

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук
Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

Кваліфікаційна робота
освітній ступінь – магістр

на тему: «**ДОСЛІДЖЕННЯ БІОСУМІСНОСТІ ТА ОСТЕОГЕННОГО
ПОТЕНЦІАЛУ БІОМАТЕРІАЛІВ, СТВОРЕНИХ НА ОСНОВІ
ГІДРОКСИПАТИТІВ, *IN VITRO***»

Виконала: студентка 2-го року навчання,
спеціальності 091 Біологія

Склярєнко Юлія Валеріївна

Керівники:

Півень О.О., проф., д.б.н., провідний
науковий співробітник відділу генетики
людини Інституту молекулярної біології і
генетики НАНУ

Руссу І.З., к.б.н., доцент кафедри
лабораторної діагностики біологічних
систем НаУКМА

Рецензент: Войтенко Н.В., проф., д.б.н.,
професор кафедри біомедицини та
нейронаук Київського академічного
університету НАНУ

Кваліфікаційна робота захищена
з оцінкою _____

Секретар ЕК _____

« 1 » липня 2022 року

Київ – 2022

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	5
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1	10
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	10
1.1. Загальна характеристика кісток: структура, функції та клітинний склад	10
1.1.1. Структурні та функціональні особливості кісткової тканини.	10
1.1.2. Клітинний склад кістки.	12
1.1.3. Функції остеопонтину у біогенезі кісток.	14
1.2. Особливості та характеристика біоматеріалів для інженерії кісткової тканини.....	15
1.2.1. Класифікація та вимоги до біоматеріалів.....	16
1.2.2. Гідроксиапатит – найпоширеніший біоматеріал для біоінженерії кісткової тканини.	21
1.3. Мезенхімальні стовбурові клітини - джерело доступних клітин для регенерації кісткової тканини.....	26
1.3.1. Джерела мезенхімальних стовбурових клітин.....	27
1.3.2. Використання мезенхімальних стовбурових клітин в клітинній терапії та біоінженерному конструюванні кісткової тканини.	29
РОЗДІЛ 2	33
ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	33
2.1. Опис об'єкта і предмета дослідження	33
2.2. Реактиви, розчини, середовища та обладнання, що були використані в роботі.....	33
2.2.1. Реактиви.....	33

2.2.2. Розчини.	34
2.2.3. Живильні середовища.	35
2.2.4. Комерційні продукти, ферменти та антитіла.	35
2.2.5. Обладнання та витратні матеріали.	36
2.3. Біологічні об'єкти, які були використанні у дослідженні	37
2.4. Виділення та культивування мезенхімальних стовбурових клітин миші	37
2.5. Імунофенотипування отриманих мезенхімальних стовбурових клітин миші за допомогою проточної цитометрії (FACS аналіз)	38
2.6. Імуногістохімічний аналіз мезенхімальних стовбурових клітин миші на наявність експресії поверхневих маркерів	39
2.7. Дослідження токсичності та біосумісності гідроксиапатитів	40
2.7.1. Підготовка експериментальних зразків гідроксиапатитів до використання в експерименті.	40
2.7.2. Аналіз виживаності мезенхімальних стовбурових клітин адипогенного походження.	40
2.7.3. Визначення адгезивності мезенхімальних стовбурових клітин.	40
2.7.4. Дослідження метаболічної активності мезенхімальних стовбурових клітин адипогенного походження.	41
2.7.5. Аналіз мембранного потенціалу мітохондрій мезенхімальних стовбурових клітин	41
2.8. Дослідження остеогенного потенціалу гідроксиапатитів	42
2.8.1. Індукція остеогенного диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин миші адипогенного походження	42
2.8.2. Дослідження активності лужної фосфатази	42

2.8.3. Аналіз кількості мітохондрій за умов остеогенного диференціювання культури мезенхімальних стовбурових клітин миші. .	43
2.8.4. Дослідження мембранного потенціалу мітохондрій за умов остеогенного диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин миші.....	44
2.8.5. Аналіз депозитування позаклітинного кальцію.	44
2.9. Статистичний аналіз отриманих даних	46
РОЗДІЛ 3	47
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	47
3.1. Характеристика експериментальних зразків гідроксиапатитів	47
3.2. Фенотипічна та морфологічна характеристика мезенхімальних стовбурових клітин миші адипогенного походження.....	53
3.3. Дослідження токсичності та біосумісності гідроксиапатитів	55
3.4. Дослідження остеогенного потенціалу біоматеріалів на основі гідроксиапатиту.....	63
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	74
ВИСНОВКИ.....	81
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	82
ДОДАТКИ.....	95

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГАП	–	гідроксиапатит
ГСК	–	гематопоестичні стовбурові клітини
ЕСК	–	ембріональні стовбурові клітини
іПСК	–	індуковані плюрипотентні стовбурові клітини
КМ	–	кістковий мозок
КФК	–	кальцій-фосфатна кераміка
ЛФ	–	лужна фосфатаза
МСК	–	мезенхімальні стовбурові клітини
МСКап	–	мезенхімальні стовбурові клітини адипогенного походження
ОП	–	остеопонтин
β -ТКФ	–	β -трикальційфосфат
ФБС	–	фетальна бичача сироватка (<u>F</u> etal <u>B</u> ovine <u>S</u> erum, FBS)
ФСБ	–	фосфатно-сольовий розчин (<u>P</u> hosphate- <u>B</u> uffered <u>S</u> aline, PBS)
BMP	–	кістковий морфогенетичний білок (<u>B</u> one <u>M</u> orphogenetic <u>P</u> rotein, BMP)
CSF-R	–	рецептор колонієстимулюючого фактора (<u>C</u> olony <u>S</u> timulating <u>F</u> actor <u>1</u> <u>R</u> ecceptor, CSF1R)
DMEM	–	повноцінне середовище Ігла в модифікації Дюльбекко (<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle's <u>M</u> edium, DMEM)
M-CSF	–	гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (<u>M</u> acrophage <u>C</u> olony- <u>S</u> timulating <u>F</u> actor, M-CSF)
OPG	–	остеопротегерин (<u>O</u> steoprotegerin, OPG)
PDGF	–	фактор росту тромбоцитів (<u>P</u> latelet- <u>d</u> erived <u>G</u> rowth <u>F</u> actor, PDGF)
RANK	–	активатор ядерного рецептора ліганду κ -В (<u>R</u> ecceptor <u>A</u> ctivator of <u>NF</u> - κ <u>B</u> , RANK)
RANKL	–	активатор ядерного рецептора каппа-В (receptor for <u>R</u> ANK- <u>L</u> igand, RANKL)
TGF β	–	трансформуючий фактор росту бета (<u>T</u> ransforming <u>G</u> rowth <u>F</u> actor <u>B</u> eta, TGF β)
VEGF	–	фактор росту ендотелію судин (<u>V</u> ascular <u>E</u> ndothelial <u>G</u> rowth <u>F</u> actor, VEGF)

ВСТУП

Біоінженерне конструювання тканин та органів є сучасним та надзвичайно перспективним напрямком біомедицини. За статистичними даними, опублікованими об'єднаною мережею спільного використання органів (UNOS) за 2022 рік, кожні 9 хвилин новий пацієнт додається до списку очікування на трансплантацію органів та окремих тканин. І в середньому щодня, в очікуванні необхідної трансплантації, помирає 20 осіб, і ця кількість з кожним роком збільшується [1,2]. Поширеність типів дефектів кісток, що можуть бути викликані травмами, онкологічними захворюваннями, неправильним зростанням кісткової тканини або виникають внаслідок вікових метаболічних змін організму людини, призводять до функціональної недостатності опорно-рухового апарату та інвалідизації працездатної частини населення та зниження якості життя пацієнтів [3]. Ця ситуація погіршилася протягом останніх десятиліть, насамперед, через зростання населення планети, яке страждає від пропорційно більшої кількості захворювань, пов'язаних з кістками, крім того, спостерігаються наслідки дорожньо-транспортних пригод та спортивних травм, які підвищили попит на реконструктивну ортопедичну хірургію [4].

З метою відновлення функцій опорно-рухового апарату щорічно в світі проводиться близько двох мільйонів трансплантацій кісткової тканини аутогенного, аlogenного та ксеногенного походження [5]. Вважається, що «золотим стандартом» при реконструкції кісткової тканини є аутотрансплантат, оскільки він характеризується оптимальними остеоіндуктивними та остеопровідними властивостями, сприяє остеогенезу деформованої кістки та не викликає імунологічного відторгнення [6]. Проте, незважаючи на перераховані переваги, ця техніка також має багато обмежень. Ускладнення, такі як інфекція та хронічний біль, інвазивність процедури, обмеженість кількості тканини для пересадки, а також низький

самовідновний потенціал кістки, спонукають до пошуку та створення нових, ефективних та доступних методів відновлення кісткової тканини, при цьому уникаючи використання донорського матеріалу вирішуючи тим самим проблему імунологічного відторгнення [5,7].

Інженерія кісткової тканини є потенційною стратегією лікування кісткових дефектів і щорічно набуває більш поширеного клінічного використання [3]. При відновленні фракційованих, зламаних кісток мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) відіграють ключову роль через їхню здатність диференціюватися в остеогенному напрямку, тому доступні джерела отримання аутологічних стовбурових клітин становлять основний інтерес при реконструюванні кісткової тканини [5]. Загалом, вибір джерела для виділення МСК залежить від мети їхнього застосування, конкретних клінічних обставин та пацієнта. Як відомо, МСК можна виділити з багатьох різних тканин людини, однак найпоширенішими джерелами мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин для клінічного використання є кістковий мозок і жирова тканина дорослих осіб [8].

Природньо, МСК ізольовані з кісткового мозку володіють більшим остеогенним потенціалом [9], тим не менш, їхнє використання є обмеженим, що пов'язано з низкою причин, включаючи загальну кількість клітин, які можна виділити, частоту клітин інтересу в популяції, а також ризики виникнення ускладнень при процедурі їхнього отримання. Тому мезенхімальні стовбурові клітини адипогенного походження (МСКап) є більш привабливими для інженерії і відновлення кісткової тканини [8]. Незважаючи на те, що стовбурові клітини, виділенні із жирової тканини пацієнта, мають слабший потенціал до остеогенезу та хондрогенезу, вони характеризуються сильнішим проліфераційним потенціалом, який не зменшується з тривалістю культивування та не залежить від віку пацієнта. До того ж, один грам жиру містить у 1000 разів більше стовбурових клітин, ніж один грам кісткового мозку [5], що робить це джерело МСК більш оптимальним для клінічних застосувань.

Зважаючи на стрімкий розвиток можливостей реконструктивно-відновлювальної медицини, яка заснована не на заміщенні, а на регенерації кісткової тканини, виникла нагальна потреба в біосумісних матеріалах, які б імітували властивості природного позаклітинного матриксу кістки, стимулювали утворення кісткової тканини і могли використовуватись в тканиноінженерних конструкціях як носії живих клітин [3,7,10]. Широкий спектр природних та синтетичних біоматеріалів успішно використовуються для створення кісткових імплантів [3,7]. Завдяки аналогії з мінеральним компонентом кісткової тканини, найбільш поширеними до застосування в пластиці кісткової тканини синтетичними матеріалами є кальцій-фосфатна кераміка (КФК) на основі гідроксиапатиту (ГАП) та β -трикальційфосфату (β -ТКФ), яка має ідеальну біосумісність, біоактивність та спорідненість до кісткової тканини [10]. Хоча кристали ГАПу мають спільні риси з іншими біокерамічними матеріалами, вони також володіють низкою унікальних характеристик та переваг, а саме: відносно прості протоколи синтезу частинок із бажаними параметрами, адекватна біологічна відповідь на стимули оточуючого середовища, остеоіндуктивність, легкість у модифікації поверхні та структури, повільна резорбційність та пористість гідроксиапатиту, що роблять його широко використовуваним матеріалом для низки застосувань у сфері регенераційної медицини [11,12]. Проте недостатня фракційна міцність, саморуїнування внаслідок сильних навантажень, крихкість та відсутність антибактеріальних властивостей є основними недоліками, які потребують вдосконалення. Варіювання параметрів та методів синтезу ГАПів, модифікації властивостей та створення композитів на його основі призводять до постійної потреби біологічного тестування таких матеріалів [6,7].

З огляду на вищевикладене, метою даної роботи було дослідження біосумісності та остеоіндуктивних властивостей гідроксиапатитів з різними хімічними модифікаціями в культурі мезенхімальних стовбурових клітин миші.

Відповідно до мети були поставлені такі завдання:

1. Виділити та охарактеризувати первинні мезенхімальні стовбурові клітини миші адипогенного походження.
2. Оцінити біосумісність гідроксиapatитів у системі культивування із мезенхімальними стовбуровими клітинами миші *in vitro*.
3. Проаналізувати адгезивність поверхні гідроксиapatитів із використанням культури мезенхімальних стовбурових клітин миші *in vitro*.
4. Визначити вплив гідроксиapatитів на метаболічну активність первинної культури стовбурових клітин миші адипогенного походження за умов культивування в контрольному і остеогенному середовищах.
5. Перевірити остеоіндуктивні властивості гідроксиapatитів у культурі мезенхімальних стовбурових клітин за стандартних та остеогенних умов культивування.
6. Оцінити здатність мезенхімальних стовбурових клітин миші адипогенного походження утворювати мінералізований позаклітинний матрикс за умов їхнього культивування з гідроксиapatитами у контрольному і остеогенному середовищах.
7. Визначити рівні експресії та секреції остеопонтину мезенхімальними стовбуровими клітинами миші за звичайних та остеогенних умов культивування разом із зразками гідроксиapatитів.

Робота виконувалась в Інституті молекулярної біології та генетики, у відділі генетики людини під керівництвом Півень Оксани Олександрівни.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика кісток: структура, функції та клітинний склад

1.1.1. Структурні та функціональні особливості кісткової тканини.

Кістка є самовідновною, динамічною тканиною, яка піддається безперервному ремоделюванню з метою збереження своєї структури та функцій [13]. В свою чергу, кістки виконують наступні функції: підтримують та закріплюють м'язи, захищають внутрішні органи, забезпечують пересування організму в просторі. До того ж, у внутрішніх порожнинах кісток міститься кістковий мозок, який є джерелом гематопоетичних стовбурових клітин (ГСК). Кісткова тканина залучена до регуляції мінерального гомеостазу та ендокринних функції організму, таких як толерантність до глюкози, чутливість до інсуліну та когнітивну поведінку тваринного організму [14].

За формою кістки класифікують на чотири типи: довгі, короткі, плоскі та змішані кістки неправильної форми. Структурна організація кісткової тканини є ієрархічною, як показано на рис.1.1. [12].



Рис.1.1. Ієрархічна структура кістки. Адаптовано з [15].

На макроскопічному рівні виділяють два види структур: 20% - пориста (трабекулярна або губчаста) та 80% - кортикальна (або компактна) кісткові тканини, відсоткове співвідношення охоплює загальну кількість кісток скелета. Усі кістки складаються як із губчастої, так і з компактної тканини, і їхнє співвідношення варіює для кожного типу [13,14].

На мікроскопічному рівні в кортикальній кістковій тканині остеон має вигляд циліндра, що проходить паралельно поздовжній осі кістки. Ця структура діаметром близько 200 мкм містить концентричні шари ламелей, що нашаровуються навколо центрального каналу. Пориста кістка складається з пластин, що організуються в каркас із стрижнів і трабекул; кожен стрижень має діаметр приблизно 50–300 мкм, а трабекули розташовуються в напрямку механічних навантажень [13,14].

Субмікроскопічний рівень має вигляд пластин мінералізованого колагену, які розташовані у площині. Колагенові волокна, в свою чергу, утворені із колагенових фібрил, збагачених кристалами гідроксиапатиту. Розміри кристалів ГАПів варіюють в межах $3 \times 25 \times 50$ нм і є внутрішньо- або позафібрилярними. Внутрішньофібрилярні кристали зв'язані з щілинними ділянками колагенової фібрили, тоді як екстрафібрилярні кристали знаходяться в просторі, що оточує фібрили та утворюють так званий мінералізований позаклітинний матрикс [13,14].

На молекулярному рівні позаклітинний матрикс кістки складається з органічної фази - 90% колагену I типу та 5% неколагенових білків, та неорганічної фази, що складається з ГАПу й води (10-20%) [13,14].

Багаторівнева пориста структура кістки важлива для ефективної доставки поживних речовин, міграції, проліферації та диференціації клітин, а також для васкуляризації тканини [13,14]. Макро- та мікропориста структура природних кісток впливає на остеогенну диференціацію при відновленні кістки, оскільки пори сприяють поширенню та подовженню стовбурових клітин. Нанопориста структура кісток утворює велику площу поверхні, що є

вигідною властивістю для адсорбції білків та факторів росту, таких як кістковий морфогенетичний білок 2 (BMP2) та фактор росту ендотелію судин (VEGF) - для ефективної регенерації кістки, залучення та диференціації остеобластів [16].

1.1.2. Клітинний склад кістки. У кістковій тканині міститься декілька типів клітин: МСК, остеобласти, остеоцити та остеокласти, що резорбують кістку [14,15]. Остеобласти становлять 4-6% від загальної популяції клітин кістки, походять від МСК, які, після комітування в остеогенному напрямку, диференціюються в попередники остеобластів та починають експресувати гени *Runx2* та *Colla1*. Потім преостеобласти перетворюються на зрілі остеобласти, які в свою чергу зазнають морфологічних змін та перетворюються на великі кубоподібні клітини. Цей перехід від клітини-попередника до кінцево-диференційованої клітини пов'язаний із синтезом кісткового матриксу, який відбувається у два етапи: закладання органічного каркасу з колагенових та неколагенових білків та мінералізації структури. На цій стадії зрілі остеобласти можуть або зазнати апоптозу, або стати остеоцитами чи клітинами кісткової оболонки [13,15].

Остеоцити є останньою стадією диференціювання остеобластів, які залягають в кістковому матриксі, а саме, в лакунах. Фактично, остеоцити є клітинами, що відповідають за нормальне функціонування скелета та відіграють свою роль у підтриманні гомеостазу кісток. Діючи як механосенсори, вони регулюють надходження фосфатів до кістки завдяки секреції фактора росту фібробластів 23 (FGF23) та сприяють ремоделюванню кістки, оскільки мають вплив на остеобласти та остеокласти [13,15].

Остеокласти – це поляризовані гігантські клітини, що походять від клітин гемопоетичної лінії та імунних клітин, відповідальні за резорбцію кістки, яка відбувається через розчинення неорганічної фази кісткового матриксу та деградацію білків колагену. Дані клітини є багатоядерними, стійкими до кислої фосфатази та походять від лінії моноцитів-макрофагів. Остеокласти утворюються внаслідок злиття мононуклеарних клітин

гемopoетичного походження під впливом макрофагального колонієстимулюючого фактора (M-CSF) та RANKL – ліганд та рецепторний активатор ядерного фактора κ -B (Рис. 1.2).

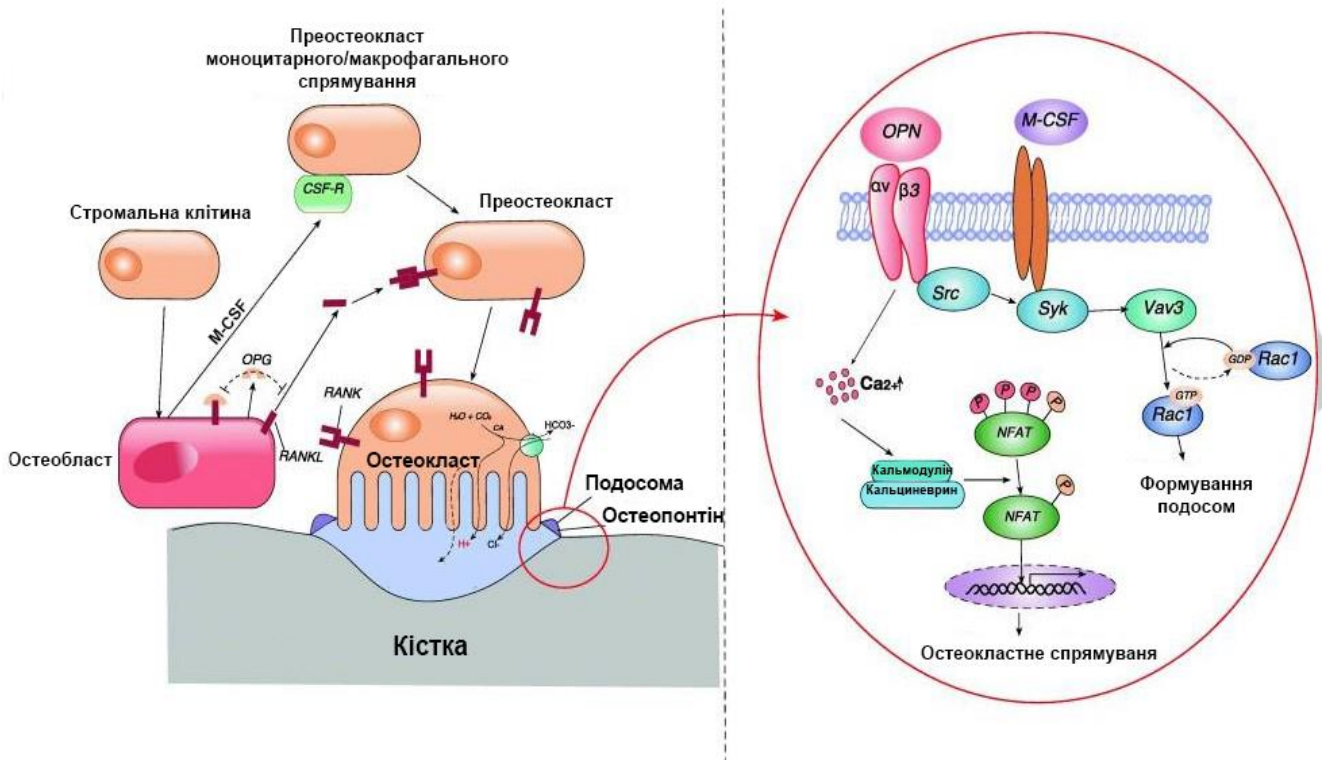


Рис.1.2. Схематичне зображення резорбції кістки, що відбувається на клітинному та молекулярному рівнях. OPN - остеопонтин, M-CSF - гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор, CSF-R - рецептор колонієстимулюючого фактора, RANKL - активатор рецептора ядерного ліганду κ -B, RANK -активатор рецептора ядерного κ -B, OPG - остеопротегерин, Src - протоонкоген тирозинкіназа, Syk - тирозинкіназа селезінки, Vav3 - vav гуаніновий нуклеотидний обмінний фактор 3, Rac1 - субстрат 1 ботулінічного токсину, пов'язаний з Ras, NFAT - ядерний фактор активованих T-клітин.

A- сигнальний шлях RANKL/RANK/OPG та остеопонтин у формуванні подосом.

B- зв'язування остеопонтину з інтегрином α ν β 3 призводить до утворення подосом і активності остеокластів через сигнальні шляхи Rac і NFAT відповідно. Адаптовано з [15].

Зокрема, RANKL експресується остеобластами, стромальними клітинами та імунними клітинами і вивільняється як цитокін. Тоді RANKL зв'язується зі своїм рецептором RANK на мембранах попередників остеобластів та остеокластів, регулюючи їхнє диференціювання, виживаність та активність. У сигнальному шляху RANKL/RANK цитокін остеопротегерин (OPG) запобігає зв'язуванню RANKL з RANK, таким чином пригнічуючи остеокластогенез і регулюючи резорбцію кістки [13,15].

Загалом, ремоделювання - це складний процес «будівництва-руйнування», за допомогою якого стара, мікропошкоджена кістка заміщується на нову. Цикл ремоделювання складається з трьох основних фаз: фази резорбції кістки, опосередкованої остеокластами, під час якої розчиняються як мінеральні, так і колагенові матриці, реверсивного періоду, який узгоджує час і простір процесу резорбції, і, нарешті, фаза нового відкладення кісткового матриксу, чим займаються остеобласти. Тісна взаємодія остеобластів і остеокластів гарантує правильний просторовий і тимчасовий рекрутинг клітин лише в тому місці, яке підлягає заміні, для підтримання правильної структури кістки [15,16].

1.1.3. Функції остеопонтину у біогенезі кісток. У процес ремоделювання кісткової тканини, диференціації остеокластів та рекрутингу остеобластів також залучений білок остеопонтин (ОП) (рис.1.2) [16]. Він проявляє свою активність при міграції остеокластів до місць резорбції і має вирішальне значення у метаболізмі і гомеостазі кісток [17]. Вміст остеопонтину підвищується у місцях, де стикаються вже існуюча та новоутворена кістки [18]. Показано, що остеопонтин проявляє свою активність щодо попередників остеокластів при концентрації від 10 нМ до 1 мкМ, а остеопонтин-залежна внутрішньоклітинна передача сигналів спостерігається у зоні ущільнення при остеокластній резорбції [16]. У дорослих осіб ОП зазвичай експресується в кістках, нирках та епітеліальних вистилках. На відміну від обмеженого розподілу у фізіологічно нормальній тканині, експресія остеопонтину різко посилюється в місцях запалення та

ремоделювання тканин [17]. Загалом, остеопонтин - це багатофункціональний мембрано-асоційований глікопротеїн масою до 75 кДа, є членом родини білків клітинного матриксу SIBLING та є одним з найбільш поширених неколагенових білків у кістках [17]. Він існує у вигляді секретованої і внутрішньоклітинної форми, кодується геном SPP1 та має 3 ізоформи - OPN-A, OPN-B і OPN-C. OPN-A є повнорозмірним варіантом білка, тоді як ізоформи B (відсутній екзон 5) і C (відсутній екзон 4) є варіантами сплайсингу. Ці різні форми можуть виконувати різні біологічні ролі в різних клітинних контекстах [17]. Наприклад, при взаємодії з кількома інтегринами, ОП впливає на міграцію, адгезію та виживаність багатьох типів клітин. У вигляді Th1 цитокіну, остеопонтин сприяє клітинно-опосередкованим імунним відповідям при хронічних запальних та аутоімунних захворюваннях [19]. Окрім вищеперерахованих функцій, остеопонтин є регулятором біомінералізації та потужним інгібітором ектопічної кальцифікації кісток та судин - зменшує ріст і агрегацію кристалів кальцію в епітеліальних тканинах. При кальцифікації кісток остеопонтин зв'язує ГАП та іони кальцію, таким чином фізично пригнічуючи утворення та зростання кристалів *in vivo* [17].

