

УДК 576.57.085.23:616.71:539.25

ПОЛУЧЕНИЕ ПЕРВИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ОСТЕОБЛАСТОВ КРЫС И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В КАЧЕСТВЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ПРОВЕРКИ IN VITRO БИОСОВМЕСТИМОСТИ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ ИМПЛАНТАТОВ НА ОСНОВЕ ТИТАНА

© 2017 г. Ю. Я. Хрунык^{1,3,*}, И. В. Вялых², А. В. Корелин¹,
С. В. Беликов¹, М. С. Карабаналов¹, С. Б. Ракитин³,
Р. В. Камалов¹, А. А. Попов¹

Представлено академиком РАН О.Н. Чупахиным 19.01.2017 г.

Поступило 06.02.2017 г.

Для изучения вопросов биосовместимости и остеоинтеграции имплантатов на основе титана были адаптированы методы получения культур клеток остеобластов из костей свода черепа взрослых крыс Wistar и их 12-дневных эмбрионов. Исследовали морфологию остеобластов и их дифференцировку в остеоциты на матрице из титана, поверхность которой была подвергнута специальной обработке. Подтвердили эффективность использования двух полученных диплоидных культур клеток крыс в качестве моделей при доклинических испытаниях на биосовместимость и остеоинтеграцию наноструктурированных титановых имплантатов в условиях *in vitro*.

DOI: 10.7868/S0869565217200245

На сегодняшний день титан является наиболее предпочтительным биосовместимым металлом для изготовления ортопедических имплантатов. Это объясняется его высокой устойчивостью к коррозии, механическими характеристиками и способностью к остеоинтеграции. В последнее десятилетие особое внимание уделяется изучению различных модификаций структуры поверхностей титановых конструкций, приводящих к повышению биосовместимости имплантатов с живыми тканями [1]. Новейшим направлением в данной области исследований является изучение влияния наноструктурирования поверхности титана на его способность к остеоинтеграции. Периодические и непериодические системы наночастиц на поверхности титана являются новыми, искусственно созданными материалами, обладающими уникальными свойствами и требующими детального изучения.

В последнее время исследования титана и его сплавов *in vitro* широко проводились во всем мире

с использованием различных культур клеток, в том числе мезенхимальных стволовых клеток костей крыс [2], остеобластов крыс аутбредного стока Sprague Dawley [3], остеобластов человека [4], стволовых клеток нервного гребня человека [5], клеточной линии эндотелия аорты телёнка GM 7373, остеобластов мышей, меченных зелёным флуоресцентным белком [6], эмбриональных фибробластов мышей [7] и многих других.

Поскольку имплантаты предназначены для использования в местах повреждений костей, культуры остеобластоподобных клеток являются идеальной моделью для изучения их биосовместимости и остеоинтеграции *in vitro*. Остеобласты являются клетками, ответственными за образование кости: они сконцентрированы в зонах её роста или ремоделирования, где участвуют в синтезе практически всех составляющих матрицы костной ткани, а также в её последующей минерализации [8]. В результате образования матрицы остеобласты оказываются “замурованными” в ней, прекращают её синтез и дифференцируются в остеоциты [9]. Остеоциты являются основными клетками костной ткани. Отдельные остеоциты находятся в изолированном положении в костной матрице, тем не менее они сохраняют контакт с другими остеоцитами и с клетками на поверхности кости через длинные клеточные отростки, которые

¹Уральский федеральный университет им. Б.Н. Ельцина, Екатеринбург

²Уральский научно-исследовательский ветеринарный институт, Екатеринбург

³Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской Академии наук, Екатеринбург

*E-mail: juliakhrunyk@yahoo.co.uk

заклучены в микроскопические каналы. Межклеточное взаимодействие обеспечивается через щелевые контакты в области встречи клеточных отростков двух остеоцитов в общем канальце [10]. Помимо применения в качестве модели для изучения биосовместимости и остеointegrации имплантатов культуры клеток остеобластов можно использовать в широком спектре прикладных исследований, включая изучение механизмов формирования костей, изучение новых лечебных препаратов, влияющих на формирование костной ткани, а также для исследования костной патологии.

Целью нашей работы являлось получение и характеристика клеточных линий остеобластов взрослых крыс и их эмбрионов, а также проверка пригодности полученных культур клеток для изучения биосовместимости имплантатов на основе титана.

