО МОЗКУ

**Резюме.** У роботі досліджено взаємодію біоморфної кераміки на основі карбїду кремнію з культурою остеогенних клітин-попередників кісткового мозку людини. Установлено, що остеогенні стромальні клітини-попередники кісткового мозку людини при взаємодії з біоморфною керамікою на основі карбїду кремнію виявили здатність до проліферації та диференціації з формуванням колоній, причому приріст багаточисельних у середньому становив  $43,0 \pm 8,5$  %, що свідчить про відсутність цитотоксичності досліджуваного матеріалу. Ефективність клонування колонієутворюючих одиниць фібробластів у присутності біо-SiC становила  $22,6 \pm 5,9$  колоній, що вказує на відсутність негативного впливу досліджуваного матеріалу на структуроутворюючий потенціал стромальних фібробластів.

**Ключові слова:** біоморфна кераміка, карбїд кремнію, стромальні фібробласти, імплантаційний матеріал.

### Вступ

Одним із актуальних питань сучасного медичного матеріалознавства є пошук і розробка нових імплантаційних матеріалів для розширення арсеналу лікувальних засобів при усуненні посттравматичних кісткових дефектів та деформацій. Проведення хірургічних утручань часто вимагає застосування штучних матеріалів як фіксаторів кісткових фрагментів, опор для утримання форми чи каркасу при заміщенні кісткового дефекту тощо.

Потенційно перспективний вид біоморфної кераміки для усунення посттравматичних дефектів та деформацій, створений відповідно до принципів біоміметики, розроблено в Інституті фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова НАН України шляхом просочування кремнієм каналних вуглецевих матриць, що отримують внаслідок піролізу (обвуглювання) різних сортів деревини. Використання вуглецевої матриці біологічного об'єкту дозволяє отримати матеріал, псевдоморфний цьому об'єкту, який має аналогічну біологічному зразку структуру на мікро-, мезо- та макрорівнях. Такі природні ієрархічні пористі структури мають високий рівень складності, який недоступний при інших сучасних технологіях їх виготовлення [2, 7].

Першочерговим завданням дослідження біосумісності будь-якого матеріалу є вивчення ступеня його токсичності щодо живих клітин організму. Відсутність руйнуючої дії на клітини та токсичного впливу на макроорганізм є однією з головних вимог до матеріалів,

що планують використовувати для виготовлення імплантатів різного призначення. Важливою ознакою біологічної сумісності імплантаційного матеріалу слід вважати здатність живих клітин розмножуватись та функціонувати в його присутності, оскільки дана властивість живих клітин залежить від впливу оточуючого середовища.

Однією з ефективних моделей дослідження цитотоксичності та біосумісності імплантаційного матеріалу, наближеною до умов *in vivo*, є методика клонування колонієутворюючих одиниць фібробластів (КУОф). Даний метод дозволяє вивчити взаємодію імплантаційних матеріалів та остеогенних клітин-попередників кісткового мозку *in vitro*, їх вплив на перебіг клітинної проліферації та диференціації, зробити висновок про наявність чи відсутність цитотоксичного впливу досліджуваного матеріалу на клітини [4].

**Мета дослідження.** У даній роботі ми ставили за мету дослідити вплив нового імплантаційного матеріалу, біоморфної кераміки на основі карбїду кремнію (біо-SiC), на диференціацію та проліферацію культури

Адреса для листування з авторами:

Чепурний Юрій Володимирович

E-mail: 80667788837@ukr.net

© Маланчук В.О., Панченко Л.М., Жуковцева О.І.,

Кисельов В.С., Чепурний Ю.В., 2015

© «Травма», 2015

© Заславський О.Ю., 2015

клітин стромальних фібробластів, на основі чого оцінити ступінь її цитотоксичності.