1.2. Особливості та характеристика біоматеріалів для інженерії кісткової тканини

Розвиток і регенерація здорової кісткової тканини є складним процесом, який включає взаємодію різних типів клітин і комплекс скоординованих процесів. Втрата або пошкодження кісткової тканини може виникнути через різні причини: хірургічне втручання, переломи або хвороби кісток, наприклад остеопороз [7]. Однак у клінічній практиці у пацієнтів може спостерігатися порушення регенеративної функції кісток, а також існують випадки, коли потреба в регенерації виходить за межі нормального потенціалу для самовідновлення, наприклад, при дефектах кісток критичного

розміру, отриманих внаслідок ортопедичних або орально-щелепно-лицевих операцій після травм, інфекцій та резекції пухлин, тому у таких випадках необхідне медичне втручання для екзогенної регенерації кісткової тканини за допомогою натуральних або синтетичних кісткових трансплантатів. Основними компонентами, необхідними для відновлення кісткової тканини, є клітини, фактори росту/морфогенні сигнали та матриксний біоматеріал, який би їх підтримував [14].

1.2.1. Класифікація та вимоги до біоматеріалів. Для застосування в живих організмах, всі біоматеріали повинні володіти специфічними властивостями. Перш за все, щоб бути класифікованою як біоматеріал, речовина повинна бути біосумісною та не токсичною, а отже, гармонічно співіснувати з біологічними рідинами, тканинами та клітинами господаря, не завдаючи шкідливих впливів локально або системно [13,14]. Крім того, хімічні властивості синтетичних та природніх біоматеріалів впливають на поведінку клітин хазяїна, на топографію та змочуваність поверхні, адгезивність, проліферацію та диференціацію клітин. Тривимірна конфігурація композитів також є важливим параметром, бо матриксний каркас має сприяти новоутворенню 3D структури тканини. До того ж, пористість, розмір і форма пор матеріалу для інженерії кісткової тканини є вирішальними параметрами, адже пори повинні забезпечувати колонізацію клітин і васкуляризацію утвореної тканини. Розмір пор повинен підтримуватися в межах 200–350 мкм, щоб гарантувати остеоінтеграцію клітин [13,14].

При розробці новітніх матриксних матеріалів для тканинної інженерії мають враховуватись та максимально імітуватись специфічні механічні властивості конкретної тканини інтересу. У випадку кісткової тканини такі параметри як в'язкопружність, міцність та стійкість до навантаження мають бути дотримані [20]. Коли кінцевою метою інженерії тканини є повна регенерація та заміщення екзогенного матеріалу новою здоровою фізіологічною тканиною, – важливим критерієм є також здатність до

саморозчинення або резорбції [6]. Що стосується відновлення кісток, то необхідно згадати і про такі властивості, якими має володіти екзогенний матеріал, як остеоіндукція, остеопровідність та остеointegraція. Остеоіндукція означає здатність стимулювати остеогенну диференціацію клітини, яка не є кінцево комітованою [21]. Таким чином, остеоіндуктивний матеріал – це такий матеріал, який може безпосередньо індукувати остеогенез через рекрутинг, проліферацію та диференціацію МСК [22]. Остеопровідність - це здатність створювати таке мікросередовище, яке сприяє ортотопічному остеогенезу. Отже, остеопровідний матеріал «дозволяє» кістковій тканині рости на ньому. Остеointegraція була вперше описана Branemark та колегами [23], які спостерігали за допомогою світлової мікроскопії прямий контакт між титановими імплантатами та кісткою.

Отже, для лікування та виправлення дефектів кісток доступні два варіанти: природні або синтетичні кісткові трансплантати (рис.1.3).

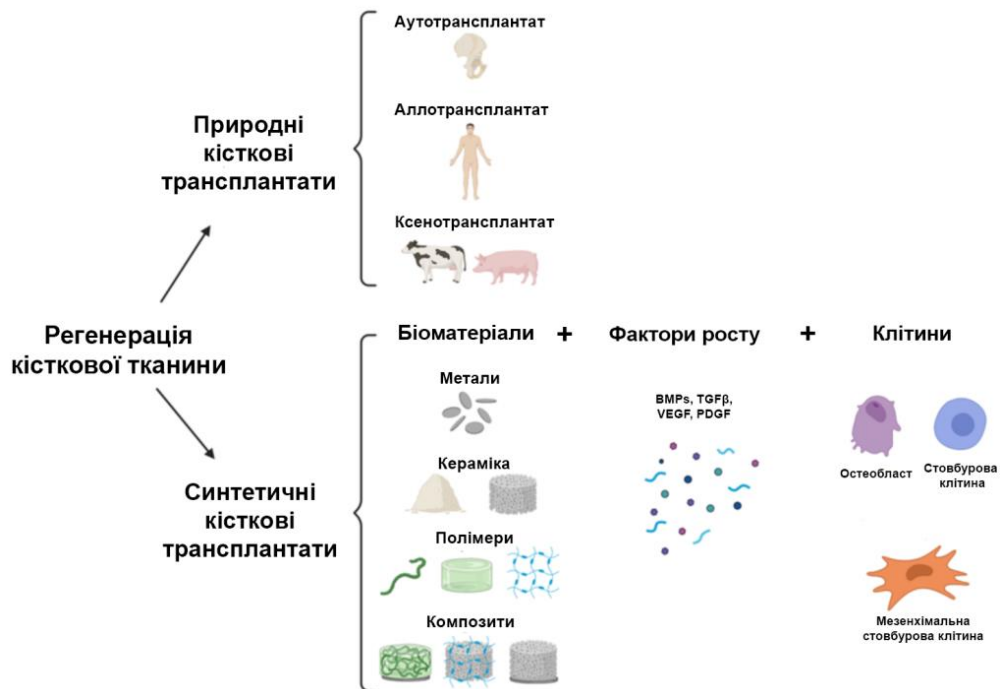


Рис. 1.3. Доступні стратегії регенерації кісткової тканини. BMP - кісткові морфогенетичні білки, TGFβ -трансформуючий фактор росту бета, VEGF - фактор росту ендотелію судин, PDGF - фактор росту тромбоцитів. Адаптовано з [14].

Природні трансплантати класифікують за походженням на аутотрансплантати, алотрансплантати або ксенотрансплантати. Синтетичні кісткові трансплантати є біоматеріалами, речовинами, що створені для взаємодії з живими системами та призначені для заміщення тканин, їх класифікують залежно від їхнього хімічного складу на метали, кераміку, полімери та композити [25]. В контексті даної роботи, нас більшою мірою цікавлять синтетичні трансплантати – їхні типи, характеристики та безпосереднє використання в біоінженерії кісткової тканини.

1.2.1.1.Метали. Першими матеріалами, які використовувалися для кісткових трансплантатів, були такі метали: залізо (Fe), магній (Mg), цинк (Zn) та їхні сплави [20]. В останні роки остеогенні властивості магнію (Mg), стронцію (Sr) та цинку (Zn) більш активно вивчаються [26]. Чистий магній та його сплави мають вищу міцність і модуль пружності, ніж біодеградабельні полімери. Модуль пружності Mg близький до кортикальної кістки, що ефективно зменшує виникнення стресового екранування. А в порівнянні із керамікою, магній характеризується більшою жорсткістю та кращою біосумісністю. Крім того, іони магнію, що виділяються в результаті деградації сплаву, можуть стимулювати ріст остеобластів і регенерацію кісток [27]. Недавнє дослідження Qu та колег [28] також наполегливо підтримує використання біоматеріалів на основі цинку для лікування захворювань, пов'язаних з кістками, і репарації кісткових дефектів.

1.2.1.2. Полімери. Полімери можуть бути природними або синтетичними за походженням. До природних відносять колаген, хітозан, альгінат, еластин і целюлозу; всі вони застосовуються в цілях регенерації й інженерії тканин та органів, зокрема і кісток. Природні полімери вважаються першими біологічнодеградабельними матеріалами, які дають можливість бути повністю заміщеними новою кістковою тканиною [6]. Їхня резорбційність базується на ферментативному або гідролітичному розкладанні [29].

Синтетичні полімери є перспективними матеріалами для тканинної інженерії завдяки своїм фізико-хімічним та механічним властивостям.

Нетоксичними та дозволеними для широкого використання синтетичними полімерами є полімолочна (PLA) та полігліколева (PGA) кислоти, полімолочна гліколева (PLGA) кислота, полі ϵ -капролактон (PCL) та поліетиленгліколь (PEG), які характеризуються чудовими механічними властивостями, є не імуногенними, демонструють високу сумісність з МСК людини, біосумісні, біологічно розкладаються та підтримують адгезію клітин [30,31]. Серед полімерів, які демонструють високу механічну міцність, виокремлюють полібутилентерефталат (PBT), поліетилентерефталат (PETP) та поліпропіленфумарат (PPF), до того ж вони є високосумісними, біодеградабельними та стійкими до навантажень біоматеріалами [32,33]. Поліакрилова (PAA) кислота широко використовується для виготовлення постійних імплантів, оскільки вона не піддається біорозкладанню [34].

1.2.1.3. Кераміка. Кераміка – це неорганічні неметалічні матеріали [20]. Оскільки 70% кісткової тканини складається з ГАПу, біоматеріали, такі як кальцій-фосфатна кераміка і біоактивне скло, активно використовуються як замітники кісткової тканини вже більше 30 років [35]. Їхня біологічна активність обумовлена імітацією хімічного складу мінеральної фази кістки, що забезпечує придатну поверхню для формування нової тканини [34]. Щодо механічних властивостей кераміки, то вона демонструє вищу механічну силу, меншу міцність і вищий модуль Юнга ніж кортикальна кістка людини, що робить її небажаним типом матричного матеріалу для відновлення кісток, що несуть навантаження [34].

Завдяки аналогії з мінеральним компонентом кісткової тканини, найбільш поширеними синтетичними матеріалами для використання в пластиці кісткової тканини є кальцій-фосфатна кераміка (КФК) на основі ГАПу та β -трикальційфосфату (β -ТКФ) або їхнього «симбіозу» - двофазного фосфату кальцію. Всі вони володіють високою біосумісністю, спорідненістю до кісткової тканини, остеопровідністю та здатністю до остеоінтеграції [36]. Завдяки їхній високій розчинності трикальцій-фосфати використовуються

для виготовлення двофазних кальцій-фосфатних матриксів, які об'єднують остеогенні властивості ГАПу та резорбційну здатність ТКФів [12].

1.2.1.4. Композиційні матеріали. До композитів відносять такі матриксні матеріали, які виготовлені з двох або більше матеріалів, що належать до одного або різних класів. Для протидії корозії металів було розроблено композити з металів і кераміки, при цьому зберігши всі оптимальні характеристики, що властиві даним матеріалам [37,38,39]. Kihlström Burenstam Linder та ін. продемонстрували, що ліговані титаном краніальні імплантати на основі кальційфосфатної кераміки сприяють регенерації кісток черепа та остеоінтеграції клітин *in situ* [40].

ГАП разом з оксидом алюмінію успішно використовуються для моделювання нової кісткової тканини *in vivo* [41]. При виготовленні такого матриксного матеріалу шляхом хімічного зшивання з глутаральдегідом, хітозаном та желатином вони утворюють гелеподібну структуру із порами, підтримують адгезію, інфільтрацію, проліферацію та функціонування як преостеобластичних клітин, так і МСК [42]. Інші композити також були розроблені з використанням матеріалів, що належать до однієї родини. β -трикальційфосфат – поєднання гідроксиапатиту та трикальційфосфатної кераміки – розробили для підвищення біодеградабельної здатності матриксного каркаса [43] і для контролю швидкості розчинення композиту, на яку впливає співвідношення фосфату кальцію [43].

Також досліджувались композити з металів і полімерів, і було показано, що матриці із хітозан- TiO_2 нанотрубками у поєднанні з іонами Ca^{2+} сприяють адгезії, проліферації та ранній диференціації клітинної лінії остеосаркоми [44].

Колаген I типу та біологічний апатит є основними складовими фізіологічної кісткової тканини, тому найкращим вибором для імітації природних функцій кістки є композити з полімерів та кераміки, такі як нано-ГАП/полі- ϵ -капролактон [45], хітозан/фосфат кальцію [46] і хітозан, поліфосфат і піжоніт [47]. ГАПи також використовують для покращення

механічних властивостей полімерів, таких як полімолочна кислота [48], а також для підвищення адгезії та дозрівання клітин остеогенного напрямку на поверхні матриксу [49]. El-Fiqi та інш. створили новий, імітуючий кістку, пористий гібридний каркас із наноГАПу/колагену та із поверхнево-силанізованого мезопористого нанобіоскла. Присутність нанобіоскла у фібрилярній мережі колагену покращує утворення кристалів ГАПу, що сприяє пористості колагенового каркаса [50].

Декілька авторів розробили комбіновані каркаси з фосфату кальцію та ГАПу з колагеном, альгінатом та хітозаном [51,52,53]. У контексті тканинної інженерії колаген широко використовується разом із трикальційфосфатом та ГАПом для досліджень як *in vitro*, так і *in vivo*, з метою індукування формування нової кісткової тканини [54]. Додавання колагену та ГАПу/трикальційфосфату до ксеногенного трансплантату свині підвищує здатність до регенерації при критичних дефектах черепних кісток у кролів [55]. При проведенні доклінічних досліджень на моделі дефектів кісток критичних розмірів, біокераміка, що складається з дикальційфосфату та ГАПу, виявилася більш ефективною з точки зору стабільності імпланту та відсотку утворення нової тканини, ніж композити двофазного фосфату кальцію з колагеном [56].

1.2.2. Гідроксиапатит – найпоширеніший біоматеріал для біоінженерії кісткової тканини. Оскільки ГАП є основним компонентом мінеральної складової природної кістки, він відіграє вирішальну роль як у фундаментальних дослідженнях, так і в клінічних застосуваннях для інженерії кісткової тканини [57]. Гідроксиапатит з хімічною формулою $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ є найважливішою сполукою класу кальцій-фосфатної кераміки, оскільки його природній аналог є основою природних твердих тканин і відповідає за жорсткість та щільність кісток, емалі та дентину. Як відомо, в компактній кістці кристали ГАПів знаходяться в сполученні з колагеновими фібрилами у вигляді голок, орієнтованих у напрямку волокон [15]. ГАП може бути отриманим як синтетичним способом, так і

виділений із природних джерел. Синтезувати його можна різними методами, найважливішими з яких є гідроліз, хімічне співосадження, гідротермальний синтез і золь-гель процес [7,58]. Штучно створений ГАП зі стехіометричним складом $\text{Ca/P} = 1,67$ дуже подібний на мінеральну складову кісток і зубів ссавців [7]. Стехіометричний ГАП демонструє високу стабільність при фізіологічному рН, що обмежує його здатність до резорбції. Тому останні дослідження за темою гідроксиапатитів часто зосереджуються на підвищенні розчинної здатності та остеогенного потенціалу ГАПу за допомогою іонного легування [12].

Альтернативним методом отримання гідроксиапатиту є вилучення його з природних ресурсів, наприклад, кісток великої рогатої худоби, морських черепашок, кісток риб, ячної шкаралупи, коралів, тощо [7]. Завдяки наявності природних та синтетичних форм ГАП є одним із найзастосованіших видів кальцій-фосфатної кераміки.

1.2.2.1. Структура гідроксиапатиту. Кристалографічна структура ГАПу класифікується на моноклінну або на гексагональну відповідно до просторової групи. Моноклінна структура ГАПу нестабільна і може бути дестабілізована наявністю невеликої кількості іонів [15], тому має менше практичне застосування в порівнянні з ГАПом гексагональної структури. Ca^{2+} , PO_4^{3-} і OH^- групи постійно присутні в складі молекули ГАПу (рис.1.4) [15].

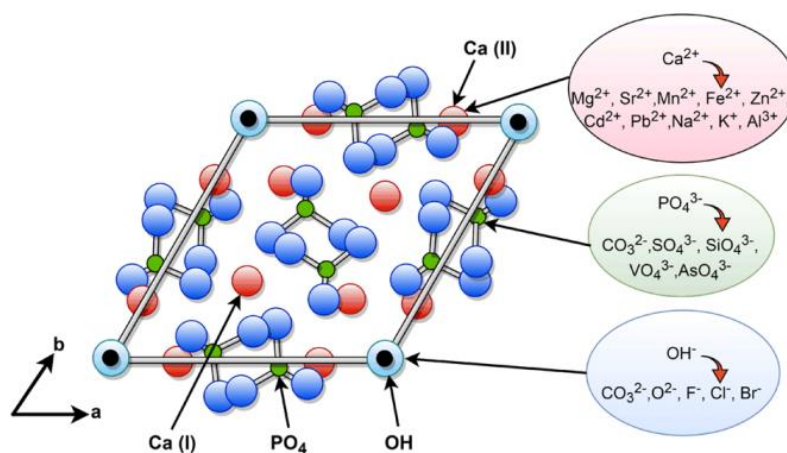


Рис.1.4. Молекулярна структура гідроксиапатиту. Адаптовано з [15].

1.2.2.2. Властивості гідроксиапатиту. Унікальні властивості синтетичного ГАПу виправдали його використання як біоматеріалу для відновлення та заміни твердих тканин. Ступінь кристалічності, розмір, морфологія кристалів, хімічний склад, техніка синтезу – відіграють вирішальні ролі у впливі на властивості ГАПу, біореакцію *in situ* та потенційне застосування в клініці [58]. Гідроксиапатит широко використовується як штучний замітник кісткової тканини через його сприятливі біологічні властивості, включаючи біосумісність, нетоксичність, біоафінність, біоактивність, остеокондукцію, остеоінтеграцію, а також остеоіндукцію. ГАП вважається нецитотоксичним та біосумісним через його подібність за хімічним складом на природну кісткову тканину. Біосумісність поверхонь матеріалу можна оцінити за допомогою досліджень взаємодії клітин та матеріалу, таких як прикріплення, проліферація та диференціація [15,58].

Відсутність антибактеріальних властивостей чистого ГАПу є одним із обмежень його використання в регенеративній медицині, проте наразі багато досліджень спрямовані на покращення антибактеріальних властивостей ГАПів шляхом внесення відповідних іонів металів у структуру композиту [15,58]. Відомо, що деякі іони металів можуть проникати в клітини бактерій і дезактивувати їх ферменти, тоді як іони інших металів можуть вбивати бактерії, утворюючи перекис водню. Іншим способом покращення антибактеріальних властивостей чистого порошку ГАП є модифікація його структури для оптимального навантаження та вивільнення антибіотичних препаратів [15]. Проте при використанні антибіотиків відразу гальмуються регенеративні процеси, тому більш перспективним для створення антибактеріальної поверхні є наносрібло, нанесене на поверхню імплантатів [10]. Срібло є неорганічним антибактеріальним агентом, який перешкоджає процесу перенесення електронів на плазматичній мембрані бактерій і впливає на синтез АТФ у бактеріальних клітинах, тим самим сприяючи знищенню бактеріальних патогенів. Хоча Ag-ГАП може проявляти

антибактеріальні властивості, проте композит із великою кількістю заміщених сріблом атомів кальцію, може проявляти високу цитотоксичність [59]. Загалом, вплив комбінованих покриттів ГАПу наносріблом на антибактеріальні властивості поверхні імплантатів досліджено недостатньо [60].

Фізико-хімічні властивості ГАПу можна оцінити за допомогою фізичного, структурного та хімічного аналізів для визначення чистоти фази, розміру, форми, основних компонентів гідроксиapatиту - Ca, P, Ca/P та наявності інших мікроелементів типу кремнію, магнію, натрію, калію, стронцію, цинку тощо [60]. На біосумісність трансплантату та тканини хазяїна впливає розчинність ГАПу та пов'язані з цим хімічні зміни, які критично залежать від розміру, форми та пористості композиту. Швидкість розчинення ГАПу залежить від ряду факторів, включаючи кристалічність, морфологічні параметри та умови обробки матеріалу. ГАП легко розчиняється в кислому середовищі, але залишається нерозчинним у лужному, також він малорозчинний у фізіологічних умовах, тому гідроксиapatит термодинамічно сталий за температури тіла [15]. До того ж, розчинність кристалів ГАПу у будь-якому середовищі змінюється за наявності білків, ферментів, амінокислот та інших органічних сполук.

Механічні властивості, такі як твердість та міцність частинок ГАПів, покращуються при зменшенні розміру гранул матеріалу з мікрометрового до нанометрового масштабу [61]. Висока жорсткість та міцність поверхні покращує функції остеобластів, впливаючи на міцність їхнього зчеплення. Пориста структура покращує osteoіндукцію порівняно з частинками, які мають гладку поверхню та непористу структуру [15].

1.2.2.3. Вплив морфології частинок, розміру пор та іонних заміщень на властивості гідроксиapatиту. Функціональність наночастинок ГАПу можна ефективно контролювати, варіюючи їх морфологію. Пластинчастоподібну, квіткову, стрижневу, сферичну морфології

кристалів (рис.1.5.) можна отримати, модифікуючи техніку синтезу та параметри.



Рис.1.5. Відомі форми кристалів гідроксиапатиту. Адаптовано з [15].

Частинки ГАП з різною морфологією демонструють різні характеристики. Кілька досліджень підтвердили, що одновимірна структура суттєво покращує механічні властивості порошків ГАПу, забезпечуючи щільну мікроструктуру з високою міцністю та стійкістю до руйнування [60]. Гідроксиапатит стрижнеподібної форми характеризується не тільки високою біоактивністю і біосумісністю, але й поглинаючою здатністю, оскільки стрижні мають велику площу поверхні і цим сприяють ван-дер-ваальсовим взаємодіям [15,60].

Наночастинки ГАПів з системою пор різного розміру, що сполучаються між собою, формують велику питому поверхню (зовнішню і внутрішню), яка сприяє сумісності з тканинами господаря та забезпечує простір для васкуляризації новоутвореної тканини [62]. Пористі структури ГАПів можна розділити на макропористі, мезопористі та мікропористі залежно від розміру пор, як показано на рис.1.6.

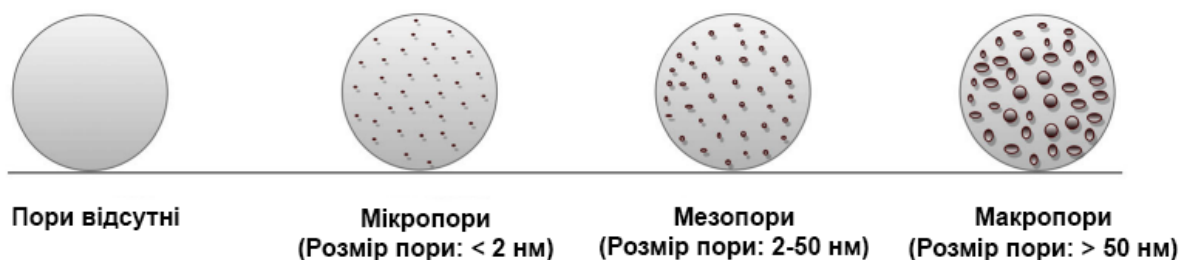


Рис.1.6. Класифікація пористих структур гідроксиапатитів. Адаптовано з [15].

На міцність та твердість ГАПу впливає не тільки загальна пористість, а й розмір пор [15]. Таким чином, має бути належний баланс між міцністю та пористістю частинок гідроксиапатитів для досягнення необхідних механічних властивостей з оптимальними характеристиками для використання в якості синтетичного замітника кістки.

Склад і структура ГАПу залежать від наявності чи відсутності певних іонів [15]. Повідомляється, що біологічна реакція чистого ГАПу з певним середовищем може бути покращена шляхом легування/заміни іонів кальцію іншими іонами. Включення фізіологічно значимих хімічних елементів змінює кристалічну структуру композиту, покращує біосумісність і біоактивність, посилює реакцію остеокластів і остеобластів, які додатково допомагають у процесах регенерації кістки, підсилює остеопровідність, розчинність та термостабільність [15,60]. Різноманітність катіонних та аніонних заміщень у структурі ГАПу можлива завдяки високій гнучкості та стабільності структури гідроксиапатиту (рис.1.4.). Було продемонстровано, що бажані властивості синтетичного ГАПу можуть бути покращені шляхом включення катіонів (Sr^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Mn^{2+}) або аніонів (F^- , Cl^- , HPO_4^{2-} , SiO_4^{4-} або CO_3^{2-}) у його кристалічну структуру [15].

1.3. Мезенхімальні стовбурові клітини - джерело доступних клітин для регенерації кісткової тканини.

Найважливішою стратегією тканинної інженерії для сприяння регенерації тканин та органів є розробка біоматриксу, в якому композитні біоматеріали колонізуються клітинами. Вибір типу клітин для відновлення дефекту кісткової тканини залежить від конкретного клінічного випадку, проте стандартним підходом є використання мезенхімальних стромальних стовбурових клітин. Загалом, для створення матриксної конструкції з метою регенерації фракційованих, зламаних кісток можна використовувати кілька типів клітин, включаючи остеобласти, ембріональні стовбурові

клітини (ЕСК), індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (іПСК) та МСК [5]. Остеобласти є аутологічним джерелом клітин, які можна отримати шляхом біопсії кісток пацієнта, але при такому підході вихідна кількість клітин є обмеженою та характеризується низьким проліферативним потенціалом. Високим регенеративним потенціалом володіють мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини або МСК, що є необхідною умовою для тканинної інженерії [7].