Для получения первичных клеточных культур использовали модифицированный метод, основанный на нескольких протоколах получения остеобластов [4, 8]. Для получения культуры клеток RAD-C-01 (*Rattus norvegicus* adult calvaria) и REM-C-02 (*Rattus norvegicus* embryo calvaria) измельчали кости свода черепа 4-месячной крысы-самки популяции Wistar и зачатки костей свода черепа её 12-дневных эмбрионов. Полученные после ферментативной обработки костные эксплантаты для RAD-C-01 и зачатки черепных костей эмбрионов для REM-C-02 выращивали в культуральных флаконах во влажной атмосфере с содержанием 5% CO₂. В качестве ростовой среды использовали среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM/F-12 HAM, "Sigma-Aldrich", США).

Тестирование клеточных культур на минерализацию проводили на немодифицированной поверхности дисков из титана BT1-0 и культурального пластика, который служил в качестве положительного контроля. Использовали стандартную ростовую и остеогенную (α -MEM, содержащую 10% фетальной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, 50 мкг/мл L-аскорбиновой кислоты, 4 мМ β -глицерофосфата, 0,1 мМ заменимых аминокислот, 1000 нМ дексаметазона, 6,25 мкг/мл инсулина) среды. Клетки культивировали в течение 28 сут, окрашивали 2%-м ализариновым красным S ("Sigma-Aldrich") и микроскопировали с помощью инвертированного микроскопа Axio Observer A1 ("Carl Zeiss", Германия).

На следующем этапе исследования на титановые диски (D = 10 мм), покрытые в результате анодного окисления аморфной пленкой TiO₂,

имеющей поры размером от 20 до 120 нм, наносили остеобласты в фазе экспоненциального роста. Для фиксации клеток вместо стандартного метода с применением высокотоксичного тетраоксида осмия использовали альтернативные способы. В 6-луночный культуральный планшет, в каждой лунке которого находились титановые диски с культурой клеток остеобластов, добавляли разные варианты фиксаторов (в двух повторностях каждый) на основе: формалина, охлажденной жидкости Карнуа, глутарового альдегида. Далее клетки инкубировали в фиксаторе в течение 30 мин. Затем образцы промывали несколько раз дистиллированной водой, обезживали методом проводки в возрастающих концентрациях этанола (50, 70 и 96%) в течение 5 мин при каждой концентрации и высушивали на воздухе. Полученные таким образом образцы исследовали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на микроскопе Auriga CrossBeam ("Carl Zeiss") в режиме вторичных и обратно рассеянных электронов при ускоряющем напряжении 0,5–1 кВ.

Получение культуры клеток RAD-C-01. Эксплантаты костей свода черепа взрослых крыс культивировали 12 сут, в течение которых клетки мигрировали из кости и прикреплялись к поверхности пластикового флакона. Клетки в культуре RAD-C-01 формировали монослой в течение 2 нед., после чего костные эксплантаты удаляли, клетки трипсинизировали и пересевали. Полученная популяция в основном состояла из клеток многоугольной формы с выраженным шероховатым эндоплазматическим ретикуломом, что характерно для остеобластов.

Получение культуры клеток REM-C-02. Первичную культуру клеток, полученную из обработанных ферментами зачатков костей черепа эмбрионов крыс (рис. 1а), также обрабатывали трипсином и пересевали. Оценку морфологии клеток проводили после второго пассажа (рис. 1б). Для культуры клеток REM-C-02 характерным признаком было наличие большого количества остеобластоподобных клеток с последующим появлением многочисленных очагов минерализации, однако REM-C-02 была морфологически неоднородна: в ней также присутствовали многоядерные клетки, по всей видимости, остеокласты (рис. 1б). Для получения чистых колоний из отдельных клеток мы в 96-луночных культуральных планшетах провели клонирование методом предельных разведений.

На рис. 2 представлены микрофотографии клеток из смешанной популяции REM-C-02 через 10 дней после начала клонирования. В одних лунках отмечали колонии клеток, состоящие