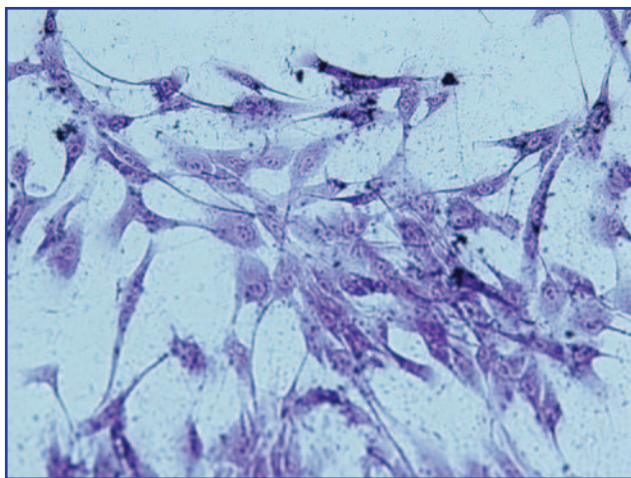
### Об'єкт і методи дослідження

Для досягнення поставленої мети нами використано методику клонування *in vitro* за А.Я. Фріденштейном (1973) [3, 5] у модифікації В.С. Астахової (1982) [1].

Забір спонгіози для дослідження проводився з крила клубової кістки пацієнтів ортопедичного профілю поза вогнищем запалення чи дегенеративно-дистрофічних процесів кісткової тканини згідно з Гельсінської декларацією. Клітини кісткового мозку зі спонгіозної кістки вимивали в середовищі 199 на магнітній мішалці, потім за допомогою камери Горяєва проводили підрахунок вимитих ядровмісних клітин з об'єму зразка спонгіози, що вивчався. Об'єм останнього визначався за об'ємом рідини, що була витіснена. Підсадку кістковомозкових клітин проводили в чашках Петрі (діаметр дна 10 см) з розрахунку  $5 \times 10^3$  на  $1 \text{ cm}^2$  дна чашки. Як фідер використовували летально опромінені (50–60 Гр) клітини кісткового мозку кроля. У чашку додавали культуральне середовище 199 з 20% вмістом сироватки крові людини. У дослідні чашки поміщали зразки ксеногенного гідроксіапатиту (ксеноГАП), синтетичний гідроксіапатит (синтГАП) та біо-SiC.

Чашки Петрі розміщували в ексікатори с газовою сумішшю з 5% вмістом  $\text{CO}_2$  в атмосферному повітрі та культивували в термостаті при температурі  $37^\circ\text{C}$  протягом 14 діб без зміни культурального середовища. Після закінчення строків культивування (14 діб) культури фіксували 96% етанолом та забарвлювали за Романовським — Гімзе. Підрахунок колоній в чашках проводили за допомогою мікроскопа Olympus. За колонію вважали накопичення 50 та більше стромальних фібробластів кісткового мозку.

Результати оцінювали за показником ефективності клонування стромальних фібробластів кісткового мозку на  $10^5$  ядровмісних клітин кісткового мозку — співвідношення кількості колоній, що вирости, до числа підсаджених у чашку Петрі клітин. За колонію вважа-



**Рисунок 1.** Мікрофотографія колоній остеогенних стромальних клітин кісткового мозку, що вирости в присутності біо-SiC

ли накопичення клітин, не менше ніж 50 фібробластів. Ефективність клонування ( $\text{EKУO}_\phi$ ) стромальних стовбурових клітин кісткового мозку оцінювали за формулою:  $\text{EKУO}_\phi = N/M$ , де  $N$  — кількість колоній, що вирости, помножена на  $10^5$ ,  $M$  — кількість підсаджених клітин.