Міжнародне товариство клітинної терапії (ISCT) зазначає, що перш ніж МСК будуть використані для тканинної інженерії та клітинної терапії, вони мають відповідати певним критеріям і характеризуватись адгезивністю до культурального пластику, експресувати специфічні мезенхімальні антигени клітинної поверхні та володіти потенціалом до трилінійної диференціації в остеогенному, адипогенному та хондрогенному напрямках [63].

Маркери, які мають бути присутніми на поверхні МСК людини - це CD73, CD90 і CD105. Негативні маркери, експресія яких відсутня на поверхні мезенхімальних стромальних клітин включають CD34, CD45, CD14 або CD11b, CD79- α або CD19 і HLA-DR. Однак слід зазначити, що валідність CD34 як негативного маркера мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин нещодавно була поставлена під сумнів і потребує повторного дослідження [5,13]. Цікаво, що незважаючи на детально розроблені та визначені критерії характеристики МСК, не було виявлено жодного специфічного для даних клітин епітопу, що відрізняв би їх від інших популяцій стовбурових клітин [13]. Тому, відсутність єдиного, унікального маркера МСК продовжує бентежити світове наукове товариство, оскільки, неточна характеристика мезенхімальних стромальних клітин впливає на інтерпретацію отриманих результатів та їхню достовірність. Відсутність остаточного маркера МСК також заважає визначенню точного розташування, функції та походження даних стовбурових клітин *in vivo* [63].

1.3.1. Джерела мезенхімальних стовбурових клітин. МСК присутні у численних тканинах, серед них кістковий мозок (КМ), синовіальна рідина,

амніотична рідина, амніотична оболонка, пульпа зуба, ендометрій, менструальна кров, периферична кров, плацента та навколоплодові оболонки, слинні залози, шкіра, субамніотична оболонка пуповини, Вартонові драгли та жирова тканина [5].

Природньо, під час фізіологічного відновлення кісток, після стадії запалення відбувається фаза мезенхімальної та ангіогенної активації [64]. При цьому, МСК, перетворюючись на остеобласти та хондроцити, піддаються ендохондріальній осифікації [64] і саме тому є більш придатними для інженерії кісткової тканини, порівняно із стовбуровими клітинами іншого походження [63]. Кістковий мозок є найбільш поширеним джерелом для отримання МСК, але, на жаль, аспірати КМ є недостатньо насиченими стовбуровими клітинами і отримання – дуже інвазивна процедура. Крім того, МСК кістковомозкового походження швидко втрачають здатність до проліферації та диференціювання з кожним пасажем клітин [130].

Альтернативним мозку, багатим джерелом стовбурових клітин є стромальна судинна фракція жирової тканини, адже вона містить клітини, які експресують специфічні маркери стовбурових клітин і має подібну здатність до диференціювання, як і стовбурові клітини, виділені із кісткового мозку. Основною перевагою стовбурових клітин адипогенного походження є доступність таких клітин і простіша процедура ізоляції. Крім того, один грам жиру містить у 1000 разів більше стовбурових клітин, ніж один грам кісткового мозку [5]. Було показано, що еквівалентні кістковомозковим стовбурові клітини адипогенного походження мають протизапальні, ангіогенні, імуномодулюючі та відновлюючі властивості. До того ж, якість стовбурових клітин і їхня здатність до проліферації не знижуються з віком пацієнта. Отже, стромальна судинна фракція жирової тканини є перспективним джерелом МСК, які можна використовувати як аутологічні трансплантати для стимулювання зрощення кісток [65].

1.3.2. Використання мезенхімальних стовбурових клітин в клітинній терапії та біоінженерному конструюванні кісткової тканини.

Клітинна терапія з використанням МСК включає такі етапи : виділення МСК із доступного, оптимального для пацієнта джерела та розмноження клітин у культурі *in vitro* [5]. Отже, після виділення з тканин організму людини, популяції МСК можуть бути розмножені в кілька сотень разів, зберігаючи свою мультипотентність і здатність утворювати фібробластні колонієутворюючі одиниці (КУО-Ф) за умов низького висіву ($\sim 10\text{--}100$ кл/см²) на культуральний пластик. При культивуванні МСК за низької щільності клітини набувають високопроліферативний фенотип і зберігають свій потенціал до трилінійної диференціації, що залежить від впливу конкретних розчинних факторів у клітинному мікрооточенні [63].

Протоколи диференціації МСК у певному клітинному напрямку регулярно використовуються та оптимізуються. Наприклад, у остеогенному напрямку мультипотентні мезенхімальні клітини будуть диференціюватись при наявності дексаметазону, β -гліцеролфосфату та аскорбінової кислоти в базовому культуральному середовищі. Для адипогенного спрямування МСК *in vitro* використовують дексаметазон, ізобутилметилксантин та індометацин. А для диференціювання клітин у хондрогенному напрямку застосовують дексаметазон, аскорбінову кислоту, піруват натрію, TGF- β 1 та комбінацію інсулін-трансферин-селену (ITS). Проте використання конкретних факторів росту і їхні концентрації можуть варіювати, залежно від субпопуляції МСК та кінцевої терапевтичної мети [65].

В міру зміни клітинних функцій, біоенергетичний попит і потенціал клітини змінюється. Вражаючою адаптацією диференційованої популяції МСК є збільшення ємності та ефективності мітохондрій [66]. Під час остеогенезу та адипогенезу потенціал мітохондріальної мембрани, комплекси дихальних ферментів, споживання кисню та вміст внутрішньоклітинного АТФ підвищуються (рис.1.7). Виявляється, остеогенна індукція також стимулює біогенез мітохондрій та збільшення кількості копій мтДНК.

Цікаво, що кількість копій мтДНК неухильно зростає в ході остеогенного дозрівання і збільшується загальна мітохондріальна маса клітини. Окрім зниженої залежності від гліколізу, клітини, диференційовані в остеогенному напрямку також демонструють знижену продукцію лактату. Примітно, що мітохондріальна маса не збільшується під час хондрогенезу, що підкреслює специфічність біоенергетичних потреб різних клітинних ліній (рис.1.7) [66]. Мітохондрії також змінюють форму, щоб задовольнити потреби клітин. Цикли мітохондріального злиття та поділу, рухливості та ремодельовання крист, які спільно називають мітохондріальною динамікою, регулюються мітохондріальною активністю.

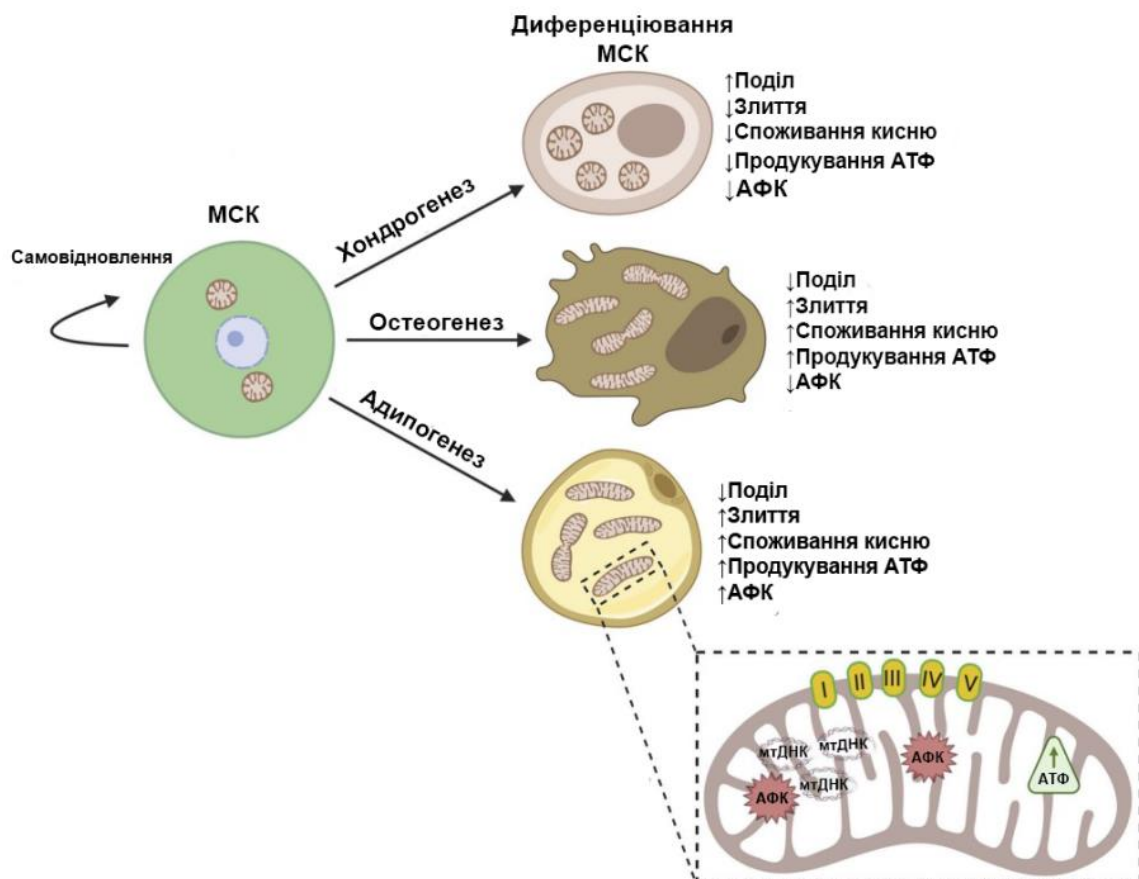


Рис.1.7. Зображення зміни мітохондріальної динаміки при трилінійному диференціюванні мезенхімальних стовбурових клітин. Адаптовано з [66].

Терапевтичний потенціал МСК в контексті регенерації кісткової тканини оцінювався в низці клінічних випробувань, включаючи загоєння переломів кісток, зрощення дефектів кісток щелепи та при профілактиці остеонекрозу, показавши безпечність та потенційну ефективність [65,67]. Наразі існує 235 поточних клінічних досліджень в статусі набору добровольців та активної фази досліджень, які застосовують МСК для терапії певних захворювань (<https://www.clinicaltrials.gov/>). П'ятнадцять досліджень спрямовані на використання МСК для лікування захворювань кісток. Однак, клітинна терапія мезенхімальними стовбуровими клітинами характеризується деякими обмеженнями, зокрема коротким часом життєздатності клітин при їхньому безпосередньому вилученні з живого організму, чітко невизначеними оптимальними дозами та методами введення клітин пацієнту [68].

У тканинно-інженерних підходах, що базуються на використанні МСК різного походження, клітини імплантують разом із синтетичними кістковими трансплантатами для регенерації *in situ*. Використання матриксів, що полегшують локальну доставку стовбурових у місце ураження або дефекту кістки, знижує ризик ектопічного відновлення кісткової тканини [63,67]. Проведене багаточентричне дослідження продемонструвало доцільність і безпечність лікування незрощених дефектів гомілкової, стегнової та плечової кісток аутологічними, розмнуженими в культурі МСК разом із біокерамічними матеріалами [69]. Технічно можна застосувати кілька методів колонізації каркаса. Наприклад, клітини можна культивувати на попередньоствореному матриксі [3], або одночасно осадити клітини і біоматеріал, як продемонстрували Sidonio з колегами [70]. Нанокмпозитні біочорнила є перспективним інструментом для доставки інкапсульованих мезенхімальних стромальних клітин, при цьому утворюються тривимірні конструкції, які мають на меті полегшити відновлення та функціональність кісток [70]. Розроблені комплексні системи для імітування біологічної складності натуральної структури кісткової тканини [71] та підтримки

перфузії та інтерстиціального потоку [72]. Qiao з командою реконструювали нативну структуру остеохондральної тканини, створивши тришаровий кополімерний матрикс, колонізований МСК та провели зоно-специфічну доставку факторів росту [71].

Незважаючи на те, що отримані науковцями результати відкривають нові перспективи в інженерії та регенерації кісткової тканини, досі існує потреба в створенні ідеального матричного біоматералу для інженерії кісткової тканини, який би мав хімічний склад, надзвичайно подібний до природної кісткової тканини, відкрити та взаємопов'язану мережу пор, сприяв неоваскуляризації та встановленню новоутвореної тканини в матрикс трансплантату, забезпечував постачання поживних речовин та кисню, стимулював адгезію, проліферацію та диференціацію клітин, а також володів би адекватними механічними властивостями та міг витримувати біомеханічні навантаження для ефективного відновлення тканини.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Опис об'єкта і предмета дослідження

Об'єктом дослідження експериментальної роботи були виживаність, адгезивність, метаболічна активність та остеогенне диференціювання мехенхімальних стовбурових клітин миші адипогенного походження за умов культивування з гідроксиапатитами.

В свою чергу, предметом дослідження були біосумісність та остеоіндуктивний потенціал гідроксиапатитів з різними хімічними модифікаціями.

2.2. Реактиви, розчини, середовища та обладнання, що були використані в роботі

2.2.1. Реактиви. У роботі було використано наступні реактиви: CuSO_4 (х.ч., ООО Хімлаборреактив, Україна), MgCl_2 (х.ч., ООО Хімлаборреактив, Україна), ацетат амонію ($\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$) (х.ч., ООО Хімлаборреактив, Україна), пеніцилін (ч.д.а., Sigma, США), стрептоміцин (ч.д.а., Sigma, США), аскорбінова кислота (ч.д.а., Sigma, США), β -гліцерофосфат (ч.д.а., Sigma, США), дексаметазон (ч.д.а., Sigma, США), фетальна теляча сироватка (ФТС) (Gibco, ThermoFisher Scientific, США), козяча сироватка (Gibco, ThermoFisher Scientific, США), фосфатно-сольовий буфер (ФСБ) (ч.д.а., Sigma, США), параформальдегід (ч.д.а., Sigma, США), формальдегід (х.ч., ООО Хімлаборреактив, Україна), толуїдиновий синій (х.ч., Sigma, США), додецилсульфат натрію (ч.д.а., Sigma, США), 7-аміно-актиноміцин D (Becton Dickinson, США), сіль тетразолію (3-[4,5-

диметилтіазоліл-2-у] -2,5-дифенілтетразолій бромід) (Sigma, США), диметилсульфоксид (ч.д.а., Sigma-Aldrich, США), нафтол AS-MX фосфат (Sigma-Aldrich, США), N, N-диметилформамід (ч.д.а., Sigma-Aldrich, США), Fast Blue BB сіль (ч.д.а., Sigma-Aldrich), Трис-НCl (х.ч., ООО Хімлаборреактив, Україна), алізариновий червоний S (ч.д.а., Sigma, Cat#A5533), оцтова кислота (х.ч., ООО Хімлаборреактив, Україна), тритон X-100 (ч.д.а.,Sigma-Aldrich, США), DAPI (4', 6-діамідино-2-феніліндол) (ч.д.а., Thermo Fisher Scientific, США), MitoTracker Green^{FM} (M7514, Invitrogen), родамін 123 (R8004, Sigma-Aldrich).

2.2.2. Розчини. У роботі було використано такі розчини:

- 2 г/100 мл алізариновий червоний S;
- 50 мМ амоній-ацетатний буфер, рН 5;
- 2,5 мкг/мл 7-аміно-актиноміцин D;
- 50 мкг/мл аскорбінова кислота;
- 10 мМ β-гліцерофосфат;
- 0,1 мкМ дексаметазон;
- 100 мкл диметилсульфоксид;
- 0,5 % N, N-диметилформамід;
- 0,1% додецилсульфат натрію;
- 10% козяча сироватка;
- 1% колагеназа;
- 5 мг/мл МТТ розчин;
- 0,1 мг/мл нафтол AS-MX фосфат;
- 10% оцтова кислота;
- 4% параформальдегід, рН 7,5-8;
- 3,7 % параформальдегід, рН 7,5-8;
- 3,5% параформальдегід, рН 7,5-8;
- 10х та 1х пеніцилін;
- 10 мкг/мл родамін 123;
- 10х та 1х стрептоміцин;

- 0,1 М трис – HCl, рН 8;
- 0,1% тритон Х-100;
- 0,25% трипсин;
- 0,1% толуїдиновий синій;
- 10% фетальна теляча сироватка (ФТС);
- 10% формалін, рН = 7,5-8;
- 1х фосфатно-сольовий буфер (ФСБ), рН = 7,5-8;
- 1 мг/мл розчин DAPI;
- 10 мМ CuSO₄
- 0,6 мг/мл Fast Blue ВВ сіль;
- 2 мМ MgCl₂;
- 10 нМ MitoTracker Green^{FM}.

2.2.3. Живильні середовища. Для різних варіантів культивування ізольованих МСКап використовували повноцінне середовище Ігла в модифікації Дюльбекко (DMEM) (Sigma Aldrich, США):

1. Середовище для виділення МСК: DMEM, з додаванням 10х антибіотиків (пеніцилін та стрептоміцин).
2. Для рутинного культивування МСК використовували DMEM з низьким вмістом глюкози і додаванням 1х антибіотиків (пеніцилін та стрептоміцин) та 10% ФТС, яке також слугувало контролем у дослідах із спрямованого остеогенного диференціювання клітин.
3. Остеогенне середовище: DMEM з низьким вмістом глюкози, з додаванням 1х антибіотиків (пеніцилін та стрептоміцин), 10% ФТС, 50 мкг/мл аскорбінової кислоти, 10 мМ β-гліцерофосфату та 0,1 мкМ дексаметазону.

2.2.4. Комерційні продукти, ферменти та антитіла. У роботі було використано такі ферменти, антитіла та комерційні продукти:

- колагеназа І типу (Sigma, Великобританія);
- трипсин (Sigma-Aldrich, США);

- мишачі моноклональні антитіла до поверхневих антигенів CD73, CD90, CD105, CD34 та CD45 (BD Bioscience, USA);

- мишачі моноклональні антитіла до поверхневих антигенів CD73 (1:200, bs-4834R-Cy5.5, Bioss Antibodies), CD105 (1:200, sc-18838, Santa Cruz Biotechnology), CD34 (1:200, sc-7324 A647 Santa Cruz Biotechnology);

- середовище для покриття скелець з DAPI (DUO82040, Sigma Aldrich, США);

- Osteopontin ELISA Kit (RAB0437, SIGMA).

2.2.5. Обладнання та витратні матеріали. У роботі було використано таке лабораторне обладнання та приладдя: CO₂ інкубатор (Fisher Scientific, США) центрифуга MiniSpin (Eppendorf, Німеччина), центрифуга Marathon Micro A (Fisher Scientific, США), світловий мікроскоп Primo Star (Carl Zeiss, Геттінген, Німеччина) та програмне забезпечення до нього AxioVision (Carl Zeiss, Геттінген, Німеччина), конфокальний лазерно-скануючий мікроскоп Leica TCS SPE Confocal DMI8 (Leica, Німеччина), спектрофлуориметр Synergy HT (BioTek, США), цитофлуориметр BD FACSAria (Becton Dickinson, США) та програмне забезпечення до нього BD FACS Diva 6.1.2 (Becton Dickinson, США), водяна баня (BIOSAN, Литва), автоматичні піпетки (0,1 мкл - 2 мкл Capp, Данія; 2 – 20 мкл DLAB, США; 20 – 200 мкл DLAB, США, 200 – 1000 мкл DLAB, США), термостат TC-80M-2 (АО “Медлабортехніка”, росія), ваги з точністю до 0,1 мг (Kern, Німеччина), холодильники і морозильник до - 80°C, рН-метр.

У дослідженнях було використано такі витратні матеріали: система Chamber Slide System Lab-TekII (Nalge Nunc int Corp, США), покривні та предметні скельця (ThermoFisher Scientific, США), мікроцентрифужні пробірки об’ємом 1,5 мл та 0,2 мл (EximLab, Україна), наконечники для автоматичних піпеток (ООО "Паритет", Україна), стерильні шприцові фільтри з розміром пор 20 та 40 мкм (MilliPore, Німеччина), стерильні нейлонові сита для суспензії клітин з розміром пор 70мкм (Greiner EASYstrainer, Австрія), пластикові флакони об’ємом

50 мл (ООО "FALCON", Україна), 6-,12-,24-,96- лункові культуральні пластикові планшети (Greiner CELLSTAR, США), металеві скальпелі та ножиці, скляні флакони об'ємом 250 та 500 мл, скляні лійки, скляні палички та паперові фільтри.

2.3. Біологічні об'єкти, які були використанні у дослідженні

Під час виконання експериментальної роботи використовувались миші лінії BALB/c, які є альбіносами: колір їхньої шерсті білий, а очей – червоний [75]. Необхідні умови утримання тварин були забезпечені згідно стандартів віварію Інституту молекулярної біології і генетики НАН України: миші мали *ad libitum* доступ до води та їжі, температура у віварії становила 22 - 24°C, тривалість дня контролювалась штучно та становила 10 годин.

У дослідах використовувались самці віком 2 місяці (6-7 тижнів), із масою 25 -30 г, забій проводився шляхом цервікальної дислокації. Усі маніпуляції з живими тваринами проводилися згідно з протоколами, затвердженими Національним Інститутом Здоров'я про гуманне поводження з лабораторними тваринами, Комітетом по догляду за тваринами Інституту молекулярної біології і генетики, а також з суворою відповідністю до законів, правил та адміністративних положень Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та інших наукових цілях (86/609/ЕЕС).

2.4. Виділення та культивування мезенхімальних стовбурових клітин миші

Мультипотентні мезенхімальні стовбурові клітини адипогенного походження (МСКап) виділяли із шеститижневих самців миші штаму Balb/c. Жирову тканину забирали з пахових жирових складок, промивали в DMEM середовищі з додаванням 10х антибіотиків пеніциліну і стрептоміцину.

Жирову тканину подрібнювали за допомогою стерильного скальпеля та ножиць. В результаті отримали 1 см³ жиру, який інкубували з додаванням 1% розчину колагенази I типу від 30 до 60 хв при 37°C в термостаті. Після цього, суспензію пропускали через нейлонове стерильне сито з розміром пори 70 мкм для того, щоб прибрати великі шматки тканини та стромальної фракції. Отриману гомогенну суспензію центрифугували із прискоренням 1000 x g протягом 5 хв [76]. Далі, надосад зливали, а до осадженої фракції мезенхімальних стовбурових клітин додавали 5 мл DMEM з 1x антибіотиками та 10% ФТС та обережно ресуспендували. Виділені MSCap висівали на пластикові планшети та культивували у CO₂ інкубаторі з вологістю повітря 5% при 37°C до моменту досягання щільності культури 70-80%. Середовище змінювали на свіже кожні два дні.

2.5. Імунофенотипування отриманих мезенхімальних стовбурових клітин миші за допомогою проточної цитометрії (FACS аналіз)

На третьому пасажі культуру мезенхімальних стовбурових клітин адипогенного походження обробляли 0,25% розчином трипсину, промивали ФСБ (рН 7,5) та центрифугували із прискоренням x 400g протягом 5 хв. Після чого, клітини інкубували з шурячими моноклональними антитілами проти мишачих поверхневих антигенів CD73, CD90, CD105, CD34 та CD45 протягом 30 хв без доступу до світла [77]. Далі клітини, мічені антитілами, аналізували методом проточної цитометрії за допомогою клітинного сортера BD FACSAria. Результати візуалізували з використанням програмного забезпечення BD FACS Diva 6.1.2 [78].

2.6. Імуногістохімічний аналіз мезенхімальних стовбурових клітин миші на наявність експресії поверхневих маркерів

Мезенхімальні стовбурові клітини адипогенного походження на третьому пасажі висівали в камерну систему на предметному склі Chamber Slide System Lab-TekII. Клітини культивували за стандартних умов в повноцінному DMEM середовищі з додаванням 1x антибіотиків та 10% ФТС протягом двох днів. Далі, середовище відбирали, а клітини промивали ФСБ двічі по 5 хв. Після цього, культуру MSCap фіксували 4% розчином параформальдегіду в ФСБ (рН 7,5) протягом 10 хвилин за кімнатної температури. Фіксуючий розчин відбирали та промивали клітини ФСБ (рН 7,5) 5 хв. Наступним кроком було гасіння аутофлуоресценції клітин, для цього MSCap інкубували 30 хв за кімнатної температури з розчином 10мМ CuSO₄ у 50 мМ амоній-ацетатному буфері (рН 5). Попередній розчин відбирали та додавали 0,1% розчин тритону X-100 для пермеабілізації мембран клітин [79]. Після цього, промивали клітини ФСБ тричі по 5 хв. Далі, для уникнення антигенної неспецифіки, клітини інкубували з 10% козячою сироваткою протягом 1 години за кімнатної температури. Згодом сироватку відбирали та промивали клітини ФСБ 1 раз протягом 5 хв. Після цього клітини інкубували з кон'югованими первинними антитілами: CD73 (1:200), CD105 (1:200), CD34 (1:200) при 4°C протягом ночі без доступу до світла. На наступний день відібрали розчин антитіл та наносили на клітини спеціальне середовище для покриття скелець з DAPI [80]. Результати візуалізували за допомогою конфокального мікроскопічного аналізу з використанням системи Leica TCS SPE Confocal DMi8.

2.7. Дослідження токсичності та біосумісності гідроксиапатитів

2.7.1. Підготовка експериментальних зразків гідроксиапатитів до використання в експерименті. За день до початку експерименту зразки гідроксиапатитів серій Н-500, НТ-1, НТ-500 та НТІS-500 з різними хімічними модифікаціями та обробкою H_2O_2 і H_2O зважували по 20 мкг, фасували в окремі мікроцентрифужні пробірки та стерилізували вологою парою в автоклаві протягом 30 хв при 1 атм та 120°C . Безпосередньо перед висівом МСКап, стерильні зразки ГАПів додавали до окремих лунок культурального планшету в рівній кількості.