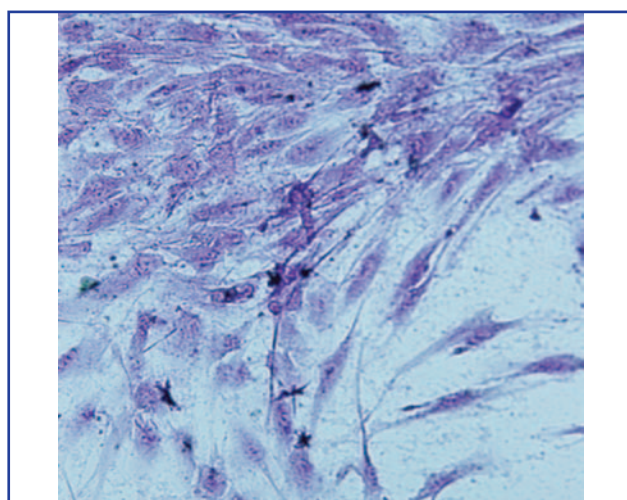
Контролем слугували культури цих же клітин, що були вирощені при аналогічних умовах без внесення в чашку Петрі жодних матеріалів. Окремо підраховували кількість багат шарових колоній серед усіх, що вирости в чашці. Вивчення впливу біо-SiC на культуру стромальних фібробластів проводилося в порівнянні з контролем і гідроксіапатитами синтетичного та ксеногенного походження.

Вибір матеріалів на основі ГАП різного походження пов'язаний з їх широким використанням для заміщення дефектів кісткової тканини та проведення остеопластики в травматології. Даний вибір також був обґрунтований експериментально та клінічно доведеною біосумісністю та відсутністю цитотоксичності зазначеного виду імплантаційних матеріалів. В експерименті досліджено зразки матеріалів відомих виробників, що пройшли фармакологічну реєстрацію, дозволені для використання та широко застосовуються в клінічній практиці.

Оскільки при проведенні експерименту забір клітин-попередників кісткового мозку проводився в одного пацієнта з метою забезпечення однакових умов для їх клонування, кількість матеріалу для дослідження була обмеженою. Тому для статистичної обробки нами обрано параметричний критерій Манна — Уїтні, який може бути використаний при малих вибірках ( $n \geq 3$ ) при  $p = 0,9-0,95$ .

### Результати досліджень і їх обговорення

У результаті проведеного дослідження виявлено ріст та розмноження остеогенних клітин-попередників кісткового мозку людини в усіх серіях експерименту з формуванням колоній. У присутності досліджуваної біоморфної кераміки виявлено ріст як одношарових (рис. 1), так і багат шарових колоній (рис. 2), причому



**Рисунок 2.** Мікрофотографія багат шарової колонії, що вирости в присутності біо-SiC

**Таблиця 1. Вплив досліджуваних матеріалів на клоногенну активність стромальних стовбурових клітин кісткового мозку людини *in vitro***

Назва	К-сть унесених клітин	К-сть клітин фідера	К-сть колоній	Багатошарові колонії	Приріст, %	Ефективність клонування
Контроль	$8,26 \times 10^5$	$2 \times 10^7$	$195,3 \pm 31,2$	$93,7 \pm 59,5$	$46,3 \pm 27,2$	$23,6 \pm 3,8$
Біо-SiC	$8,26 \times 10^5$	$2 \times 10^7$	$186,6 \pm 48,6$	$83,0 \pm 36,5$	$43,0 \pm 8,5$	$22,6 \pm 5,9$
КсеноГАП	$8,26 \times 10^5$	$2 \times 10^7$	$205,0 \pm 40,7$	$118,3 \pm 17,9$	$60,0 \pm 18,5$	$24,8 \pm 4,9$
СинтГАП	$8,26 \times 10^5$	$2 \times 10^7$	$165,3 \pm 24,4$	$70 \pm 30$	$41,2 \pm 12,1$	$20 \pm 3$