2.7.2. Аналіз виживаності мезенхімальних стовбурових клітин адипогенного походження. Для визначення життєздатності мезенхімальних стовбурових клітин, клітини висівали по 15 000 на лунку в 24-лунковий планшет і культивували з експериментальними зразками гідроксиапатитів протягом 24 годин за стандартних умов в CO_2 інкубаторі з вологістю повітря 5% при 37°C . Далі, середовище відбирали (DMEM з низьким вмістом глюкози, 1x антибіотиками та 10% ФТС), а мезенхімальні стовбурові клітини адипогенного походження обробляли 0,25% розчином трипсину протягом 3-5 хв, візуально контролюючи відкріплення клітин від поверхні культурального посуду. Після цього, клітини промивали ФСБ (рН 7,5) і забарвлювали 7-аміно-актиноміцином D (2,5 мкг/мл) протягом 10 хв [81]. Виживаність клітин оцінювали методом проточної цитометрії за допомогою клітинного сортера BD FACSAria, кожен зразок аналізувався тричі. Результати візуалізували з використанням програмного забезпечення BD FACS Diva 6.1.2

2.7.3. Визначення адгезивності мезенхімальних стовбурових клітин. Мезенхімальні стовбурові клітини миші адипогенного походження висівали на 24-лунковий планшет по 15 000 клітин на лунку та культивували зі зразками гідроксиапатитів серій Н-500, НТ-1, НТ-500 та НТІS-500 протягом 24 годин за стандартних умов (5% CO_2 , 37°C) в DMEM середовищі (з

низьким вмістом глюкози, додаванням 1x антибіотиків та 10% ФТС). Далі, середовище відбирали і промивали клітини ФСБ (рН 7,5). За цим, мезенхімальні стовбурові клітини фіксували 3,5% розчином параформальдегіду (рН 7,5) протягом 1 години. Фіксуючий розчин відбирали і забарвлювали клітини 0,1% розчином толуїдинового синього протягом 3 годин. Після цього, барвник екстрагували 0,1% розчином натрій додецилсульфату (500 мкл на лунку) і вимірювали оптичну щільність при 605 нм за допомогою спектрофлуориметра Synergy HT. Оптичне поглинання кожного варіанту відповідає кількості прикріплених (адгезованих) клітин [82].

2.7.4. Дослідження метаболічної активності мезенхімальних стовбурових клітин адипогенного походження. МТТ – тест використовували для оцінки метаболічної активності стовбурових клітин за умов культивування з гідроксиапатитами з різними хімічними модифікаціями. Для цього МСКап миші висівали на 96-лунковий планшет по 15 000 клітин на лунку і культивували з ГАПами протягом 72 годин при 37° С, 5% CO₂ в культуральному середовищі (DMEM з низьким вмістом глюкози, 1x антибіотиками та 10% ФТС). Далі, до кожної лунки з клітинами додавали по 15 мкл розчину МТТ (сіль тетразолію) (5 мг/мл) та інкубували протягом 4 год за стандартних умов. Після цього, розчиняли утворені кристали формазану шляхом додавання по 100 мкл диметилсульфоксиду до кожної лунки. Метаболічна активність клітин корелює з оптичною густиною розчиненого осаду формазану [83], яку вимірювали при 570 нм за допомогою спектрофлуориметра Synergy HT.

2.7.5. Аналіз мембранного потенціалу мітохондрій мезенхімальних стовбурових клітин. Мезенхімальні стовбурові клітини адипогенного походження висівали на 24-лунковий планшет по 15 000 клітин на лунку та культивували зі зразками гідроксиапатитів з різними хімічними модифікаціями протягом 72 годин за стандартних умов (5% CO₂, 37°С) в DMEM середовищі (з низьким вмістом глюкози, додаванням 1x антибіотиків

та 10% ФТС). Далі, середовище відбирали та промивали клітини ФСБ (рН 7,5) 3 рази. Для визначення мембранного потенціалу мітохондрій, стовбурові клітини миші забарвлювали розчином родаміну 123 [84] з концентрацією 10 мкг/мл та інкубували 15 хв при 37°C без доступу світла. Після цього, розчин барвника відбирали і промивали клітини ФСБ (рН 7,5) тричі. Результат специфічного забарвлення мембран мітохондрії візуалізували без фіксації за допомогою мікроскопа ZEISS Primo Vert, що обладнаний AxioCam ERc 5 із використанням програмного забезпечення Carl Zeiss ZEN Blue. Відносну інтенсивність флуоресценції вимірювали за допомогою програмного забезпечення ImageJ та проводили обрахунки [85].

2.8. Дослідження остеогенного потенціалу гідроксиапатитів

2.8.1. Індукція остеогенного диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин миші адипогенного походження. На третьому пасажі мезенхімальні стовбурові клітини пересівали на 6-лункові планшети по 100 000 клітин на лунку і культивували разом із композитами гідроксиапатитів різних серій та хімічними модифікаціями протягом 17 днів в остеогенному середовищі (DMEM з низьким вмістом глюкози + 1x антибіотики, 10% ФТС, 50 мкг/мл аскорбінової кислоти, 10 мМ β -гліцерофосфату та 0,1 мкМ дексаметазону) за стандартних умов [86]. Паралельно, за таких же умов (5% CO₂, 37°C) культивували стовбурові клітин адипогенного походження з тими ж зразками гідроксиапатитів серій Н-500, НТ-1, НТ-500 у контрольному середовищі (DMEM з низьким вмістом глюкози, 1x антибіотиками та 10% ФТС). В обох експериментальних варіантах культивування середовище замінювали на свіже кожні три дні.

2.8.2. Дослідження активності лужної фосфатази. На 7-й день експерименту з індукції остеогенного диференціювання мезенхімальні стовбурові клітини, що культивувались з гідроксиапатитами в остеогенному

і контрольному середовищах, оцінювали на активність лужної фосфатази (ЛФ) гістохімічним методом. Спочатку від клітин відбирали культуральне середовище і промивали їх ФСБ (рН 7,5). Далі, диференційовані клітини фіксували 3,7 % розчином формальдегіду (рН 7,5) в ФСБ протягом 10 хв за кімнатної температури та промивали двічі ФСБ (рН 7,5). Після цього, клітини інкубували протягом 1 години при 37°C у розчині 0,1 М трис-НСІ (рН 8,5) з сумішшю наступних реагентів: 0,1 мг/мл нафтолу AS-MX фосфату, 0,5 % N, N-диметилформаміду, 2 мМ MgCl₂ та 0,6 мг/мл Fast Blue ВВ сіль [87]. Після забарвлення, розчин для визначення активності лужної фосфатази відбирали, а клітини промивали ddH₂O. Далі візуалізували результат за допомогою мікроскопічного аналізу з використанням інвертованого мікроскопа ZEISS Primo Vert (Carl Zeiss), що обладнаний AxioCam ERc 5 (Carl Zeiss) із використанням програмного забезпечення Carl Zeiss ZEN Blue (Carl Zeiss Microimaging). Зображення були отримані протягом 30–60 хвилин після забарвлення.

2.8.3. Аналіз кількості мітохондрій за умов остеогенного диференціювання культури мезенхімальних стовбурових клітин миші.

На 7-й день експерименту з дослідження остеогенного потенціалу гідроксиапатитів серій Н-500, НТ-1, НТ-500, визначали кількість мітохондрій в мезенхімальних стовбурових клітинах адипогенного походження, що культивувались за контрольних та остеогенних умов. Для цього середовища відбирали та промивали клітини ФСБ (рН 7,5) 3 рази. Потім МСКап забарвлювали 10 нМ розчином MitoTracker Green^{FM} [88] та інкубували 15 хв при 37°C в темному місці. Далі розчин барвника відбирали і промивали клітини ФСБ (рН 7,5) тричі. Результат специфічного забарвлення мітохондріальної маси візуалізували без фіксації за допомогою мікроскопа ZEISS Primo Vert, що обладнаний AxioCam ERc 5 із використанням програмного забезпечення Carl Zeiss ZEN Blue. Відносну інтенсивність флуоресценції вимірювали за допомогою програмного забезпечення ImageJ та проводили обрахунки [85].

2.8.4. Дослідження мембранного потенціалу мітохондрій за умов остеогенного диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин миші. На 7-й день експерименту визначали мембранний потенціал мітохондрій мезенхімальних стовбурових клітин миші адипогенного походження, що піддавались остеогенній диференціації за умов культивування з гідроксиапатитами серій Н-500, НТ-1, НТ-500 у контрольному та остеогенному середовищах. Спершу середовища відбирали та промивали клітини ФСБ (рН 7,5) 3 рази. Після цього стовбурові клітини миші забарвлювали розчином родаміну 123 [84] з концентрацією 10 мкг/мл та інкубували 15 хв при 37°C в темному місці. Далі розчин барвника відбирали і промивали клітини ФСБ (рН 7,5) тричі. Аналіз результатів специфічного забарвлення мембран мітохондрій проводили за допомогою мікроскопа ZEISS Primo Vert, що обладнаний AxioCam ERc 5 із використанням програмного забезпечення Carl Zeiss ZEN Blue. Відносну інтенсивність флуоресценції оцінювали використовуючи програмне забезпечення ImageJ та проводили обрахунки [85].

2.8.5. Аналіз депозитування позаклітинного кальцію. На 17-й день експерименту мезенхімальні стовбурові клітини миші оцінювали на здатність утворювати мінералізований позаклітинний матрикс за умов їхнього культивування з гідроксиапатитами серій Н-500, НТ-1, НТ-500 у контрольному і остеогенному середовищах. Для цього середовища відбирали і промивали клітини ФСБ (рН 7,5) двічі, а потім фіксували 10% розчином формаліну (рН 7,5) протягом 30 хв за кімнатної температури. Далі клітини двічі промивали ddH₂O і забарвлювали свіжоприготовленим розчином алізарину червоного S (рН 4,1 - 4,3) за кімнатної температури в темряві протягом 1 години. Після цього зв'язаний з іонами Ca²⁺ алізариновий червоний відмивали 2-4 рази ddH₂O об'ємом 1,5 мл. Потім до кожної лунки планшету додавали по 1 мл ФСБ та елюювали барвник, додаючи по 400 мкл 10% оцтової кислоти. Кількість позаклітинних відкладів кальцію аналізували, вимірюючи оптичне поглинання утвореного пігменту між алізарином та

іонами Ca^{2+} при 405 нм за допомогою спектрофлуориметра Synergy HT. Значення оптичного поглинання корелює з наявністю барвника в позаклітинному просторі клітини, а отже і з кількістю накопиченого кальцію [89].

2.8.6. Вимірювання рівнів остеопонтину в середовищі та клітинних лізатах мезенхімальних стовбурових клітин миші. На 17-й день експерименту з дослідження остеогенного потенціалу композитів гідроксиапатитів (серій Н-500, НТ-1, НТ-500) з різними хімічними модифікаціями на культуру мезенхімальних стовбурових клітин адипогенного походження було припинено їхнє культивування з метою визначення рівнів остеопонтину в клітинних лізатах та кондиційованому середовищі. Спершу відбирали середовище, в якому культивувались клітини, та зберігали його на льоду при 4°C до безпосереднього використання в аналізі. Паралельно клітини промивали ФСБ (pH 7,5) і механічно відокремлювали від планшета шляхом активного піпетування з 0,1% розчином Triton X-100 в ФСБ (pH 7,5). Після цього, суспензії клітинних лізатів центрифугували та відбирали супернатант, який надалі використовували для імуноферментного аналізу. Концентрацію остеопонтину в клітинних лізатах та безклітинному середовищі вимірювали з використанням комерційного набору ELISA (RAB0437, SIGMA) для визначення мишачого остеопонтину відповідно до рекомендацій виробника [90]. Дані зчитували спектрофлуориметром Synergy HT (BioTek, США) при довжині хвилі 450 нм в межах 10 хв після зупинення реакції. За даними оптичного поглинання зразків стандартів, із відомою концентрацією, будували криву стандартів, за якою визначали концентрації остеопонтину в експериментальних зразках.

2.9. Статистичний аналіз отриманих даних

Кожен аналіз проводився в трьох і більше повторах, статистичні обрахунки результатів проводили з використанням програмного забезпечення GraphPrism7 (GraphPad, USA). Відмінності між групами оцінювались за допомогою дисперсійного однофакторного аналізу (ANOVA), після чого проводилось багатофакторне порівняння за критерієм Т'юке. Статистично достовірні дані на графіках представляють середнє значення \pm стандартне відхилення.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Характеристика експериментальних зразків гідроксиапатитів

Відомо, що на остеоіндуктивні властивості композитних біоматеріалів на основі гідроксиапатиту та кальцій-фосфатної кераміки, із яких створюють матрикси для реконструювання кісткової тканини, впливають поліфазність складу, легування остеотропними елементами, геометрія мікроструктури поверхні, наявність взаємопов'язаної мережі відкритих та закритих пор і розчинність кальцієвмісних сполук. Крім того, біокомпозити мають сприяти, покращувати та індукувати диференціювання і проліферацію клітин природної кістки, забезпечуючи постачання кисню та факторів росту [3,10].

Експериментальні зразки гідроксиапатитів серій Н-500, НТ-1, НТ-500 та НТІS-500 були надані нам Наталею Володимирівною Ульянчич, старшим науковим співробітником відділу фізики міцності і пластичності матеріалів Інституту проблем матеріалознавства ім. І. М. Францевича Національної академії наук України в рамках колаборації науково-дослідних інститутів. Мінімальні характеристики зразків ГАПів наведені в таблиці 3.1. Вміст іонів Ca^{2+} оцінювали шляхом витримування наважки зразку в рідині, що імітує фізіологічну. Після доби інкубування визначали концентрацію іонів кальцію в рідині у % до маси наважки. Адсорбційну активність по індикатору (ААІ) кожного із зразків оцінювали шляхом забарвлення метиленовим синім [10].

Параметри та хімічний склад гідроксиапатитів, що були використані в дослідженні

№	Назва українською	Назва англійською	Характеристики
1	Біомін Г-500/ 3% H ₂ O ₂	H-500/H ₂ O ₂	<ul style="list-style-type: none"> • гідроксиапатит; • розмір гранул 0,4 – 0,6 мм; • Ca²⁺ (мас.%) = 1,9; • оброблений 3% H₂O₂; • AAI = 106,1;
2	Біомін Г-500	H-500	<ul style="list-style-type: none"> • гідроксиапатит; • розмір гранул 0,4 – 0,6 мм; • Ca²⁺ (мас.%) = 2,6; • без обробки; • AAI = 44,6;
3	Біомін Г-500/H ₂ O	H-500/H ₂ O	<ul style="list-style-type: none"> • гідроксиапатит; • розмір гранул 0,4 – 0,6 мм; • Ca²⁺ (мас.%) = 2,3; • оброблений ddH₂O; • AAI = 89,2;
4	Біомін ГТ-1/ 3% H ₂ O ₂	HT-1/H ₂ O ₂	<ul style="list-style-type: none"> • двофазний фосфат кальцію, Ca²⁺ (мас.%) = 7,3; • гідроксиапатит, β-трикальційфосфат (мас.%) = ≥50; • розмір гранул 0,8 – 1,0 мм; • оброблений 3% H₂O₂; • AAI = 101,5;
5	Біомін ГТ-1/H ₂ O	HT-1/H ₂ O	<ul style="list-style-type: none"> • двофазний фосфат кальцію, Ca²⁺ (мас.%) = 7,8; • гідроксиапатит, β-трикальційфосфат (мас.%) = ≥50; • розмір гранул 0,8 – 1,0 мм; • оброблений ddH₂O; • AAI = 72,5;

6	Біомін ГТ-1	НТ-1	<ul style="list-style-type: none"> • двофазний фосфат кальцію, Ca^{2+} (мас.%)= 8,0; • гідроксиапатит, β-трикальційфосфат (мас.%) = ≥ 50; • розмір гранул 0,8 – 1,0 мм; • без обробки; • ААІ = 36,3;
7	Біомін ГТ-500/ H_2O	НТ-500/ H_2O	<ul style="list-style-type: none"> • двофазний фосфат кальцію, Ca^{2+} (мас.%)= 7,9; • гідроксиапатит, β-трикальційфосфат (мас.%)= 35; • розмір гранул 0,4 – 0,6 мм; • оброблений ddH_2O; • ААІ = 85,1;
8	Біомін ГТ-500/3% H_2O_2	НТ-500/ H_2O_2	<ul style="list-style-type: none"> • двофазний фосфат кальцію, Ca^{2+} (мас.%)= 7,7; • гідроксиапатит, β-трикальційфосфат (мас.%)= 35; • розмір гранул 0,4 – 0,6 мм; • оброблений 3% H_2O_2; • ААІ = 116,4;
9	Біомін ГТ-500	НТ-500	<ul style="list-style-type: none"> • двофазний фосфат кальцію, Ca^{2+} (мас.%)= 8,3; • гідроксиапатит, β-трикальційфосфат (мас.%)= 35; • розмір гранул 0,4 – 0,6 мм; • без обробки; • ААІ = 56,3;

10	Біомін ГТЛС-500	HTIS-500	<ul style="list-style-type: none"> • двофазний фосфат кальцію, Ca^{2+} (мас.%) = 7,9; • гідроксиапатит, β-трикальційфосфат (мас.%)= 30; • розмір гранул 0,4 – 0,6 мм; • легований сріблом, Ag (мас.%)=1; • без обробки; • ААІ = 41,4;
11	Біомін ГТЛС- 500 (850°C)/3% H_2O_2	HTIS-500/ H_2O_2	<ul style="list-style-type: none"> • двофазний фосфат кальцію, Ca^{2+} (мас.%) = 7,1; • гідроксиапатит, β-трикальційфосфат (мас.%) = 30; • розмір гранул 0,4 – 0,6 мм; • легований сріблом, Ag (мас.%)=1; • оброблений 3% H_2O_2; • ААІ = 107,1;
12	Біомін ГТЛС-500 (850°C)/ H_2O	HTIS-500/ H_2O	<ul style="list-style-type: none"> • двофазний фосфат кальцію Ca^{2+} (мас.%) = 7,5; • гідроксиапатит, β-трикальційфосфат (мас.%) = 30; • розмір гранул 0,4 – 0,6 мм; • легований сріблом, Ag (мас.%)=1; • оброблений ddH_2O; • ААІ = 88,4.

Структуру зразків композитних матеріалів було проаналізовано за допомогою сканувальної електронної мікроскопії. Збільшення в полі зору вказане в лівому кутку кожної мікрофотографії. На рис.3.1. зображена структура чистого гідроксиапатиту, що репрезентований в роботі зразками серії Н-500 [10].

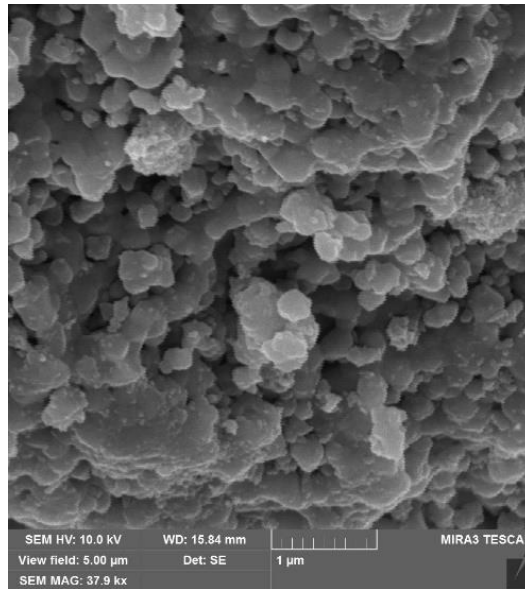
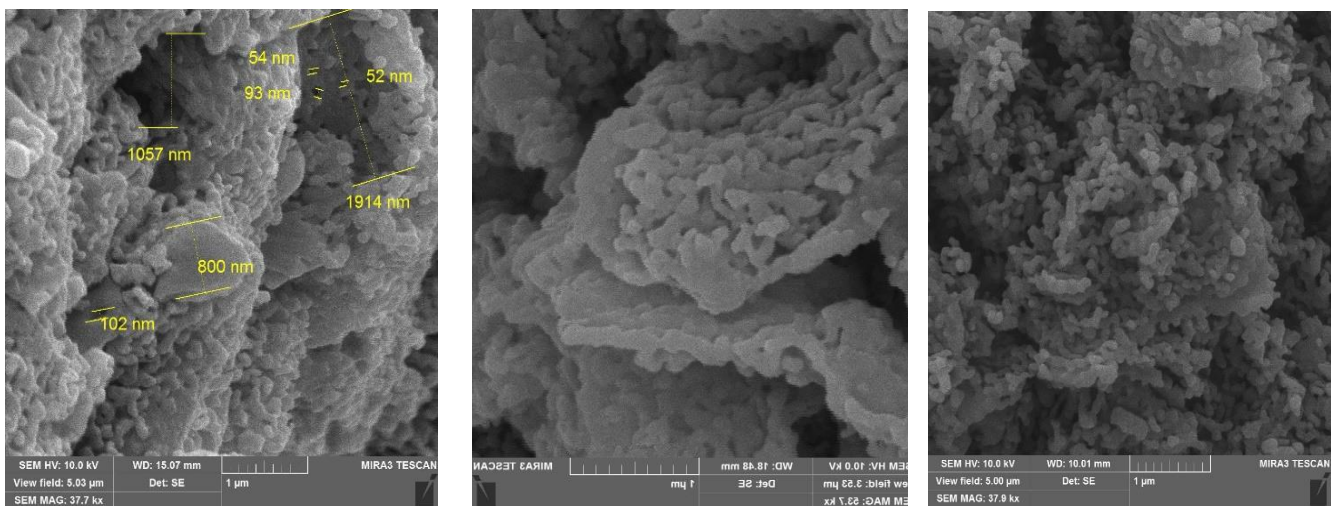


Рис.3.1. Мікрофотографія структури гідроксиapatиту серії Н-500. Масштаб – 5 мкм.

Структура зразків ГАПів типу НТ (серії НТ-1, НТ-500 та НТІS-500), які за складом є композитами гідроксиapatиту та β-трикальційфосфату, є голчастою. Зміни в структурі, які виникають внаслідок хімічних обробок 3% перекисом водню та дистильованою водою, ілюстровані на рис.3.2 [10].



Без обробки

Оброблений 3% H₂O₂

Оброблений ddH₂O

Рис.3.2. Мікрофотографії структури композитів гідроксиapatиту та β-трикальційфосфату типу НТ, за умов різних хімічних обробок. Масштаб – 5 мкм.

У типового зразка композиту гідроксиапатиту та β -трикальційфосфату (НТ) (серії НТ-1, НТ-500, НТІS-500) присутні пори різних розмірів: макро-, мезо- та нанопори (рис.3.2, фото зліва). Нанопори добре видно на внутрішніх стінках гранули, завдяки їм відбувається диференціювання клітин в остеогенному напрямку в умовах *in vitro* та *in vivo*. Приблизно їхню кількість можна оцінити за адсорбційною активністю індикатора, в даному випадку – за значенням оптичного поглинання метиленового синього, яким забарвлювали кожен із експериментальних зразків (табл.3.1, значення ААІ). Мезопори сприяють підвищенню резорбції біокераміки. В свою чергу, макропори сприяють васкуляризації та зростанню утвореної нової кісткової тканини з матрисним біоматеріалом. Методом гідростатичного зважування було визначено відсотковий розподіл відкритої та закритої пористості композитів типу НТ (рис 3.3), до того ж було показано, що час промивання зразка в ультразвуковій ванні (УЗВ) кардинально не впливає на загальну кількість пор [10].

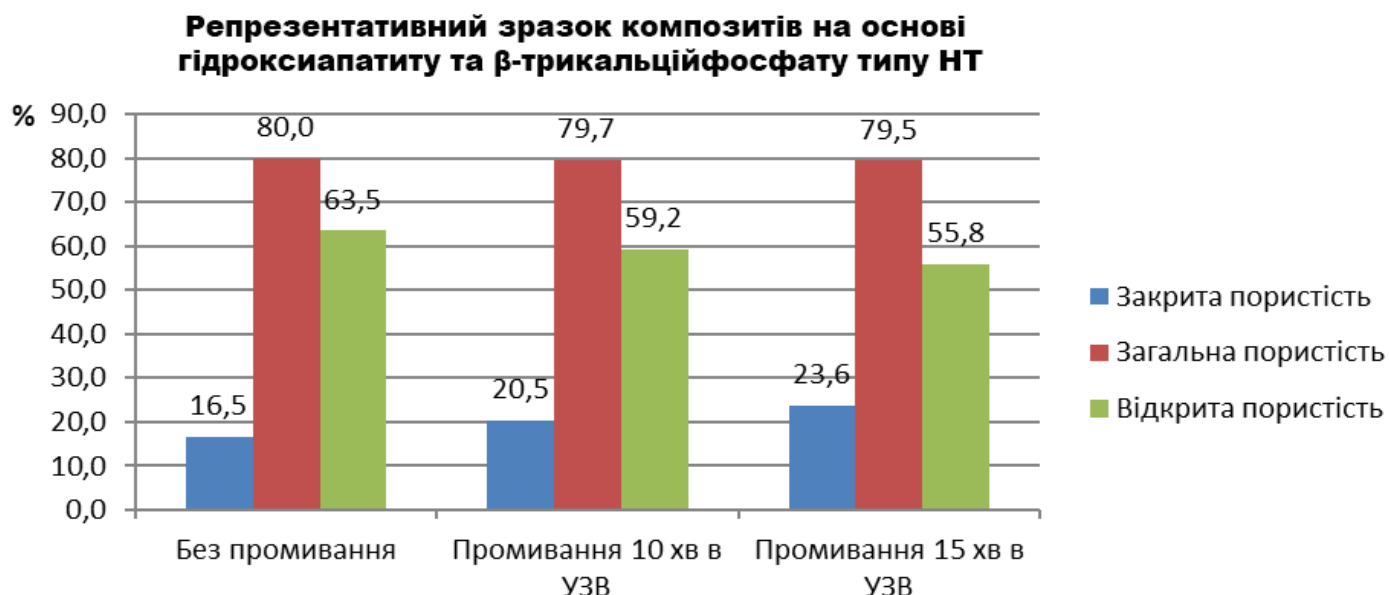


Рис 3.3. Пористість типового зразка композиту НТ.