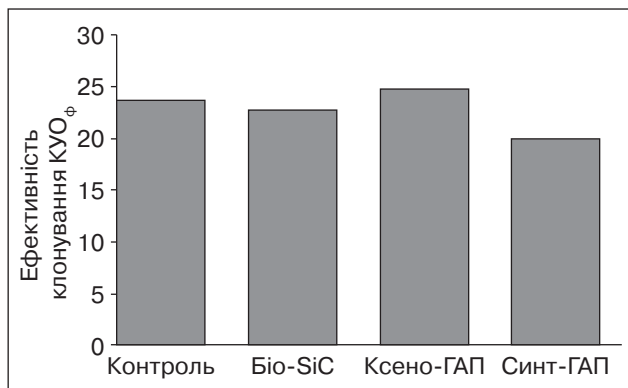
середній приріст колоній становив  $43,0 \pm 8,5$  %. Виявлено, що ефективність клонування при додаванні в культуру клітин біо-SiC становила  $22,6 \pm 5,9$  КУОф серед  $10^5$  ядровмісних клітин, що дозволяє оцінити рівень проліферації та диференціації клітин у культурі як високий.

Даний показник характеризує потенціал диференціації культури клітин у присутності даного імплантатного матеріалу. Відповідно, здатність клітин розмножуватися та диференціюватися з утворенням колоній в присутності біо-SiC свідчить про відсутність негативного впливу на культуру стромальних фіброblastів та цитотоксичності досліджуваного матеріалу.

При порівнянні отриманих даних у різних серіях дослідження між собою було виявлено, що серед усіх вивчених зразків матеріалів найвищі результати взаємодії з культурою клітин виявив ксеноГАП, причому результати були кращими, ніж у контролі (табл. 1). На другому місці опинився біо-SiC, на третьому — синт-ГАП. Результати їх виявились нижчими, ніж у контрольній групі (рис. 3).

Разом із тим статистично вірогідної різниці в проаналізованих показниках не виявлено; це дозволяє стверджувати, що всі досліджувані зразки виявили відсутність цитотоксичності щодо культури клітин, а також не вплинули негативно на структуроутворюючий потенціал остеогенних клітин-попередників.

Але, незважаючи на відсутність статистично вірогідної різниці в результатах досліджень, фактичні рівномірні й послідовні їх відмінності дозволяють висловити припущення, що з підвищенням рівня мікроструктурної подібності імплантатного матеріалу

**Рисунок 3. Ефективність клонування стромальних стовбурових клітин кісткового мозку в контролі та в досліді**

кістковій тканині зростає його позитивний вплив на проліферацію, диференціацію та структуроутворюючий потенціал КУОф.

## Висновки

На основі проведеного дослідження встановлено, що остеогенні стромальні клітини-попередники кісткового мозку людини в культурі тканин при взаємодії з біоморфною керамікою на основі карбиду кремнію виявили здатність до проліферації та диференціації з формуванням колоній, причому приріст багатошарових у середньому становив  $43 \pm 8,5$  %, що свідчить про відсутність цитотоксичності досліджуваного матеріалу. Ефективність клонування КУОф у присутності біо-SiC становила  $22,6 \pm 5,9$ , що свідчить про відсутність негативного впливу досліджуваного матеріалу на структуроутворюючий потенціал стромальних фіброblastів.

Це дає нам можливість зробити висновок, що біо-SiC є біосумісним матеріалом і закладає підґрунтя для проведення подальших експериментальних досліджень взаємодії біоморфної кераміки на основі карбиду кремнію.