3.2. Фенотипічна та морфологічна характеристика мезенхімальних стовбурових клітин миші адипогенного походження

Для того, щоб стверджувати, що виділені клітини із жирової тканини миші за визначенням та вимогами міжнародного товариства клітинної терапії (ISCT) [63] справді є мезенхімальними мультипотентними стовбуровими клітинами, на третьому пасажі було проведено імунофенотипування на поверхневі маркери, властиві МСК. Завдяки імуногістохімічному аналізу було виявлено, що виділені МСКап характеризуються високою експресією специфічного мезенхімального маркера ендогліну – CD105 та зниженою і відсутньою експресією гемопоетичних маркерів – CD73 та CD45, відповідно. Про це свідчать мікрофотографії, отримані в результаті конфокальної мікроскопії на рис. 3.4.

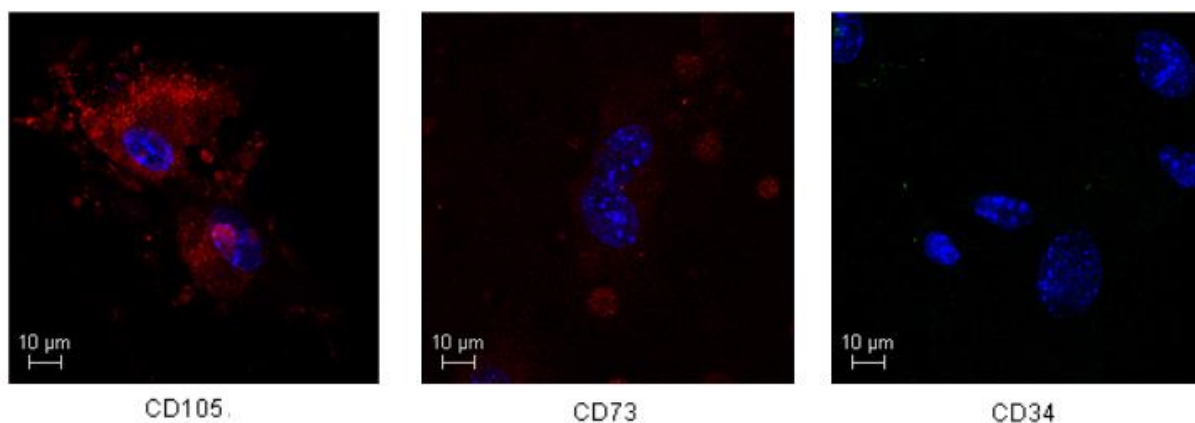


Рис. 3.4. Мікрофотографія мезенхімальних стовбурових клітин адипогенного походження на 3-му пасажі. Масштаб – 100 мкм.

Наявність та відсутність поверхневих антигенів на мембрані МСКап на третьому пасажі також визначали за допомогою проточної цитометрії (FACS аналіз). Було підтверджено присутність високої експресії мезенхімальних маркерів CD90 та CD105, та знижену або майже відсутню експресію гемопоетичних – CD73, CD34 та CD45 (рис. 3.5).

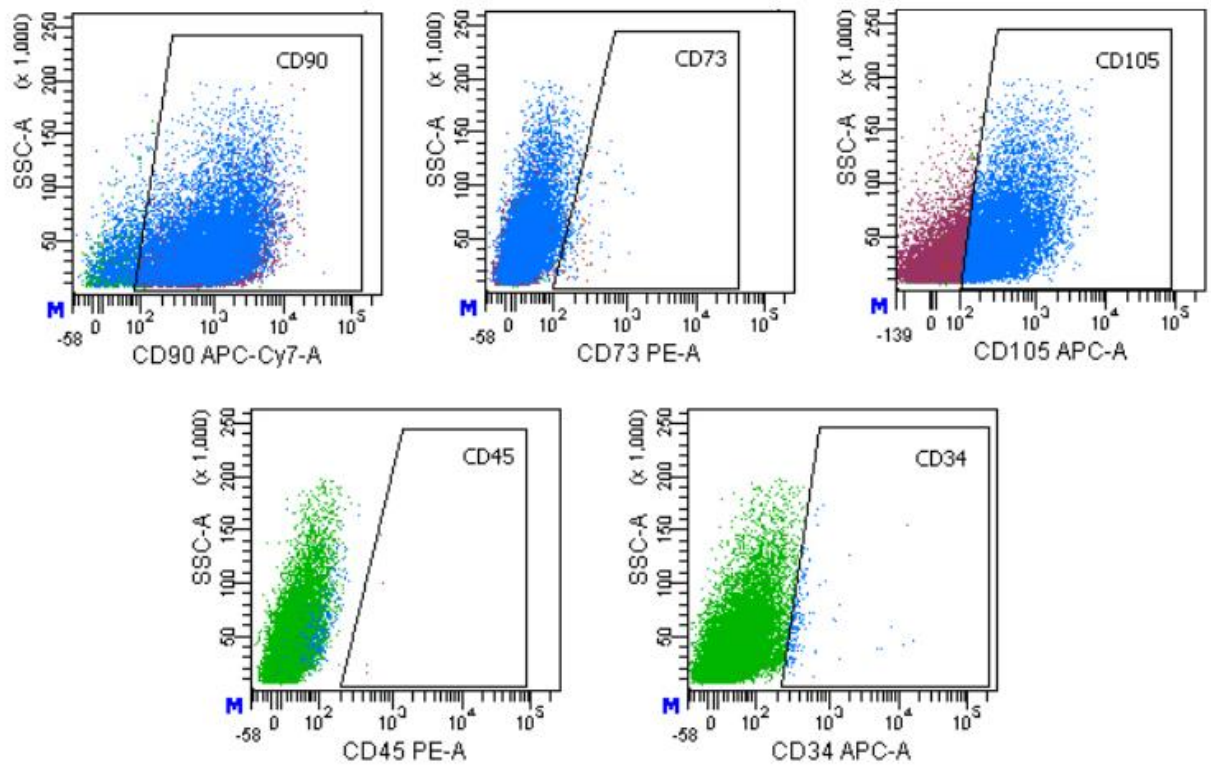


Рис.3.5. Результати FACS аналізу на поверхневі маркери мезенхімальних стовбурових клітин адипогенного походження.

Також, ізолювані МСКап мають типову морфологію та характеризуються високою адгезивністю до культурального пластику (рис. 3.6).

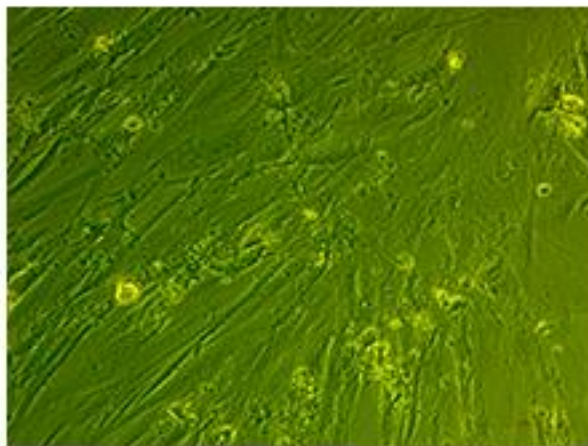


Рис.3.6. Мікрофотографія живих мезенхімальних стовбурових клітин адипогенного походження на 3-му пасажі. Масштаб – 100 мкм.

3.3. Дослідження токсичності та біосумісності гідроксиапатитів

Ідеальна матриксна структура для інженерії та регенерації кісткової тканини повинна бути нетоксичною, біосумісною, мати високі адгезивні властивості та позитивно впливати на життєздатність клітин, які її населяють. Біосумісність визначається як здатність матеріалу забезпечувати сприятливу біологічну реакцію для розвитку тканин і клітин організму, при цьому не викликаючи будь-яких негативних місцевих або систематичних ефектів у реципієнта [91]. Тому перша частина експериментальної роботи була присвячена аналізу біосумісності біоматеріалів на основі гідроксиапатиту. Для цього МСКап миші культивували з експериментальним зразками ГАПів за стандартних умов протягом тижня. При цьому клітини, що культивувались без композитів за тих же умов, слугували контролем.

В результаті аналізу на виживаність клітин було встановлено, що після 24 годинного культивування ГАПи серій Н-500, НТ-1, НТ-500 та НТІS-500 не проявляють негативного впливу на культуру МСКап, оскільки життєздатність клітин була наближеною до 100% (рис.3.7).

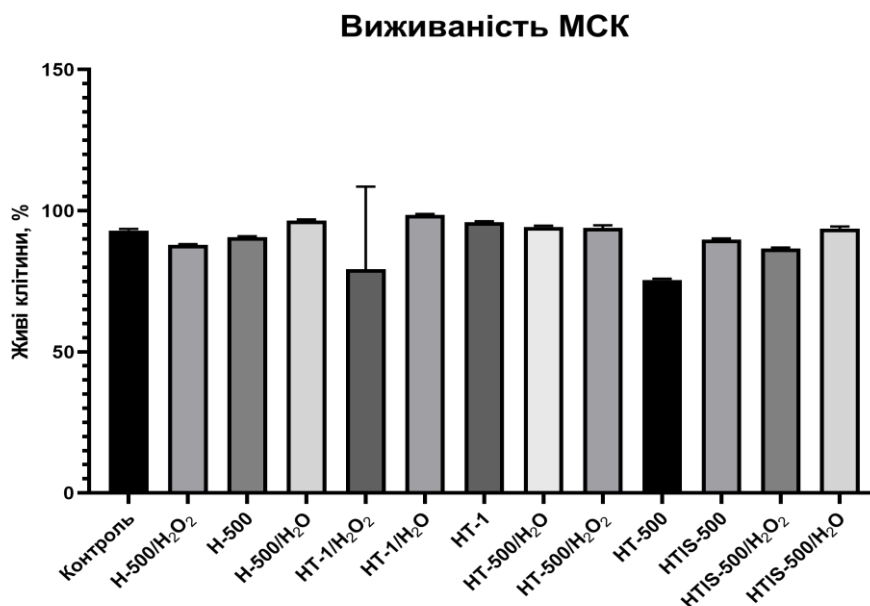


Рис. 3.7. Вживаність мезенхімальних стовбурових клітин адипогенного походження за умов культивування з гідроксиапатитами протягом доби.

Спираючись на дані, представлені на графіку, можна зробити висновок, що кількість живих МСК, інкубованих зі зразками Н-500/Н₂О, НТ-1/Н₂О та НТ-1 була вищою, порівняно з контрольними клітинами, а отже, ці композити ГАПів сприяють нормальному функціонуванню та росту клітин на початку сумісного культивування. Також, були варіанти, де виживаність клітин була на рівні з контролем, вони культивувались з Н-500, НТ-500/Н₂О, НТ-500/Н₂О₂ та НТІS-500/Н₂О зразками гідроксиапатитів.

Адгезія клітин є важливою складовою клітинної комунікації та функціонування, а також має фундаментальне значення для розвитку та формування тканин. Механічні взаємодії між клітиною та матриксним біоматеріалом впливають на поведінку клітини [92]. Дослідження адгезивності МСК на поверхні ГАПів після 24 годин сумісного культивування показало, що всі експериментальні зразки композитів володіють високими адгезивними властивостями (рис.3.8).

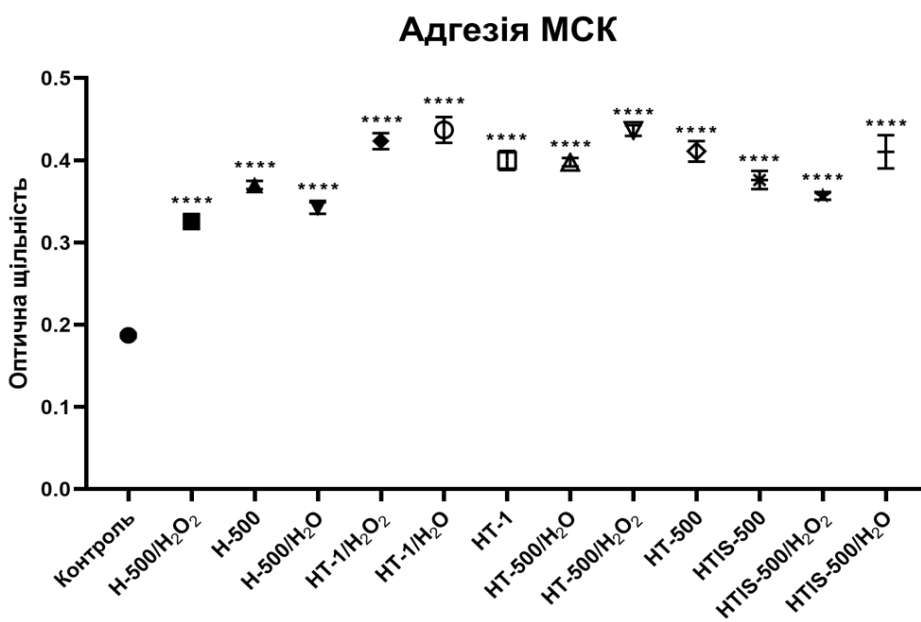


Рис. 3.8. Значення оптичного поглинання толуїдинового синього мезенхімальними стовбуровими клітинами за умов культивування з експериментальними зразками гідроксиапатитів протягом 24 годин. Значення р: $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ та $p < 0,0001$ вважаємо за статистично значущі та відображаємо їх на рисунках у вигляді *, **, *** та **** відповідно.

Кількість прикріплених клітин була вдвічі більшою порівняно з контрольними клітинами, які культивувались без гідроксиапатитів за стандартних умов на культуральному пластику (рис.3.8). При цьому, значення оптичного поглинання елюйованого барвника, а отже і кількість адгезованих клітин, були помітно вищими у варіантах, де МСКап росли на НТ-1/Н₂О₂, НТ-1/Н₂О, НТ-500/Н₂О₂, НТ-500 та НТІS-500/Н₂О композитах ГАПів. Це спостереження узгоджується з даними про адсорбційну активність даних зразків (табл.3.1) і підтверджує гіпотезу про вплив голчастої та пористої структури матеріалу на його біосумісність та біоактивність.

Цитотоксичність та біосумісність композитних біоматеріалів додатково характеризували за допомогою МТТ тесту на визначення метаболічної активності клітин. МТТ аналіз є показовим і дозволяє оцінити мітохондріальну активність, яка на пряму пов'язана з проліферацією клітин. Сутність методу полягає в перетворенні солі тетразолію (3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифенілтетразолію броміду) до формазану клітинними мітохондріальними дегідрогеназами [93]. Аналіз метаболічної активності МСКап проводили після 72 годин культивування з ГАПами за стандартних умов, контролем виступали клітини, що культивувались без композитів. МТТ тест продемонстрував зниження метаболічної активності мітохондрій МСК миші у два рази порівняно з контролем (рис.3.9). Мітохондріальні дегідрогенази найгірше функціонували в стовбурових клітинах, що росли на зразках ГАПів Н-500/Н₂О, НТ-500/Н₂О та НТІS-500/Н₂О₂. Проте, оцінюючи дані про мітохондріальну активність культури МСКап, можна простежити, що композит НТ-500 сприяв кращій метаболічній активності стовбурових клітин миші порівняно з усіма іншими варіантами ГАПів.

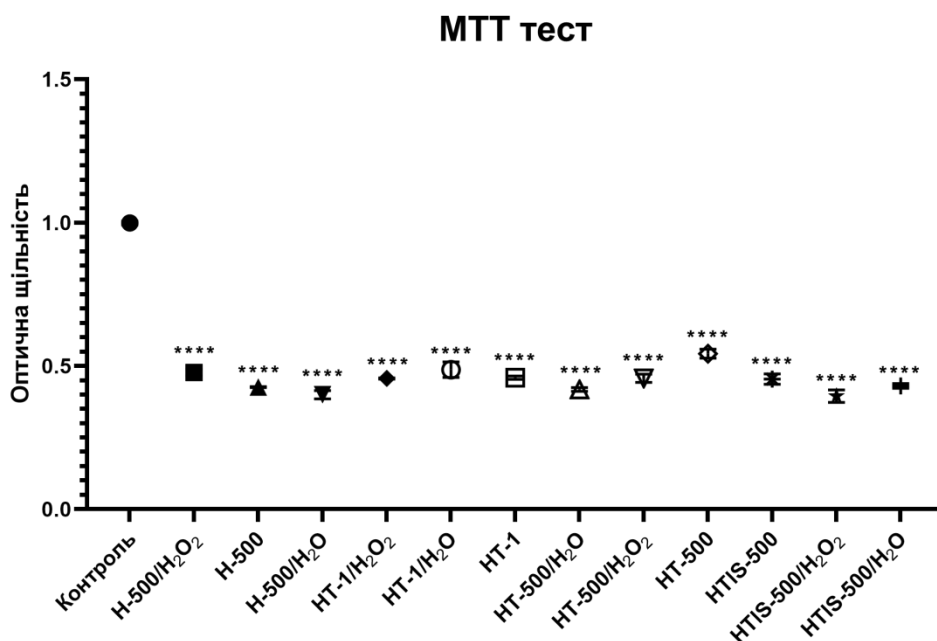


Рис.3.9. Метаболічна активність мезенхімальних стовбурових клітин адипогенного походження миші після 72 годин культивування зі зразками гідроксиапатитів. Значення р: $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ та $p < 0,0001$ вважаємо за статистично значущі та відображаємо їх на рисунках у вигляді *, **, *** та **** відповідно.

Для визначення мембранного потенціалу мітохондрій, стовбурові клітини миші забарвлювали катіонним флуоресцентним барвником зеленого кольору — родаміном 123. Принцип його дії пояснюється Нернстівським розподілом молекул флуорофору по внутрішній мембрані мітохондрії у відповідь на негативний потенціал мембрани. Необхідною умовою аналізу є наявність метаболічно-активних мітохондрій, які генерують мембранний потенціал для притягнення та утримання барвника. Зниження мембранного потенціалу призводить до втрати барвника, а отже і інтенсивності флуоресценції [63].

Аналіз проводили після 72 годин сумісного культивування МСКап з ГАПами (серії H-500, HT-1, HT-500 та HTIS-500) за стандартних умов. В результаті було виявлено зниження мітохондріального потенціалу

стовбурових клітин, як мінімум у півтора рази, порівняно з контролем, де МСКап росли без ГАПів (рис.3.10 та 3.11).

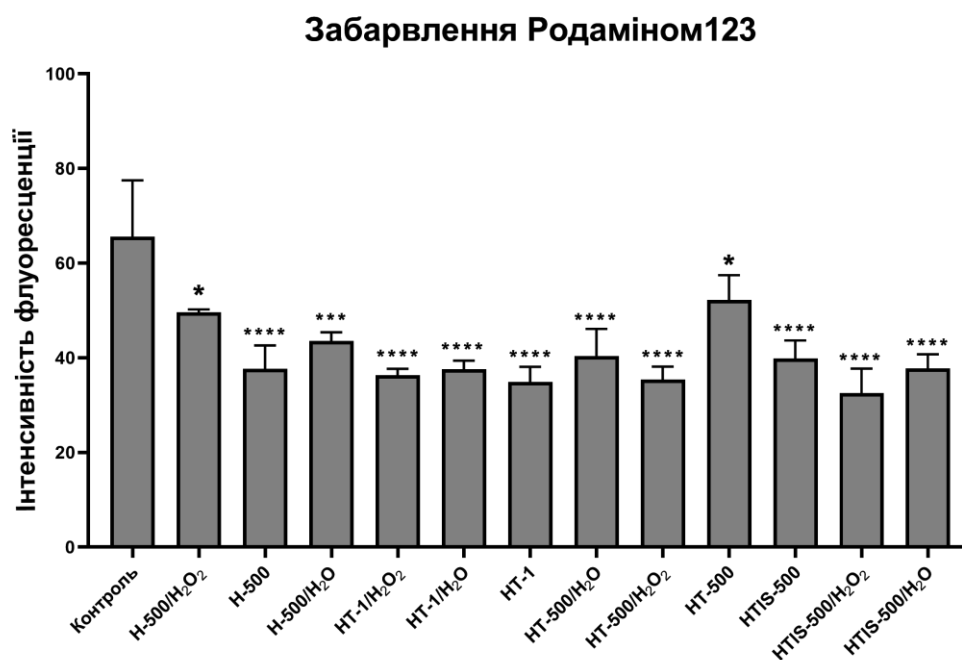


Рис.3.10. Значення потенціалів мітохондріальних мембран мезенхімальних стовбурових клітин за умов культивування з гідроксиапатитами різних серій протягом 72 годин. Значення р: $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ та $p < 0,0001$ вважаємо за статистично значущі та відображаємо їх на рисунках у вигляді *, **, *** та **** відповідно.

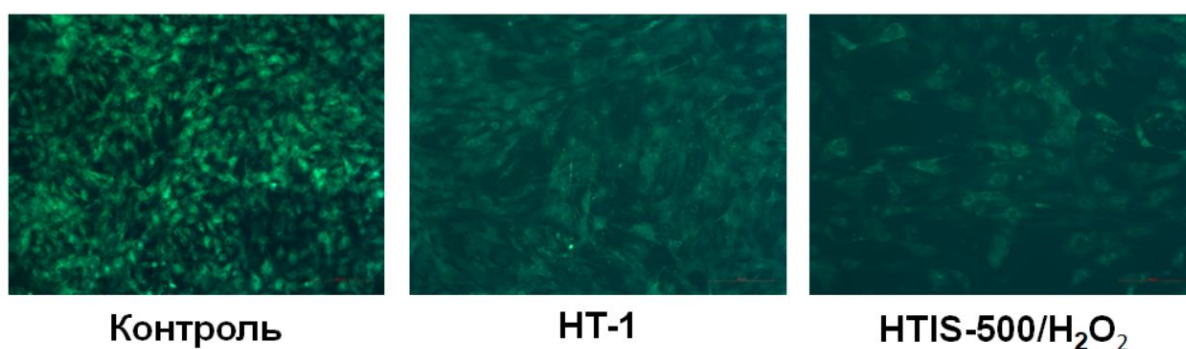


Рис.3.11. Порівняння інтенсивності забарвлення родаміном 123 мітохондріальних мембран стовбурових клітин миші, що культивувались без гідроксиапатитів та зі зразками HT-1 та HTIS-500/H₂O₂ протягом 72 годин. Масштаб – 200 мкм.

В той же час, інтенсивність флуоресценції мітохондріальних мембран МСК у тих варіантах, де клітини інкубувались зі зразками Н-500/Н₂О₂, Н-500/Н₂О та НТ-500, була вищою та більш наближеною до значення мембранного потенціалу, яке демонстрували контрольні клітини (рис.3.10 та рис. 3.12).

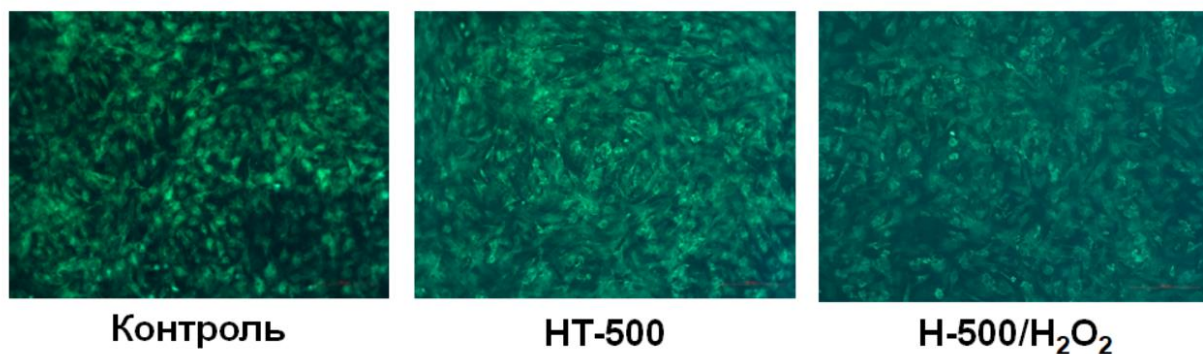


Рис.3.12. Порівняння інтенсивності забарвлення мітохондріальних мембран родаміном 123 за умов культивування МСК кап миші зі зразками НТ-1 та НТІS-500/Н₂О₂ та без них протягом 72-х годин. Масштаб – 200 мкм.

Експериментальний зразок НТІS-500/Н₂О₂ характеризується найнижчими показниками мембранного потенціалу та метаболічної активності мітохондрій МСК кап відносно усіх досліджених композитів. Поясненням та підтвердженням цього результату може бути стан і морфологічні особливості (дефекти) культури стовбурових клітин миші, спричинені токсичним впливом іонів срібла, які входять до складу кристалів ГАПів серії НТІS-500. Мікрофотографії (рис.3.11), отримані під час мікроскопічного аналізу живих МСК кап, забарвлених родаміном 123, дозволяють якісно оцінити мембранний потенціал мітохондрій, кількість та стан клітин, а також зробити перші припущення щодо цитотоксичності легованих сріблом гідроксиапатитів. Ці дані узгоджуються та доповнюють результати метаболічної активності МСК кап за умов культивування з композитами гідроксиапатитів, та свідчать про уповільнену проліферацію стовбурових клітин. Оскільки зниження мембранного потенціалу

мітохондрій та їхньої активності у МСКап є взаємопов'язаними явищами та є характерним ефектом всіх експериментальних кристалів, можна припустити, що знижена метаболічна активність стовбурових клітин припадає на фазу адаптації культури МСКап до рельєфної голчастої структури біоматеріалів та остеointegraції МСК миші у матрикс композитів.