## Список літератури

1. Астахова В.С. Остеогенные клетки-предшественники костного мозга человека. — К.: Феникс, 2000. — 176 с.
2. Беляев А.Е. Карбид кремния: технология, свойства, применение / Под ред. Р.В. Конова — Х.: ИСМА, 2010. — 532 с.
3. Фриденштейн А.Я., Петракова К.В., Куралесова А.Н. и др. Клетки-предшественники для остеогенной и кроветворной тканей. Анализ гетеротопных трансплантатов костного мозга // Цитология. — 1968. — № 5. — С. 557-567.
4. Малишкіна С.В., Дедух Н.В. Медико-біологічні дослідження штучних біоматеріалів для ортопедії та травматології // Ортопедія, травматологія і протезування. — 2010. — № 2. — С. 93-100.
5. Фриденштейн А.Я., Лалыкіна К.С. Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники. — М.: Медицина, 1973. — 223 с.
6. Cordonnier T., Sohier J., Rosset P., Layrolle P. Biomimetic materials for bone tissue engineering-state of the art and future trends // Adv. Eng. Mater. — 2011. — № 13. — P. 135-150.
7. Yukhymchuk V.O., Kiselov V.S., Belyaev A.E. et al. Synthesis, morphological and structural properties of bio-SiC ceramics // Functional materials. — 2010. — Vol. 17, № 4. — P. 520-527.

Отримано 20.08.15 ■

Маланчук В.А.<sup>1</sup>, Панченко Л.М.<sup>2</sup>, Жуковцева Е.И.<sup>1</sup>,  
Киселев В.С.<sup>3</sup>, Чепурной Ю.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный медицинский университет  
имени А.А. Богомольца, г. Киев

<sup>2</sup>ГУ «Институт травматологии и ортопедии НАМН Украины»,  
г. Киев

<sup>3</sup>Институт физики полупроводников имени В.Е. Лашкарева  
НАН Украины, г. Киев

### ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ БИОМОРФНОЙ КЕРАМИКИ НА ОСНОВЕ КАРБИДА КРЕМНИЯ НА КУЛЬТУРУ ОСТЕОГЕННЫХ КЛЕТОК- ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ КОСТНОГО МОЗГА

**Резюме.** В работе исследовано взаимодействие биоморфной керамики на основе карбида кремния с культурой остеогенных клеток-предшественников костного мозга человека. Установлено, что остеогенные стромальные клетки-предшественники костного мозга человека в культуре тканей при взаимодействии с биоморфной керамикой на основе карбида кремния проявили способность к пролиферации и дифференциации с формированием колоний, причем прирост многослойных в среднем был  $43,0 \pm 8,5 \%$ , что свидетельствует об отсутствии цитотоксичности исследуемого материала. Эффективность клонирования колониеобразующих единиц фибробластов в присутствии био-SiC составила  $22,6 \pm 5,9$ , что указывает на отсутствие негативного влияния исследуемого материала на структурообразующий потенциал стромальных фибробластов.

**Ключевые слова:** биоморфная керамика, карбид кремния, стромальные фибробласты, имплантационный материал.

Malanchuk V.A.<sup>1</sup>, Panchenko L.M.<sup>2</sup>, Zhukovtseva A.I.<sup>1</sup>,  
Kisellov V.S.<sup>3</sup>, Chepurnoi Yu.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Medical University named after O.O. Bohomolets,  
Kyiv

<sup>2</sup>SI «Institute of Traumatology and Orthopedics of NAMS of  
Ukraine», Kyiv

<sup>3</sup>Institute of Physics of Semiconductors named after V.E.  
Lashkariov of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

### RESEARCH OF BIOMORFIC CERAMICS BASED ON SILICON CARBIDE IN CELL CULTURE OF THE OSTEOGENIC MARROW CELLS PRECURSOR

**Summary.** This article presents the study's results of the interaction of biomorphic ceramics based on silicon carbide with tissue culture of the osteogenic stromal stem cells in the experiment. Human osteogenic stromal marrow precursor cells were found to be able to proliferate and differentiate with forming colony in tissue culture being interacting with biomorphic ceramics based on silicone carbide. At that multilayer colonies medium growth was  $43.0 \pm 8.5 \%$ . That demonstrates the absence of cytotoxicity of investigating material.

The efficiency of cloning of fibroblasts colony-forming units was  $22.6 \pm 5.9$  that demonstrates the absence of negative impact of the material on structure forming potential of stromal fibroblasts

**Key words:** biomorfic ceramics, silicon carbide, stromal fibroblasts, implantation material.