Варто зазначити, що при тривалому культивуванні та спостереженні за ростом МСК мишей на композитних біоматеріалах, помітили високу летальність МСКап у тих варіантах, де клітини культивувались з кристалами ГАПів, легованими сріблом, протягом 5–6 днів за стандартних умов. Внаслідок яскраво вираженого цитотоксичного ефекту композитів НТІS-500, НТІS-500/Н₂О, НТІS-500/Н₂О₂ щодо культури МСКап, кількість клітин у цих варіантах різко зменшилась. До того ж, МСК миші за умов тривалого культивування з серією біоматеріалів НТІS-500 виглядали округлими, втягнутими та дефектними, порівняно зі стовбуровими клітинами, що культивувались з композитами інших серій за тих же умов (рис.3.13).

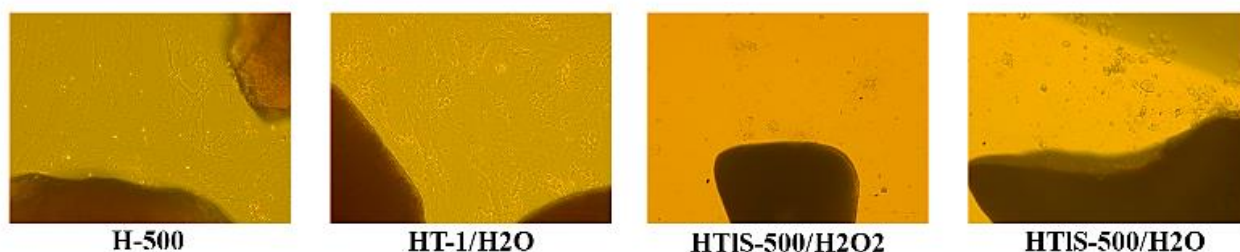


Рис.3.13. Порівняльні мікрофотографії живих мезенхімальних стовбурових клітин миші за умов культивування з гідроксиапатитами серії НТІS-500 та зразків НТ-1/Н₂О, Н-500 протягом 5–6 днів за стандартних умов. Масштаб – 100 мкм.

Тож первинне біотестування експериментальних зразків гідроксиапатитів серій Н-500, НТ-1, НТ-500 та НТІS-500 включало аналізи на виживаність, адгезивність, метаболічну активність й мембранний потенціал мітохондрій та світлову мікроскопію живих клітин. Співставляючи отримані

результати, можна зробити висновок, що всі дослідженні біоматеріали на основі ГАПу володіють високими адгезивними властивостями та позитивно впливають на виживаність МСКап миші за стандартних умов короткочасного культивування. Композити на основі гідроксиапатиту та β -трикальційфосфату (НТ) серій НТ-1, НТ-500 та НТІS-500 характеризуються підвищеною адгезивністю поверхні завдяки своїй високій адсорбційній активності та голчастій структурі, порівняно з іншими експериментальними зразками.

ГАПи типів Н-500, НТ-500 та НТ-1 є нетоксичними та біосумісними з культурою МСК матриксними матеріалами, що було визначено завдяки тривалому ко-культивуванню. Срібловмісні композити серії НТІS-500, незважаючи на високу адгезивну здатність, проявляють цитотоксичний ефект щодо культури МСКап миші за умов тривалого сумісного культивування, а отже характеризуються нижчою біосумісністю, порівняно з іншими проаналізованими зразками ГАПів. Тому ця серія біоматеріалів не використовувалась для подальших досліджень остеогенних властивостей ГАПів.

Також, при короткочасному інкубуванні досліджених кристалів ГАПів з МСК миші за стандартних умов, було помічено зниження метаболічної активності та мітохондріального мембранного потенціалу стовбурових клітин, вірогідно, через необхідність довшого періоду адаптації до поверхні та структури гідроксиапатитів з різними хімічними модифікаціями.

Таким чином, на підставі отриманих даних можна зробити висновок про позитивну біологічну активність композитів гідроксиапатиту серій Н-500, НТ-500 та НТ-1, та цитотоксичний ефект легованих сріблом гідроксиапатитів серії НТІS-500, який перешкоджає росту та проліферації МСК миші за сумісного культивування.

3.4. Дослідження остеогенного потенціалу біоматеріалів на основі гідроксиапатиту

Біоматеріали для конструювання позаклітинного матриксу при біоінженерії кісткової тканини також повинні забезпечувати остеопровідність та osteoінтеграцію клітин, володіти високими osteoіндуктивними властивостями [36]. Тому, одним із поставлених завдань до нашої експериментальної роботи було проаналізувати вплив досліджуваних гідроксиапатитів серій Н-500, НТ-500 і НТ-1 на остеогенне диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин миші адипогенного походження. Для цього, МСКап культивували у контрольному та специфічному остеогенному середовищах з композитами та без них протягом 17 діб. У обох експериментальних варіантах культивування МСК миші спостерігали обростання гранул ГАПів багатьма шарами клітин (Додаток А, рис.1), що свідчить про наявність інтеграційних властивостей у кристалів гідроксиапатитів [24]. Клітини оцінювали за допомогою світлової мікроскопії.

На початку дослідження остеогенного потенціалу композитів на основі гідроксиапатиту, МСКап миші гістохімічно забарвлювали для визначення активності лужної фосфатази (ЛФ) та якісно оцінювали загальну кількість мітохондрій та їхній мембранний потенціал шляхом суправітального забарвлення стовбурових клітин миші мітохондрієспецифічними флуоресцентними барвниками.

Отже, на 7-й день експерименту з індукції остеогенезу оцінювали ступінь активності ЛФ за умов культивування МСКап з ГАПами та без них у контрольному та остеогенному середовищах. Загалом, лужна фосфатаза є ферментом класу гідролаз, що відповідає за дефосфорилування молекул, таких як нуклеотиди та білки за лужних умов. Цей фермент є універсальним маркером плюрипотентності для всіх типів стовбурових клітин, а також одним із найнадійніших, специфічних маркерів остеогенної диференціації,

оскільки ЛФ продукується клітинами остеогенного напрямку, такими як остеобласти [94,95]. Визначення активності ЛФ у фіксованій культурі клітин ґрунтується на властивостях ферменту, а саме на здатності лужної фосфатази гідролізувати фосфатну групу субстрату (нафтол AS-MX фосфат), утворюючи проміжний продукт синього кольору, який окислюється Fast Blue ВВ сіллю з утворенням нерозчинного темно-синього димеру [94].

У результаті ми спостерігали неінтенсивне позитивне забарвлення у клітинах, що культивувались у контрольному середовищі без кристалів ГАПів (рис.3.14, верхнє фото другого ряду).

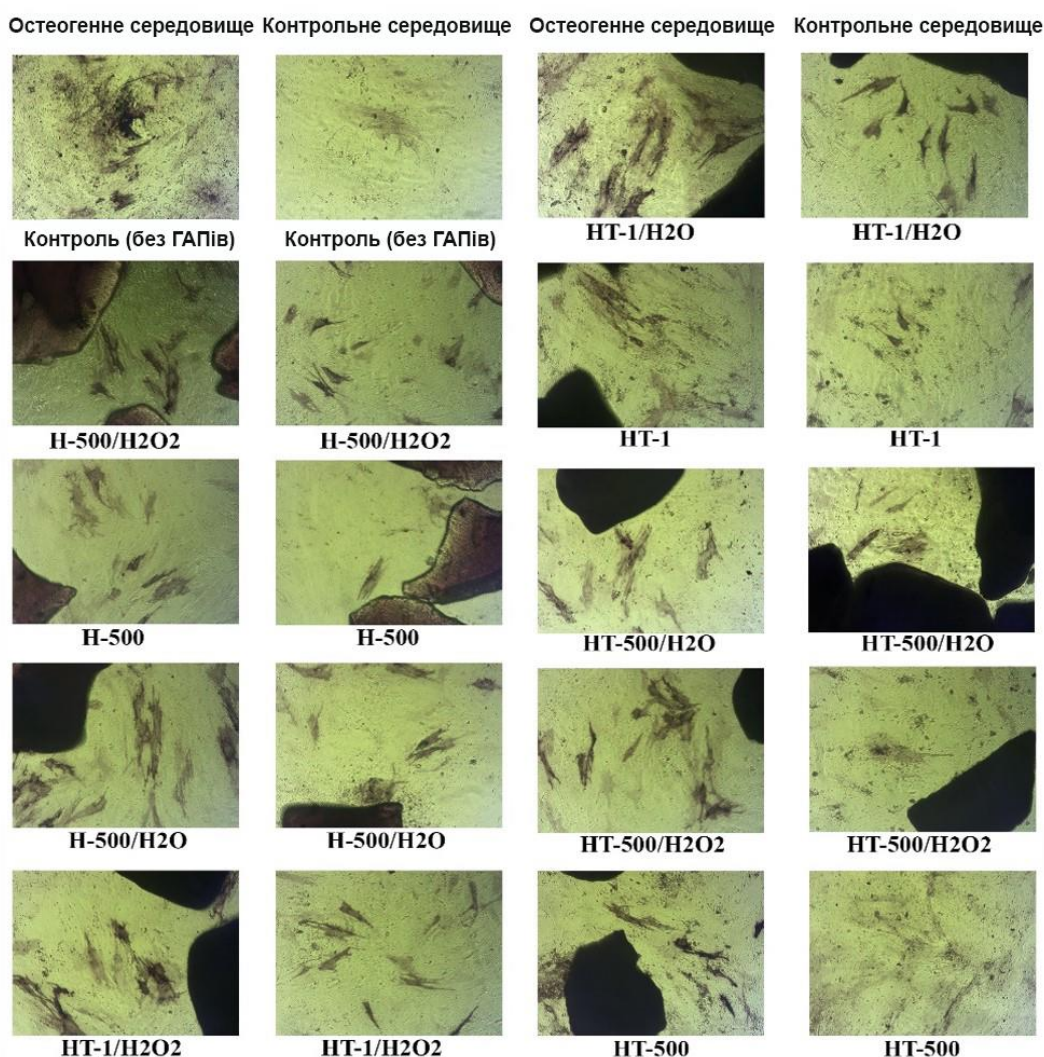


Рис.3.14. Гістохімічне визначення активності лужної фосфатази у мезенхімальних стовбурових клітинах миші, культивованих зі зразками гідроксиапатитів у контрольних і остеогенних умовах протягом 7 днів. Масштаб – 100 мкм.

Інтенсивним забарвленням характеризувались клітини, що росли на поверхні культурального планшету в остеогенному середовищі без гідроксиапатитів (рис.3.14, верхнє фото першого ряду). І, нарешті, сильно позитивні кольорові сигнали, що свідчать про високу активність лужної фосфатази, були виявлені у всіх варіантах культивування стовбурових клітин миші з композитами ГАПів за контрольних та остеогенних умов (рис.3.14, всі ряди фотографій).

Природньо, при індукції диференціювання та під час остеогенного дозрівання МСК, їхні функції та біоенергетичний попит змінюються, що призводить до збільшення копій мтДНК й загальної мітохондріальної маси, а також покращуються метаболічна активність і ефективність мітохондрій клітини [66]. Тому, наступними були проаналізовані кількість та мембранний потенціал мітохондрій МСКап, що культивувались із композитами ГАПів за контрольних і остеогенних умов протягом 7 днів.

MitoTracker GreenTM — мітохондріє-селективний флуоресцентний барвник, який селективно накопичується в мітохондріальному матриксі і ковалентно зв'язується з білками мітохондрій, реагуючи з вільними тіоловими групами залишків цистеїну [88]. В результаті суправітального забарвлення культури МСКап миші мітохондрієспецифічним барвником MitoTracker GreenTM, було помічено, що в стовбурових клітинах які піддавались остеогенному диференціюванню та росли на кристалах ГАПів, загальна мітохондріальна маса збільшилась у півтора разу, на відміну від МСК, що культивувались з композитами ГАПів у контрольному середовищі (рис.3.15). Стовбурові клітини миші, які культивувались в остеогенному середовищі зі зразками НТ-1, НТ-500/Н₂О та НТ-500/Н₂О₂, мають найбільшу кількість мітохондрій порівняно з МСКап, які інкубувались з іншими гідроксиапатитами, що може свідчити про раннє диференціювання в остеогенному напрямку та вказує на проліферацію клітин.

Забарвлення MitoTracker Green™

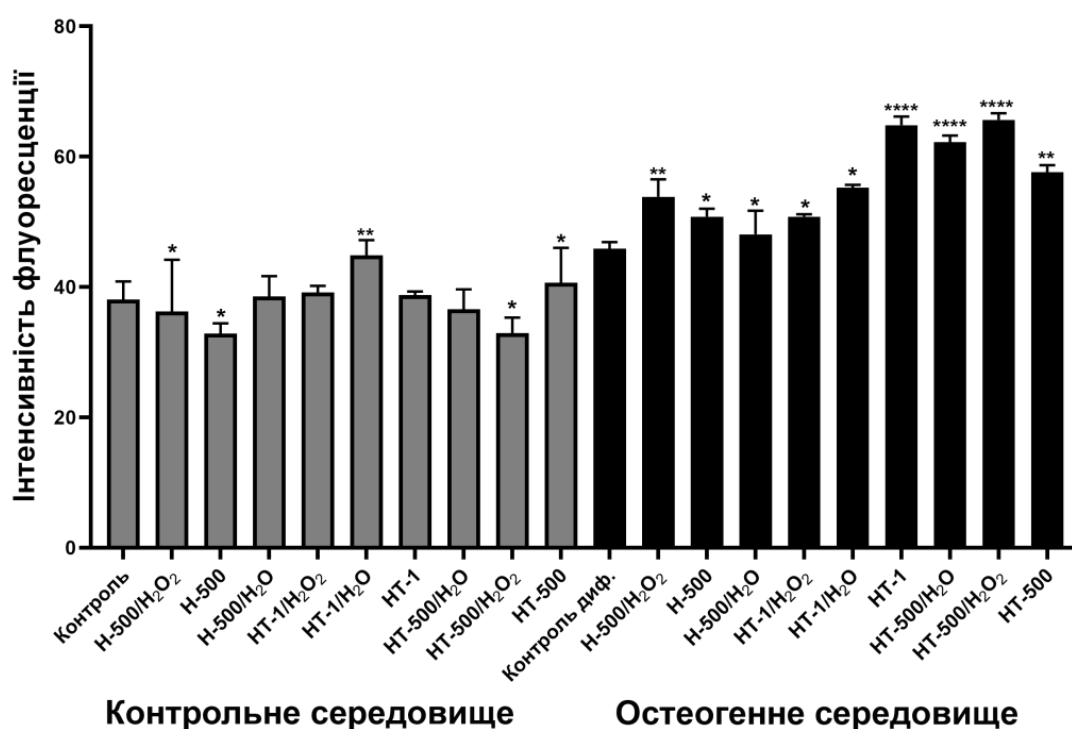


Рис.3.15. Значення загальної кількості мітохондрій мезенхімальних стовбурових клітин миші за умов культивування з гідроксиапатитами в контрольному і остеогенному середовищі протягом 7 днів. Значення p : $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ та $p < 0,0001$ вважаємо за статистично значущі та відображаємо їх на рисунках у вигляді *, **, *** та **** відповідно.

Подальший аналіз мембранного потенціалу мітохондрій МСКап миші, що 7 днів культивувались в остеогенних умовах з ГАПами, виявив зниження потенціалу мембран мітохондрій, на фоні помітно високих значень потенціалів, що характерні для мітохондріальних мембран клітин, які росли на композитах у контрольному середовищі (рис.3.16). В той же час, стовбурові клітини миші, які піддавались остеогенній диференціації за умов інкубування з ГАПами, мають підвищений потенціал мембран мітохондрій, порівняно з контролем диференціювання (МСКап + остеогенне середовище).

Забарвлення Родаміном 123

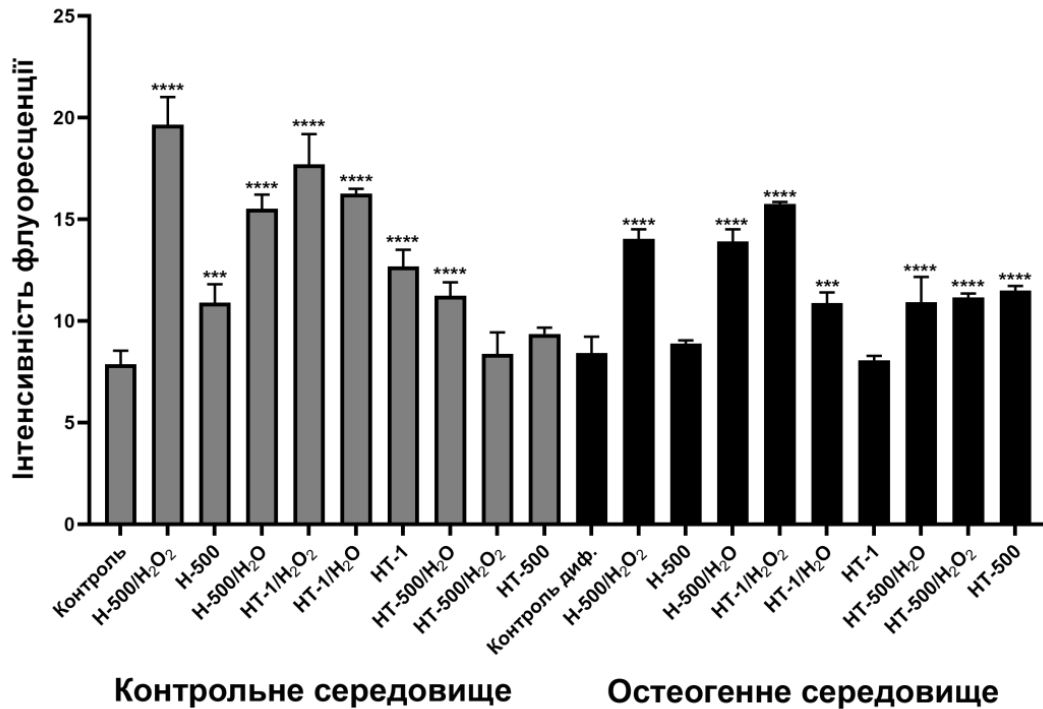


Рис.3.16. Значення потенціалів мембран мітохондрій МСК за умов культивування з ГАПами різних серій в контрольному і остеогенному середовищі протягом 7 днів. Значення p: $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ та $p < 0,0001$ вважаємо за статистично значущі та відображаємо їх на рисунках у вигляді *, **, *** та **** відповідно.

Цікаво, що інтенсивність флуоресценції мітохондріальних мембран контрольних клітин, які культивували без ГАПів, в обох варіантах середовища є майже однаковою, що вказує на біологічну активність досліджуваних зразків ГАПів, оскільки за умов їхнього інкубування з МСК потенціал мембран мітохондрій змінювався. В такому разі, можна припустити, що мітохондрії МСК_К, які культивували з ГАПами в контрольному середовищі, були більш метаболічно стабільними і не витрачали енергетичний ресурс на власний біогенез та посилену проліферацію стовбурових клітин [66]. Альтернативно, МСК_К, що культивувались з композитами ГАПів за умов індукції остеогенезу, мають порівняно нижчий потенціал мітохондріальної мембрани, що пояснюється

активним розмноженням та диференціюванням МСК миші. З цією думкою повністю узгоджуються результати аналізу на визначення загальної маси мітохондрій клітин (рис.3.15).

Найважливішими аналізами при вивченні остеогенного потенціалу біоматеріалів на основі гідроксиапатиту серій Н-500, НТ-500 і НТ-1 були дослідження депозитування позаклітинного кальцію та визначення концентрацій остеопонтину в культуральному середовищі та клітинних лізатах з диференційованих МСКап миші.

Добре відомо, що остеогенна диференціація призводить до відкладання іонів кальцію поза межами клітинної мембрани [13]. Тому на 17-й день остеогенної диференціації МСКап, що культивувались з композитами ГАПів у контрольному і остеогенному середовищах, оцінювали на здатність утворювати мінералізований позаклітинний матрикс та визначали рівні депозитування іонів Ca^{+2} за допомогою гістологічного забарвлення алізариновим червоним (рис.3.17.).

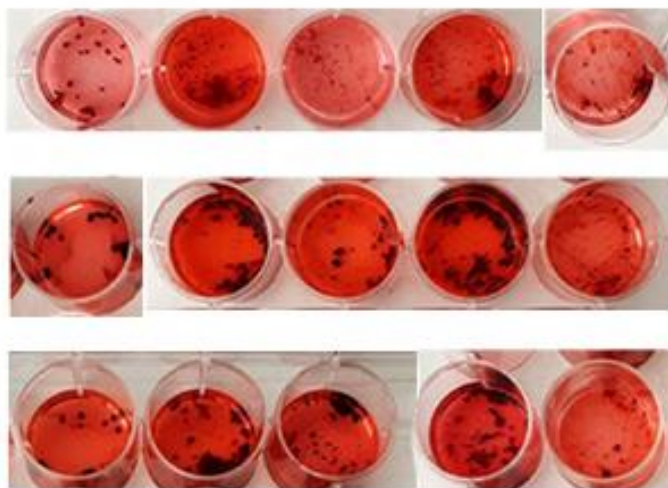


Рис.3.17. Репрезентативні фото забарвлення фіксованої культури МСКап миші та біокомпозитів на основі ГАПу алізариновим червоним.

Алізарин червоний S використовується в гістології для локального визначення покладів кальцію в тканинах. Він специфічно зв'язується з іонами Ca^{+2} , утворюючи S-кальцієвий комплекс або пігмент у процесі

хелатування [89]. За кольором пігменту, що варіює від оранжевого до темно-червоного, можна якісно визначити рівні депозитування кальцію в позаклітинному матриксі клітин. Після екстрагування зв'язаного з кальцієм барвника (рис.3.17), було отримано значення оптичного поглинання утворених комплексів Ca^{+2} /алізарин, які корелюють з кількістю накопиченого кальцію в позамембранному просторі клітин (рис.3.18).

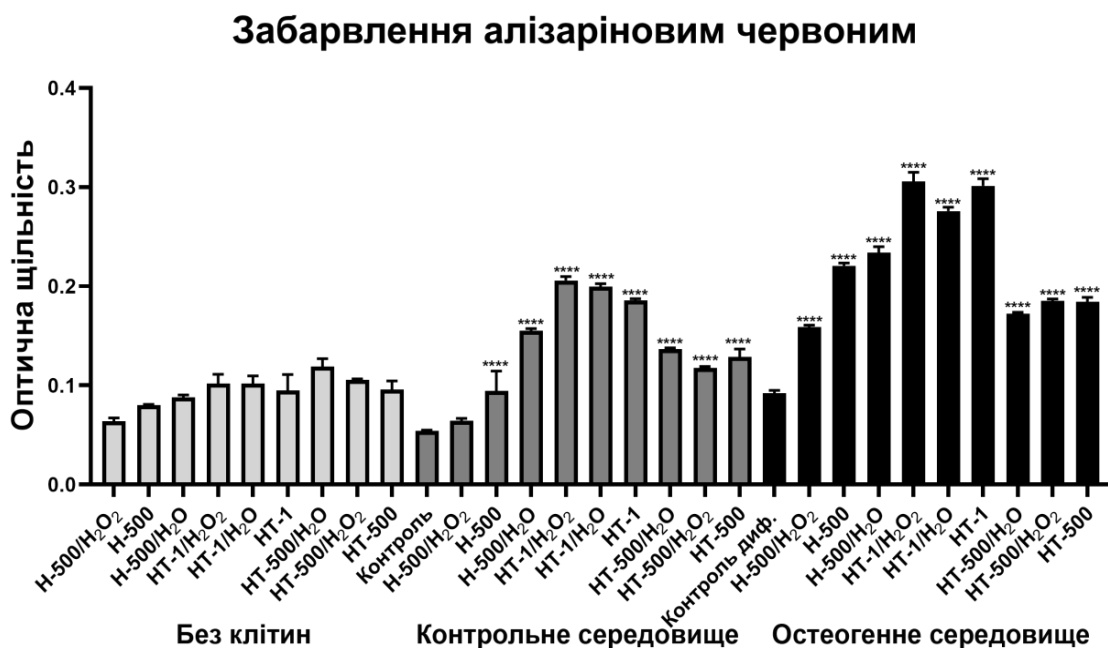


Рис.3.18. Кількісна оцінка накопиченого кальцію в позаклітинному матриксі МСКап, культивованих з ГАПами в контрольних і остеогенних середовищах протягом 17 діб. Значення p : $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ та $p < 0,0001$ вважаємо за статистично значущі та відображаємо їх на рисунках у вигляді *, **, *** та **** відповідно.

Спочатку проаналізували кольорові сигнали (оптичну щільність) від забарвлення кристалів гідроксиапатитів, які інкубували в контрольному культуральному середовищі без клітин, та спостерігали неінтенсивне позитивне забарвлення алізаріновим червоним (рис.3.18). Ймовірно, завдяки специфічному хімічному складу кристалів та різної розчинності фаз композитів на основі ГАПу та β -ТКФ, експериментальні зразки типу НТ

мають тенденцію розчинятись та виділяти певну кількість іонів кальцію в культуральне середовище, тим самим активуючи Ca^{+2} -залежні сигнальні шляхи остеогенезу [13,15]. Зважаючи на вищесказане, висока резорбційна здатність досліджуваних біоматеріалів пояснює виникнення інтенсивного позитивного забарвлення на лужну фосфатазу у клітинах, культивованих з ГАПами у контрольних умовах (рис.3.14).

Подальше визначення рівнів депозитованого кальцію в стовбурових клітинах миші, культивованих з композитами ГАПів в остеогенних і контрольних середовищах, продемонструвало значно вищі, статистично достовірні ($p < 0,0001$) значення кількості позаклітинних іонів Ca^{+2} , порівняно з відносними контролями, де клітини культивувались без кристалів ГАПів (рис.3.18; рис.3.19 верхній лівий ряд).

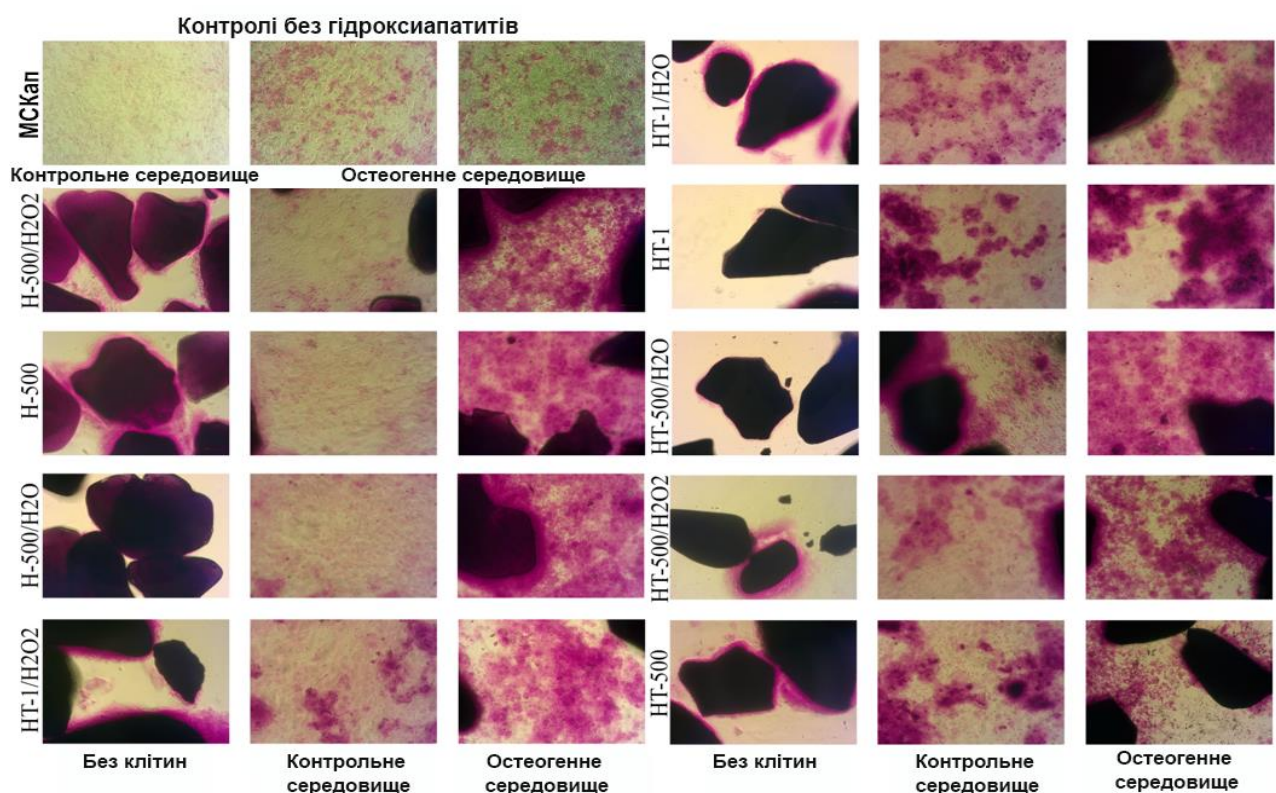


Рис.3.19. Мікрофотографії забарвлення МСКап алізариновим червоним на 17-й день експерименту, що якісно репрезентують депозитування іонів Ca^{+2} у внутрішньому та позаклітинному просторах клітин.

Підвищені рівні концентрації кальцію спостерігали у варіантах, де клітини культивувались зі зразками НТ-1, НТ-1/Н₂О та НТ-1/Н₂О₂ як в остеогенному, так і контрольному середовищах (рис.3.19). Це спостереження вказує на остеогенну диференціацію культури МСКап та дає змогу стверджувати, що клітини диференціювалися в остеогенному напрямку навіть без додаткових остеоіндуктивних стимулів, лише при культивуванні з композитами ГАПів. Тому ми висуваємо гіпотезу, що біоматеріали на основі гідроксиапатиту та β-трикальційфосфатної кераміки серії НТ-1 характеризуються високими остеоіндуктивними властивостями щодо МСКап.

В останній день експерименту (17-й) з індукції остеогенного диференціювання культури МСКап разом з композитами гідроксиапатитів серій Н-500, НТ-1 та НТ-500 за контрольних та остеогенних умов, було припинено культивування стовбурових клітин з метою кількісного визначення рівнів експресованого та секретованого мишачого остеопонтину шляхом проведення імуноферментного аналізу (ELISA).

Концентрація остеопонтину в клітинах, культивованих з композитами ГАПу за остеоіндуктивних умов, є в 1,2 разу вищою відносно контролю диференціювання (без ГАПів), та в середньому є втричі більшою порівняно з концентрацією ОП в клітинах, інкубованих у контрольному середовищі як з кристалами ГАПів, так і без них (рис.3.20). До того ж, середній рівень остеопонтину в кондиційованому середовищі з-під МСКап, що культивувались з ГАПами за остеогенних умов, надзвичайно високий — у 10 разів більший, ніж в контролі диференціювання без ГАПів, та у 1,4 рази вищий від рівнів ОП, що визначили в контрольному середовищі з-під клітин, інкубованих з гідроксиапатитами (рис.3.21).

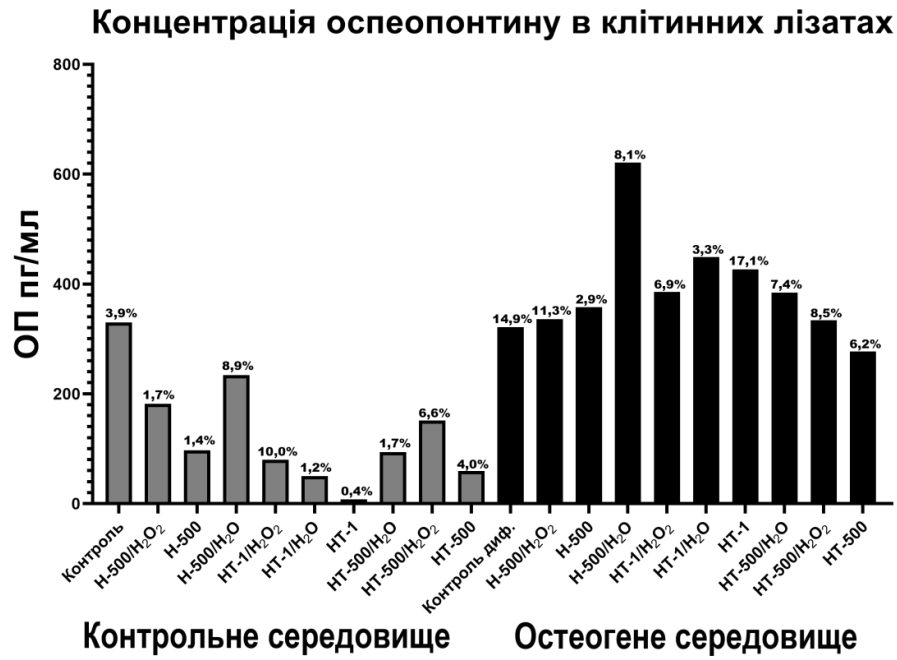


Рис.3.20. Рівні експресованого оспеопонтину МСКап за культивування з ГАПами в остеогенному і контрольному середовищах. Значення виражене у % — розрахований коефіцієнт варіації (CV) для кожної концентрації ОП.

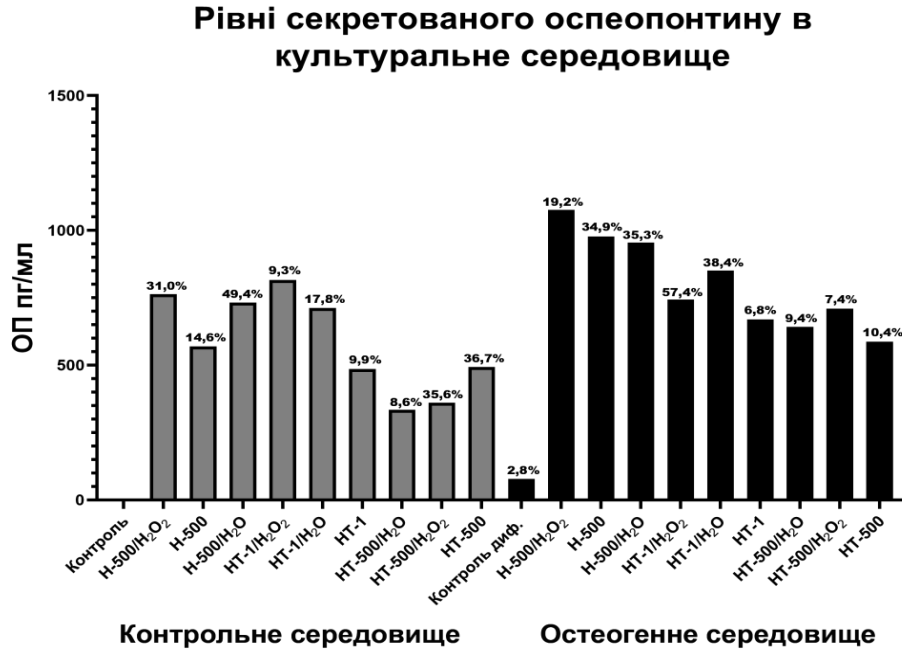


Рис.3.21. Концентрація оспеопонтину, секретованого стовбуровими клітинами миші, за умов культивування з ГАПами в остеогенному і контрольному середовищах. Значення виражене у % — розрахований коефіцієнт варіації (CV) для кожної концентрації ОП.

В результаті дослідження біосумісності та остеогенного потенціалу композитів серій НТ-500, Н-500, НТ-1 та НТІS-500 з різними хімічними модифікаціями структури не було виявлено жодних закономірностей або статистично достовірних ефектів впливу обробки кристалів гідроксиапатитів H_2O_2 або H_2O на їхню біосумісність або ж здатність індукувати та підтримувати остеогенез. Заміщення іонів кальцію сріблом у молекулі гідроксиапатиту викликає цитотоксичний ефект щодо культури мезенхімальних стовбурових клітин миші, тому леговані сріблом ГАПи серії НТІS-500 надалі у випробуваннях не використовували.

Проаналізовані біоматеріали серій НТ-500, Н-500, НТ-1 здатні викликали остеогенне диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин за стандартних умов культивування у контрольному середовищі. При цьому серії чистого гідроксиапатиту — Н-500 та композити гідроксиапатиту з β -трикальційфосфатною керамікою — НТ-1 порівняно з НТ-500 серією, додатково характеризуються високими рівнями активності лужної фосфатази за контрольних умов культивування, сприяють інтенсивнішому депозитуванню позаклітинного Ca^{+2} та вищим рівням секреції і експресії остеопонтину, що робить їх перспективними кандидатами для досліджень на тваринних моделях *in vivo* та потенційних клінічних застосувань.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Набуті дефекти кісток, спричинені захворюваннями чи травмами кісткової тканини, що з віком та за відсутності належного лікування призводять до серйозних уражень опорно-рухового апарату, недієздатності та зниження якості життя пацієнтів – є поширеною клінічною картиною. Зважаючи на геополітичну ситуацію в якій опинилась Україна та її населення внаслідок збройної агресії Росії з 2014 року та початком повномасштабної війни в лютому 2022 року, кількість людей з обмеженими фізичними можливостями внаслідок травм, отриманих під час бойових дій, невпинно збільшується серед військових та працездатної частини соціуму. Тому, існує нагальна потреба пошуку нових, ефективних методів відновлення пошкоджених кісток та функціональності опорно-рухового апарату [3]. Успішна регенерація кісткової тканини залежить від взаємодій між пошкодженою ділянкою та трансплантатом, який має бути належним функціональним заміником кістки пацієнта. Незважаючи на переваги стандартних методів лікування дефектів кісток, включаючи ало- та аутологічну кісткові пластики, ксенотрансплантати та імплантацію біосумісних заміників кісткової тканини, спостерігаються обмеження в доступності синтетичних та донорських біоматеріалів для пересадки, імунологічне відторгнення та ризик передачі захворювання, можливість втрати частини остеоіндуктивних властивостей через обробку, необхідну для протидії антигенним властивостям, а також недостатня механічна міцність трансплантатів [20].

Сучасна біоінженерія кісткової тканини пропонує потенційні стратегії лікування дефектів кісток та зосереджена на розробці біосумісних синтетичних матеріалів для конструювання 3D-матриксів, що імітують структуру й властивості матриксу кістки людини, сприяють формуванню та індують остеогенез новоутвореної тканини [7]. Найбільш поширеним синтетичним матеріалом, що застосовується в пластиці кісткової тканини – є

кальцій-фосфатна кераміка, особливо на основі гідроксиапатиту. З хімічної точки зору гідроксиапатит є демонструє найвищий рівень композиційної та структурної схожості з апатитною фазою кісток та зубів [96]. Крім того, він володіє високими остеоіндуктивними властивостями та сприяє адгезії, міграції, проліферації та остеointegraції клітин в структуру матеріалу [5]. Згідно з великою кількістю опублікованих даних про застосування кристалів гідроксиапатиту, найбільше він викривується в галузі тканинної інженерії, зокрема для регенерації та відновлення дефектів кісток [11]. Проте постійні модифікації структури та форми кристалів гідроксиапатиту, методів його синтезу, призводять до створення нових біокомпозитів, які потребують біологічного тестування. Саме тому, вивчення біосумісності та остеогенного потенціалу композитів ГАПів є актуальним напрямком, якому і була присвячена дана робота.

Перші етапи біотестування будь-яких сполук та матеріалів проводять *in vitro* – у системі культивування з живими клітинами. Дуже часто використовують мезенхімальні стовбурові клітини адипогенного походження [7]. Для того щоб отримати достовірні результати та правильно їх потім інтерпретувати, перед застосуванням в експерименті чи клінічному дослідженні, має бути проведена характеристика виділених клітин на відповідність встановленим критеріям [63]. Отож, на початку нашого дослідження, МСКап були виділені з жирової тканини мишей та культивовані за стандартних умов. На третьому пасажі стовбурові клітини були фенотипічно проаналізовані на експресію поверхневих маркерів допомогою проточної цитометрії та імуногістохімії з подальшою візуалізацією результатів. Таким чином було встановлено, що ізольовані МСКап мають типову морфологію, є високоадгезивними до поверхні культурального пластику та характеризуються високою експресією специфічних мезенхімальних маркерів (CD34, CD45 та CD73) та зниженою або майже відсутньою експресією гемопоетичних маркерів (CD90 і CD105).

Тобто виділені нами МСКап відповідають всім необхідним критеріям та можуть бути використані для подальших досліджень *in vitro*.

До біологічних матеріалів, які можуть використовуватись для інженерії та регенерації кісткової тканини, також висувають ряд вимог, а саме: хімічний склад має бути надзвичайно подібним до природної кісткової тканини, мати відкриту та взаємопов'язану мережу пор, сприяти неоваскуляризації, та остеоінтеграції, забезпечувати постачання поживних речовин та кисню, а наноструктурний рельєф поверхні має стимулювати адгезію, проліферацію та диференціацію клітин. Крім того, біоматеріали мають володіти адекватними біологічною реакцією та механічними властивостями, бути здатними витримувати біомеханічні навантаження для ефективної регенерації тканини [12]. Отримані дані про хімічний склад та структуру експериментальних зразків за основи гідроксиапатиту свідчать, що ГАПи серій НТ-1, НТ-500 та НТІS-500 за складом є композитами гідроксиапатиту та β -трикальційфосфату, а серія Н-500 представляє собою чистий гідроксиапатит. Структура поверхні усіх зразків є голчастою, а системи взаємопов'язаних пор різного розміру пронизують композити. Нанопори присутні на внутрішніх стінках гранул, спеціалісти [10] стверджують, що завдяки ним відбувається та покращується диференціювання клітин в остеогенному напрямку в умовах *in vitro* та *in vivo*, порівняно з частинками, які мають гладку поверхню та непористу структуру. Мезопори сприяють підвищенню резорбції біокераміки, а макропори сприяють васкуляризації та зростанню утвореної кісткової тканини з матрисним біоматеріалом. Також існує інформація [62], що наявність відкритих і закритих мереж пор різного розміру утворює велику питому поверхню (внутрішню та зовнішню), яка сприяє сумісності біоматеріалу з тканинами господаря та забезпечує простір для транспорту поживних речовин й кисню до клітин новоутвореної тканини. Стрижне-подібну або голчасту поверхню гідроксиапатитів деякі автори [15,60] пов'язують з високими біосумісністю та біоактивністю матеріалу, а також з кращою

поглинаючою здатністю, оскільки стрижні мають велику площу поверхні і цим сприяють Ван-дер-Ваальсовим взаємодіям [15,60]. Ця думка підтверджується високими значеннями адсорбційної активності всіх композитів.

Додатково, структуру гідроксиапатиту можна функціоналізувати шляхом введення іонів. Досліджувані зразки композитів серії HTIS-500 леговані сріблом, яке є неорганічним антибактеріальним агентом та широко використовується задля покращення антибактеріальних властивостей біоматеріалів. Bai et al. [97] перевіряли цитотоксичність срібловмісних композитів щодо культури остеобластів, і показали, що зразки, які містять 6,5 мас.% срібла, негативно впливають на біологічну реакцію, проліферацію та апоптоз остеобластів, а також на продукцію білка та остеокальцину. В свою чергу, ми спостерігали високий цитотоксичний ефект щодо культури МСКап при тривалому культивуванні (протягом 5-6 днів) з експериментальними зразками ГАПів у яких вміст іонів срібла дорівнює 1 мас.%. За твердженням Qiuhua et al. [59] антибактеріальна активність гідроксиапатиту легованого сріблом пов'язана зі співвідношенням атомів Ag до Ca : навіть при співвідношенні Ag до Ca^{2+} - 0,005, антибактеріальна активність гідроксиапатиту значно посилюється. В нашому випадку співвідношення Ag до чистого Ca^{2+} (мас.%) було: 0,13 для HTIS-500/ H_2O , 0,14 для HTIS-500/ H_2O_2 та 0,126 для HTIS-500, тому не дивно що вони проявляли яскравовиражений цитотоксичний ефект.

Біоматеріали для інженерії кісткової тканини мають бути нетоксичними, біосумісними, мати високі адгезивні властивості та позитивно впливати на життєздатність клітин, які її населяють [91]. Щоб оцінити токсичність і біосумісність гідроксиапатитів щодо культури МСКап миші, клітини культивували із зразками ГАПів та без них, а потім аналізували за допомогою аналізів на виживаність, клітинну адгезію, метаболічну активність та мікроскопічного аналізу живих клітин.

Усі проаналізовані зразки ГАПів позитивно впливають на виживаність культури клітин, тобто є не токсичними після 24 годин сумісного культивування. Більше того, композити ГАПів сприяють адгезії клітин – вона була вдвічі вищою, порівняно з контрольними клітинами які культивувались без кристалів гідроксиапатитів за стандартних умов на поверхні культурального пластику. Такий результат пояснюється великою площею поверхні композитів, яку забезпечують мережі пор та голчаста структура.

МТТ тест продемонстрував зниження метаболічної активності мітохондрій МСКап у два рази порівняно з контролем після 72 годин культивування з ГАПами. Забарвлення мітохондрій родаміном що є специфічним для мембранного потенціалу мітохондрій, узгоджується із даними МТТ і вказало на зниження потенціалу мембрани у 1,5-2 рази.

Аналіз морфології живих клітин співвідноситься з даними про виживаність стовбурових клітин. Як було зазначено вище, через 5–6 днів експерименту ми спостерігали високий відсоток летальності МСКап у тих варіантах, де клітини культивувались з кристалами ГАПами, лігованими сріблом.

Біоматеріали для реконструювання та регенерації кісткової тканини також повинні забезпечувати остеопровідність та остеоінтеграцію клітин, володіти високими остеоіндуктивними властивостями [69]. Для того, щоб дослідити остеоіндуктивні властивості експериментальних зразків композитів серій Н-500, НТ-1, НТ-500, МСКап культивували у контрольному та специфічному остеогенному середовищах з композитами та без них. Після цього, вплив зразків ГАПів оцінювали за допомогою забарвлення клітин на виявлення активності лужної фосфатази та вмісту позаклітинного кальцію. Крім того, проводили якісний аналіз мітохондріальної маси та мембранного потенціалу мітохондрій та кількісно вимірювали рівні остеопонтину у клітинних лізатах та середовищі.

В результаті дослідження остеогенного потенціалу ГАПів ми виявили високу активність лужної фосфатази у МСКап, які культивували з

композитами в контрольних та остеогенних середовищах. Це свідчить про раннє остеогенне специфікування, так як лужна фосфатаза є специфічним маркером остеогенної диференціації.

Значно збільшену кількість мітохондрій було виявлено в МСКап миші, культивованих з кристалами ГАПів в остеогенних умовах, порівняно з клітинами, що культивувались з композитами в контрольних середовищах. Однак потенціал мітохондріальної мембрани був знижений у МСКап, культивованих з ГАПами за остеогенних умов. Разом ці результати вказують на активну диференціацію клітин.

Спостерігали інтенсивне забарвлення алізариновим червоним стовбурових клітин, що культивувались разом кристалами гідроксиапатитів в остеогенних і контрольних середовищах протягом 17 днів, що свідчить про високу кількість депозитованого позаклітинного кальцію в клітинах. До того ж, ми відзначили, що гідроксиапатити серії НТ-1 сприяють інтенсивнішим відкладенням кальцію і, володіють високими остеоіндуктивними властивостями без додаткових стимулів.

В результаті визначення концентрації остеопонтину в середовищі та клітинних лізатах ми помітили підвищення рівнів секретованого та експресованого ОП за умов культивування МСКап з гідроксиапатитими в остеогенних умовах, порівняно з відносного контролю без ГАПів. Однак, навіть у контрольних умовах ми виявили високі концентрації секретованого остеопонтину у середовище, у варіантах де клітини культивувалися з композитами. Серії Н-500 і Н-1 сприяють вищим рівням експресії та секреції остеопонтину в обох варіантах культивування клітин.

Загалом, в ході виконання експериментальної частини кваліфікаційної магістерської роботи, було проведено біотестування композитних біоматеріалів на основі гідроксиапатиту серій Н-500, НТ-1, НТ-500 та НТІS-500, а також досліджено їхні остеоіндуктивні властивості. Встановлено, що найбільш біосумісними та нетоксичними є ГАПи серій Н-500, НТ-1, НТ-500, а Н-500 та НТ-1 серії характеризуються найкращим остеогенним потенціалом

та здатні викликати диференціювання клітин за стандартних умов культивування без специфічних стимулів. У підсумку вдалося виділити найбільш біосумісні та остеоіндуктивні зразки композитів гідроксиапатиту, які є перспективними біоматеріалами для досліджень на тваринних моделях та в процедурах біоінженерії кісткової тканини в умовах клініки.

ВИСНОВКИ

1. Проаналізовано біосумісність та остеоіндуктивні властивості гідроксиапатитів серій Н-500, НТ-500, НТ-1 та НТІS-500 та встановлено, що композити серій Н-500 та НТ-1 є потенційними матриксними матеріалами для біоконструювання імплантатів нового покоління.
2. Виділено первинні мезенхімальні стовбурові клітини миші адипогенного походження, які є негативними за експресією гемопоетичних маркерів CD34, CD45 й CD73, та характеризуються високою присутністю специфічних мезенхімальних маркерів CD90 і CD105 і типовою морфологією.
3. З'ясовано, що усі досліджені зразки гідроксиапатитів володіють високими адгезивними властивостями поверхні, що важливо для остеоінтеграції мезенхімальних стовбурових клітин у матриксний біоматеріал.
4. Унаслідок проведених досліджень виявлено, що експериментальні композити серій Н-500, НТ-500 та НТ-1 є нетоксичними та біосумісними, оскільки вони позитивно впливають на життєздатність МСКап; при цьому кристали ГАПів типу НТІS-500, що леговані сріблом, проявляють цитотоксичний ефект на культуру МСКап миші за умов тривалого сумісного культивування.
5. Досліджено остеоіндуктивний потенціал всіх нетоксичних зразків гідроксиапатитів із різними хімічними модифікаціями, і не виявлено жодних статистично достовірних закономірностей та ефектів впливу обробки композитів 3%-м перекисом водню та водою на біосумісність, метаболічну активність клітин та здатність стимулювати і підтримувати остеогенез.
6. Виявлено, що біоматеріали типів НТ-500, Н-500 і НТ-1 індують остеогенне диференціювання МСКап миші за контрольних умов культивування, без специфічних стимулів.
7. Визначено, що композити серій Н-500 та НТ-1 сприяють інтенсивнішому депозитуванню позаклітинного Ca^{+2} та вищому рівню секреції остеопонтину порівняно із НТ-500 серією, тож вочевидь, вони є перспективними кандидатами для досліджень *in vivo* і потенційних клінічних застосувань.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. UNOS. Data. <https://unos.org/data/>
2. Liu Y, Thantrakul C, Kan S, Chang-Hasnain C, Ho D. Feasibility of Using High-Contrast Grating as a Point-of-Care Sensor for Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressants. *IEEE Journal of Translational Engineering in Health and Medicine* 2020;8:1-6.
3. Sartika D, Wang C, Wang D, Cherng J, Chang S, Fan G et al. Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells-Incorporated Silk Fibroin as a Potential Bio-Scaffold in Guiding Bone Regeneration. *Polymers*. 2020;12(4):853.
4. Siddiqui H, Pickering K, Mucalo M. A Review on the Use of Hydroxyapatite-Carbonaceous Structure Composites in Bone Replacement Materials for Strengthening Purposes. *Materials*. 2018;11(10):1813
5. Tauer, J.T., Al-Jallad, H., Umebayashi, M. *et al.* Characterization and functional analysis of the adipose tissue-derived stromal vascular fraction of pediatric patients with osteogenesis imperfecta. *Sci Rep* **12**, 2414 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06063-4>
6. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res*. 2014;9(1):18, [10.1186/1749-799X-9-18](https://doi.org/10.1186/1749-799X-9-18)
7. Tecu C, Antoniac I, Goller G, Yavas B, Gheorghe D, Antoniac A et al. The Sintering Behaviour and Mechanical Properties of Hydroxyapatite - Based Composites for Bone Tissue Regeneration. *Materiale Plastice*. 2019;56(3):644-648,
8. Viswanathan S, Shi Y, Galipeau J, Krampera M, Leblanc K, Martin I et al. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell &

Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy*. 2019;21(10):1019-1024

9. Mohamed-Ahmed, S., Fristad, I., Lie, S.A. et al. Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. *Stem Cell Res Ther* 9, 168 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0914-1>

10. Ульянчич Н. ФОРМУВАННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ КАЛЬЦІЙ-ФОСФАТНОЇ КЕРАМІКИ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЇ МЕДИЦИНИ. Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук [Internet]. Available from: http://www.materials.kiev.ua/abstract/68/Aref_Ulianchych.pdf

11. Ghiasi B, Sefidbakht Y, Mozaffari-Jovin S, Gharehcheloo B, Mehrarya M, Khodadadi A et al. Hydroxyapatite as a biomaterial – a gift that keeps on giving. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2020;46(7):1035-1062

12. Tavoni M, Dapporto M, Tampieri A, Sprio S. Bioactive Calcium Phosphate-Based Composites for Bone Regeneration. *Journal of Composites Science*. 2021;5(9):227

13. Iijima K, Otsuka H. Cell Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Bioengineering*. 2020;7(4):119

14. Battafarano G, Rossi M, De Martino V, Marampon F, Borro L, Secinaro A, et al. Strategies for Bone Regeneration: From Graft to Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2021 Jan 23;22(3):1128. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22031128>

15. Singh G., Singh, R.P. & Jolly, S.S. Customized hydroxyapatites for bone-tissue engineering and drug delivery applications: a review. *J Sol-Gel Sci Technol* 94, 505–530 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10971-020-05222-1>

16. Singh A, Gill G, Kaur H, Amhmed M, Jakhu H. Role of osteopontin in bone remodeling and orthodontic tooth movement: a review. *Progress in Orthodontics*. 2018;19(1)
17. Si J, Wang C, Zhang D, Wang B, Hou W, Zhou Y. Osteopontin in Bone Metabolism and Bone Diseases. *Medical Science Monitor*. 2020;26
18. McKee MD, Nanci A. Osteopontin and the bone remodeling sequence: colloidal-gold immunocytochemistry of an interfacial extracellular matrix protein. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;760:177–189. doi: 10.1111/j.1749-6632.1995.tb44629.x.
19. Lund S, Giachelli C, Scatena M. The role of osteopontin in inflammatory processes. *Journal of Cell Communication and Signaling*. 2009;3(3-4):311-322
20. Pereira H.F., Cengiz I.F., Silva F.S., Reis R.L., Oliveira J.M. Scaffolds and coatings for bone regeneration. *J. Mater. Sci. Mater. Med*. 2020;31:27. doi: 10.1007/s10856-020-06364-y
21. Friedenstein A.Y. Induction of bone tissue by transitional epithelium. *Clin. Orthop. Relat. Res*. 1968;59:21–37. doi: 10.1097/00003086-196807000-00003
22. Di Silvio L., Jayakumar P. In: *Cellular Response to Osteoinductive Materials in Orthopaedic Surgery*. Di Silvio L., editor. Woodhead Publishing; Cambridge, UK: 2009
23. Branemark P.I., Hansson B.O., Adell R., Breine U., Lindstrom J., Hallen O., Ohman A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Suppl*. 1977;16:1–132
24. Dorland . *Dorland's Illustrated Medical Dictionary*. 33rd ed. Elsevier; Amsterdam, The Netherlands: 2019. p. 2144.

25. Hudecki A., Kiryczyński G., Łos M.J. *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine*. Academic Press; Cambridge, MA, USA: 2018. Biomaterials, Definition, Overview.
26. Zhang J, Jiang Y, Shang Z, Zhao B, Jiao M, Liu W et al. Biodegradable metals for bone defect repair: A systematic review and meta-analysis based on animal studies. *Bioactive Materials*. 2021;6(11):4027-4052
27. Jahn K., Saito H., Taipaleenmaki H., Gasser A., Hort N., Feyerabend F., Schluter H., Rueger J.M., Lehmann W., Willumeit-Romer R., Hesse E. Intramedullary Mg2Ag nails augment callus formation during fracture healing in mice. *Acta Biomater*. 2016;36:350–360. doi: 10.1016/j.actbio.2016.03.041.
28. Qu X, Yang H, Yu Z, Jia B, Qiao H, Zheng Y et al. Serum zinc levels and multiple health outcomes: Implications for zinc-based biomaterials. *Bioactive Materials*. 2020;5(2):410-422.
29. Macdougall L., Culver H., Lin C.C., Bowman C., Anseth K. Degradable and Resorbable Polymers. *Biomater. Sci*. 2020:167–190. doi: 10.1016/B978-0-12-816137-1.00015-5
30. Asghari F., Samiei M., Adibkia K., Akbarzadeh A., Davaran S. Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: A review. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol*. 2017;45:185–192. doi: 10.3109/21691401.2016.1146731.
31. Li G., Zhao M., Xu F., Yang B., Li X., Meng X., Teng L., Sun F., Li Y. Synthesis and Biological Application of Polylactic Acid. *Molecules*. 2020;25:5023. doi: 10.3390/molecules25215023
32. Wang M., Cheng X., Zhu W., Holmes B., Keidar M., Zhang L.G. Design of biomimetic and bioactive cold plasma-modified nanostructured scaffolds for enhanced osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng. Part A*. 2014;20:1060–1071. doi: 10.1089/ten.tea.2013.0235

33. Dreifke M.B., Ebraheim N.A., Jayasuriya A.C. Investigation of potential injectable polymeric biomaterials for bone regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2013;101:2436–2447. doi: 10.1002/jbm.a.34521
34. Ghassemi T., Shahroodi A., Ebrahimzadeh M.H., Mousavian A., Movaffagh J., Moradi A. Current Concepts in Scaffolding for Bone Tissue Engineering. *Arch. Bone Jt. Surg.* 2018;6:90–99
35. El-Ghannam A. Bone reconstruction: From bioceramics to tissue engineering. *Expert Rev. Med. Devices*. 2005;2:87–101. doi: 10.1586/17434440.2.1.87
36. Gao C., Peng S., Feng P., Shuai C. Bone biomaterials and interactions with stem cells. *Bone Res.* 2017;5:17059. doi: 10.1038/boneres.2017.59
37. Razavi M., Fathi M., Savabi O., Vashae D., Tayebi L. In vivo assessments of bioabsorbable AZ91 magnesium implants coated with nanostructured fluoridated hydroxyapatite by MAO/EPD technique for biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2015;48:21–27. doi: 10.1016/j.msec.2014.11.020
38. Li Y., Yang W., Li X., Zhang X., Wang C., Meng X., Pei Y., Fan X., Lan P., Wang C., et al. Improving osteointegration and osteogenesis of three-dimensional porous Ti6Al4V scaffolds by polydopamine-assisted biomimetic hydroxyapatite coating. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2015;7:5715–5724. doi: 10.1021/acsami.5b00331.
39. Razavi M., Fathi M., Savabi O., Tayebi L., Vashae D. Biodegradable Magnesium Bone Implants Coated with a Novel Bioceramic Nanocomposite. *Materials*. 2020;13:1315. doi: 10.3390/ma13061315
40. Kihlstrom Burenstam Linder L., Birgersson U., Lundgren K., Illies C., Engstrand T. Patient-Specific Titanium-Reinforced Calcium Phosphate Implant

- for the Repair and Healing of Complex Cranial Defects. *World Neurosurg.* 2019;122:e399–e407. doi: 10.1016/j.wneu.2018.10.061
41. Kim J.M., Son J.S., Kang S.S., Kim G., Choi S.H. Bone regeneration of hydroxyapatite/alumina bilayered scaffold with 3 mm passage-like medullary canal in canine tibia model. *Biomed. Res. Int.* 2015;2015:235108. doi: 10.1155/2015/235108
42. Georgopoulou A., Papadogiannis F., Batsali A., Marakis J., Alpantaki K., Eliopoulos A.G., Pontikoglou C., Chatzinikolaidou M. Chitosan/gelatin scaffolds support bone regeneration. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2018;29:59. doi: 10.1007/s10856-018-6064-2
43. Shuai C.J., Li P.J., Liu J.L., Peng S.P. Optimization of TCP/HAP ratio for better properties of calcium phosphate scaffold via selective laser sintering. *Mater. Charact.* 2013;77:23–31. doi: 10.1016/j.matchar.2012.12.009
44. Lim S.S., Chai C.Y., Loh H.S. In vitro evaluation of osteoblast adhesion, proliferation and differentiation on chitosan-TiO₂ nanotubes scaffolds with Ca(2+) ions. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2017;76:144–152. doi: 10.1016/j.msec.2017.03.075
45. Huang B., Vyas C., Byun J.J., El-Newehy M., Huang Z., Bartolo P. Aligned multi-walled carbon nanotubes with nanohydroxyapatite in a 3D printed polycaprolactone scaffold stimulates osteogenic differentiation. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2020;108:110374. doi: 10.1016/j.msec.2019.110374
46. Nguyen D.T., McCanless J.D., Mecwan M.M., Noblett A.P., Haggard W.O., Smith R.A., Bumgardner J.D. Balancing mechanical strength with bioactivity in chitosan-calcium phosphate 3D microsphere scaffolds for bone tissue engineering: Air- vs. freeze-drying processes. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2013;24:1071–1083. doi: 10.1080/09205063.2012.735099

47. Dhivya S., Keshav Narayan A., Logith Kumar R., Viji Chandran S., Vairamani M., Selvamurugan N. Proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells on scaffolds containing chitosan, calcium polyphosphate and pigeonite for bone tissue engineering. *Cell Prolif.* 2018;51 doi: 10.1111/cpr.12408
48. Corcione C.E., Gervaso F., Scalera F., Padmanabhan S.K., Madaghiele M., Montagna F., Sannino A., Licciulli A., Maffezzoli A. Highly loaded hydroxyapatite microsphere/PLA porous scaffolds obtained by fused deposition modelling. *Ceram. Int.* 2019;45:2803–2810. doi: 10.1016/j.ceramint.2018.07.297
49. Zhang H., Mao X., Du Z., Jiang W., Han X., Zhao D., Han D., Li Q. Three dimensional printed macroporous polylactic acid/hydroxyapatite composite scaffolds for promoting bone formation in a critical-size rat calvarial defect model. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 2016;17:136–148. doi: 10.1080/14686996.2016.1145532
50. El-Fiqi A., Kim J.H., Kim H.W. Novel bone-mimetic nanohydroxyapatite/collagen porous scaffolds biomimetically mineralized from surface silanized mesoporous nanobioglass/collagen hybrid scaffold: Physicochemical, mechanical and in vivo evaluations. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2020;110:110660. doi: 10.1016/j.msec.2020.110660
51. Baheiraei N., Nourani M.R., Mortazavi S.M.J., Movahedin M., Eyni H., Bagheri F., Norahan M.H. Development of a bioactive porous collagen/beta-tricalcium phosphate bone graft assisting rapid vascularization for bone tissue engineering applications. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2018;106:73–85. doi: 10.1002/jbm.a.36207.
52. Eslaminejad M.B., Mirzadeh H., Mohamadi Y., Nickmahzar A. Bone differentiation of marrow-derived mesenchymal stem cells using beta-tricalcium

phosphate-alginate-gelatin hybrid scaffolds. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2007;1:417–424. doi: 10.1002/term.49.

53. Sancilio S., Gallorini M., Di Nisio C., Marsich E., Di Pietro R., Schweikl H., Cataldi A. Alginate/Hydroxyapatite-Based Nanocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering Improve Dental Pulp Biomineralization and Differentiation. *Stem Cells Int.* 2018;2018:9643721. doi: 10.1155/2018/9643721

54. Schaller B., Fujioka-Kobayashi M., Zihlmann C., Schuler V.C., Katagiri H., Lang N.P., Saulacic N. Effects of additional collagen in biphasic calcium phosphates: A study in a rabbit calvaria. *Clin. Oral Investig.* 2020;24:3093–3103. doi: 10.1007/s00784-019-03181-8

55. Salamanca E., Hsu C.C., Yao W.L., Choy C.S., Pan Y.H., Teng N.C., Chang W.J. Porcine Collagen-Bone Composite Induced Osteoblast Differentiation and Bone Regeneration In Vitro and In Vivo. *Polymers.* 2020;12:93. doi: 10.3390/polym12010093

56. Chang H.H., Yeh C.L., Wang Y.L., Fu K.K., Tsai S.J., Yang J.H., Lin C.P. Neutralized Dicalcium Phosphate and Hydroxyapatite Biphasic Bioceramics Promote Bone Regeneration in Critical Peri-Implant Bone Defects. *Materials.* 2020;13:823. doi: 10.3390/ma13040823

57. Yu L, Rowe D, Perera I, Zhang J, Suib S, Xin X et al. Intrafibrillar Mineralized Collagen–Hydroxyapatite-Based Scaffolds for Bone Regeneration. *ACS Applied Materials & Interfaces.* 2020;12(16):18235-18249

58. Sathiyavimal S, Vasantharaj S, LewisOscar F, Selvaraj R, Brindhadevi K, Pugazhendhi A. Natural organic and inorganic–hydroxyapatite biopolymer composite for biomedical applications. *Progress in Organic Coatings.* 2020;147:105858

59. Qiuhua, Y.; Anping, X.; Ziqiang, Z.; Zehui, C.; Lei, W.; Xin, S.; Songxin, L.; Zhiyang, Y.; Libo, D. Bioactive silver doped hydroxyapatite composite

- coatings on metal substrates: Synthesis and characterization. *Mater. Chem. Phys.* **2018**, *218*, 130–139
60. Shi H, Zhou Z, Li W, Fan Y, Li Z, Wei J. Hydroxyapatite Based Materials for Bone Tissue Engineering: A Brief and Comprehensive Introduction. *Crystals*. 2021;11(2):149
61. Wang J, Shaw LL (2009) Nanocrystalline hydroxyapatite with simultaneous enhancements in hardness and toughness. *Biomaterials* 30:6565–6572
62. Zhao P, Liu M-C, Lin H-C, Sun X-Y, Li Y-Y, Yan S-Q (2017) Synthesis and drug delivery applications for mesoporous silica nanoparticles. *J Med Biotechnol* 1:1–5
63. Fitzsimmons R, Mazurek M, Soos A, Simmons C. Mesenchymal Stromal/Stem Cells in Regenerative Medicine and Tissue Engineering. *Stem Cells International*. 2018;2018:1-16
64. Knight M.N., Hankenson K.D. Mesenchymal Stem Cells in Bone Regeneration. *Adv. Wound Care (New Rochelle)* 2013;2:306–316. doi: 10.1089/wound.2012.0420
65. Marolt Presen D., Traweger A., Gimona M., Redl H. Mesenchymal Stromal Cell-Based Bone Regeneration Therapies: From Cell Transplantation and Tissue Engineering to Therapeutic Secretomes and Extracellular Vesicles. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019;7:352. doi: 10.3389/fbioe.2019.00352.
66. Mohammadalipour A, Dumbali S, Wenzel P. Mitochondrial Transfer and Regulators of Mesenchymal Stromal Cell Function and Therapeutic Efficacy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020;8
67. Kon E., Filardo G., Roffi A., Di Martino A., Hamdan M., De Pasqual L., Merli M.L., Marcacci M. Bone regeneration with mesenchymal stem cells. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* 2012;9:24–27.

68. Shim G., Lee S., Han J., Kim G., Jin H., Miao W., Yi T.G., Cho Y.K., Song S.U., Oh Y.K. Pharmacokinetics and in vivo fate of intra-articularly transplanted human bone marrow-derived clonal mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2015;24:1124–1132. doi: 10.1089/scd.2014.0240
69. Gomez-Barrena E., Rosset P., Gebhard F., Hernigou P., Baldini N., Rouard H., Sensebe L., Gonzalo-Daganzo R.M., Giordano R., Padilla-Eguiluz N., et al. Feasibility and safety of treating non-unions in tibia, femur and humerus with autologous, expanded, bone marrow-derived mesenchymal stromal cells associated with biphasic calcium phosphate biomaterials in a multicentric, non-comparative trial. *Biomaterials.* 2019;196:100–108. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.03.033
70. Cidonio G., Glinka M., Kim Y.H., Kanczler J.M., Lanham S.A., Ahlfeld T., Lode A., Dawson J.I., Gelinsky M., Oreffo R.O.C. Nanoclay-based 3D printed scaffolds promote vascular ingrowth ex vivo and generate bone mineral tissue in vitro and in vivo. *Biofabrication.* 2020;12:035010. doi: 10.1088/1758-5090/ab8753
71. Qiao Z., Lian M., Han Y., Sun B., Zhang X., Jiang W., Li H., Hao Y., Dai K. Bioinspired stratified electrowritten fiber-reinforced hydrogel constructs with layer-specific induction capacity for functional osteochondral regeneration. *Biomaterials.* 2020;266:120385. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.120385
72. Sladkova M., Alawadhi R., Jaragh Alhaddad R., Esmael A., Alansari S., Saad M., Mulla Yousef J., Alqaoud L., De Peppo G.M. Segmental Additive Tissue Engineering. *Sci. Rep.* 2018;8:10895. doi: 10.1038/s41598-018-29270-4.
73. Alhag M., Farrell E., Toner M., Lee T.C., O'Brien F.J., Claffey N. Evaluation of the ability of collagen-glycosaminoglycan scaffolds with or

- without mesenchymal stem cells to heal bone defects in Wistar rats. *Oral Maxillofac. Surg.* 2012;16:47–55. doi: 10.1007/s10006-011-0299-0,
74. De Kok I.J., Jere D., Padilla R.J., Cooper L.F. Evaluation of a collagen scaffold for cell-based bone repair. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* 2014;29:e122–e129. doi: 10.11607/jomi.te51
75. Available: <https://www.jax.org/strain/000651>
76. Davies OG, Cooper PR, Shelton RM, Smith AJ, Scheven BA. Isolation of adipose and bone marrow mesenchymal stem cells using CD29 and CD90 modifies their capacity for osteogenic and adipogenic differentiation. *J Tissue Eng.*
77. <https://medicine.yale.edu/immuno/flowcore/protocols/analysis/#:~:text=Add%200.1%2D10%20%CE%BCg%2Fml,%C2%B0C%20in%20the%20dark.>
78. *Cell and Organ Transplantation.* 2020;8(2):159-165. doi: 10.22494/cot.v8i2.111
79. Balatskyi V, Vaskivskyi V, Myronova A, Avramets D, Nahia K, Macewicz L et al. Cardiac-specific β -catenin deletion dysregulates energetic metabolism and mitochondrial function in perinatal cardiomyocytes. *Mitochondrion.* 2021;60:59-69
80. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/product/sigma/duo82040>
81. Johnson S, Nguyen V, Coder D. Assessment of Cell Viability. *Current Protocols in Cytometry.* 2013;64(1)
82. Rodil, S.E.; Olivares, R.; Arzate, H.; Muhl, S. Properties of carbon films and their biocompatibility using in vitro tests. *Diamond Relat. Mater.* 2003, 12, 931-937
83. ISO 10993-5:2009(E) MTT cytotoxicity test C.1 General [Internet]. Available from: <https://nhiso.com/wp-content/uploads/2018/05/ISO-10993-5-2009.pdf>

84. Chazotte, B. (2011). Labeling Mitochondria with Rhodamine 123. Cold Spring Harbor Protocols, 2011(7), pdb.prot5640–pdb.prot5640. doi:10.1101/pdb.prot5640
85. Bankhead, Peter. (2014). Analyzing fluorescence microscopy images with ImageJ
86. Kurzyk A, Dębski T, Świążkowski W, Pojda Z. Comparison of adipose stem cells sources from various locations of rat body for their application for seeding on polymer scaffolds. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. 2019;30(5):376-397
87. van Zoelen, E.J., Duarte, I., Hendriks, J.M. *et al.* TGFβ-induced switch from adipogenic to osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: identification of drug targets for prevention of fat cell differentiation. *Stem Cell Res Ther* 7, 123 (2016). <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0375-3>
88. Available:<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp07510.pdf>.
89. On the history and mechanism of Alizarin and Alizarin Red S stains for calcium⁺² Holde Puchtler, Susan N. Meloan And Mary S. Terry. Department of Pathology, Medical College of Georgia, Eugene Talmadge Memorial Hospital, Augusta, Georgia.
90. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/product/sigma/rab0437>
91. Sirait M, Sinulingga K, Siregar N, Doloksaribu M, Amelia. Characterization of hydroxyapatite by cytotoxicity test and bending test. Journal of Physics: Conference Series. 2022;2193(1):012039.
92. Khalili A, Ahmad M. A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. International Journal of Molecular Sciences. 2015;16(8):18149-18184
93. ISO 10993-5:2009(E) MTT cytotoxicity test C.1 General <https://nhiso.com/wp-content/uploads/2018/05/ISO-10993-5-2009.pdf>.

94. AP Staining Kit Cat. # AP100B-1, AP100D-1, AP100R-1, [Internet]. Available: http://www.systembio.com/wp/wp-content/uploads/Manual_APkit-1.pdf.
95. Westhauser F, Karadjian M, Essers C, Senger A, Hagmann S, Schmidmaier G et al. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is enhanced in a 45S5-supplemented β -TCP composite scaffold: an in-vitro comparison of Vitoss and Vitoss BA. PLOS ONE. 2019;14(2):e0212799
96. Uskoković V, Uskoković DP. Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: Chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials 2011;96B(1):152-191.
97. Bai, X.; Sandukas, S.; Appleford, M.; Ong, J.L.; Rabiei, A. Antibacterial effect and cytotoxicity of Ag-doped functionally graded hydroxyapatite coatings. *J. Biomed. Mater. Res. Part B* **2012**, *100*, 553–561

ДОДАТКИ

Додаток А

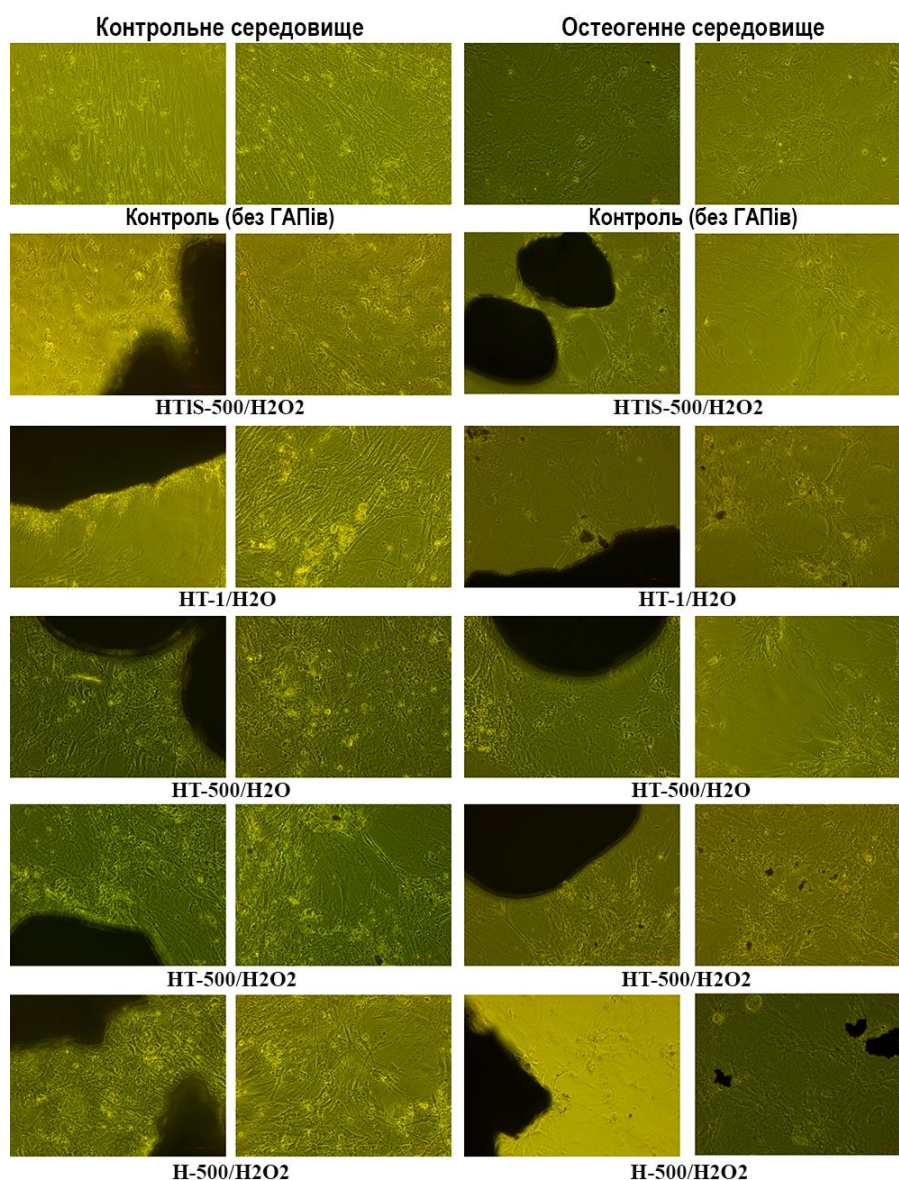


Рис.1. Мікрофотографії живих мезенхімальних стовбурових клітин адипогенного походження, культивованих в остеогенних та контрольних умовах на композитах гідроксиапатитів протягом 17 днів. Масштаб – 100 мкм.