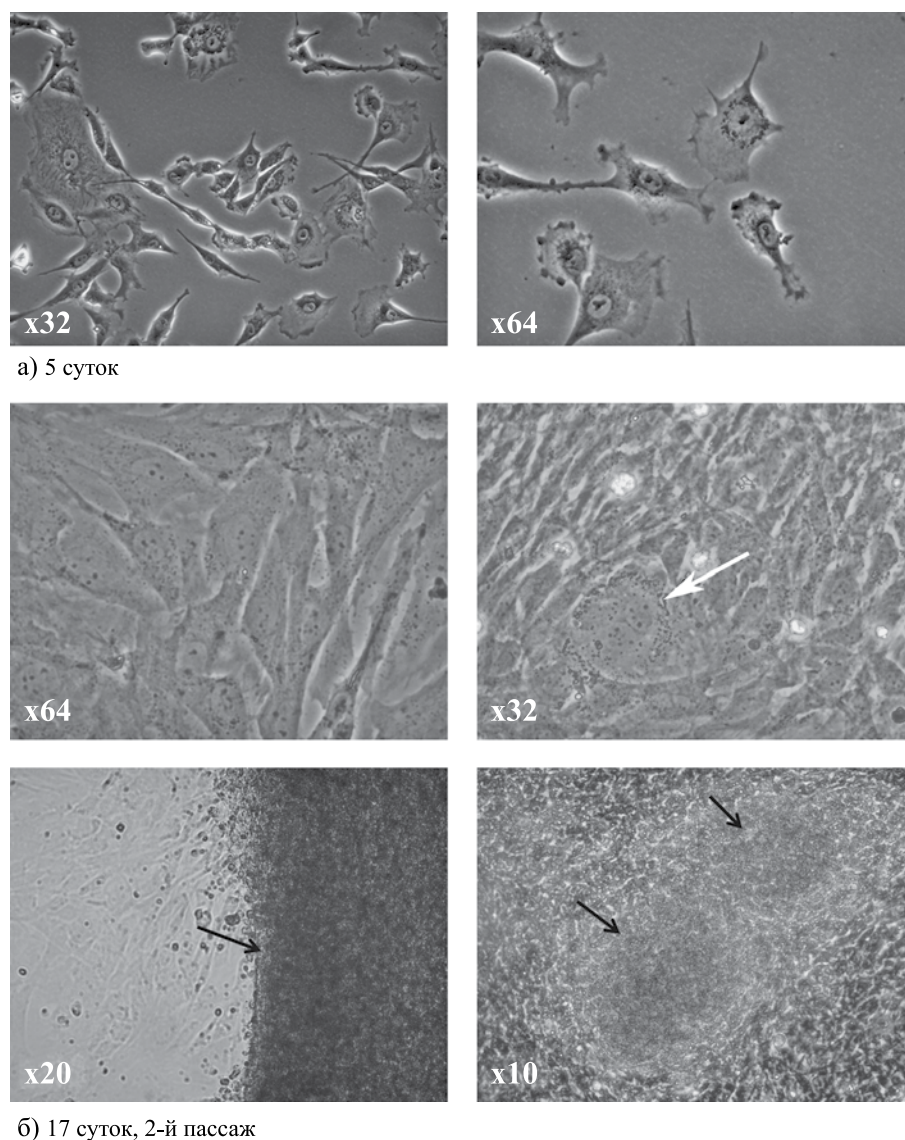


Рис. 1. Фазово-контрастная микроскопия REM-C-02 культуры клеток зачатков костей черепа эмбрионов крыс Wistar при разной длительности культивирования. (а) – появление первичной культуры клеток. (б) – культура клеток становится гетерогенной, наряду с типичными остеобластоподобными клетками ($\times 64$), встречаются крупные многоядерные клетки ($\times 32$, стрелка белого цвета), морфологически схожие с остеокластами, а также наблюдается формирование очагов минерализации ($\times 20$, $\times 10$, стрелки чёрного цвета).

исключительно из остеоцитоподобных клеток звёздчатой формы с небольшим клеточным телом и длинными отростками. В других лунках наблюдали наличие остеобластов (клетки многоугольной формы с хорошо развитым шероховатым эндоплазматическим ретикулумом) и остеоцитов. В остальных лунках – остеобласты, остеоциты и остеобласты в процессе их дифференцировки. После нескольких последующих субклонирований мы получили стабильную клеточную линию REM-C-02, состоящую только из остеобластоподобных клеток.

С целью подтверждения остеогенной дифференцировки клеток в культурах RAD-C-01

и REM-C-02 проводили окрашивание ализариновым красным S через 28 сут после начала культивирования. При культивировании обеих культур клеток в стандартной среде на пластике и на титановых дисках тест на минерализацию был отрицательным. Тем не менее при культивировании в остеогенной среде тест с ализариновым красным S оказался положительным для клеток RAD-C-01 и REM-C-02 как на пластике, так и на поверхности титана.

При кариотипировании обе клеточные линии (RAD-C-01 и C-REM-02) в 80% метафазных пластинок показали нормальный диплоидный набор хромосом *Rattus norvegicus* ($2n = 42$; NF = 64).

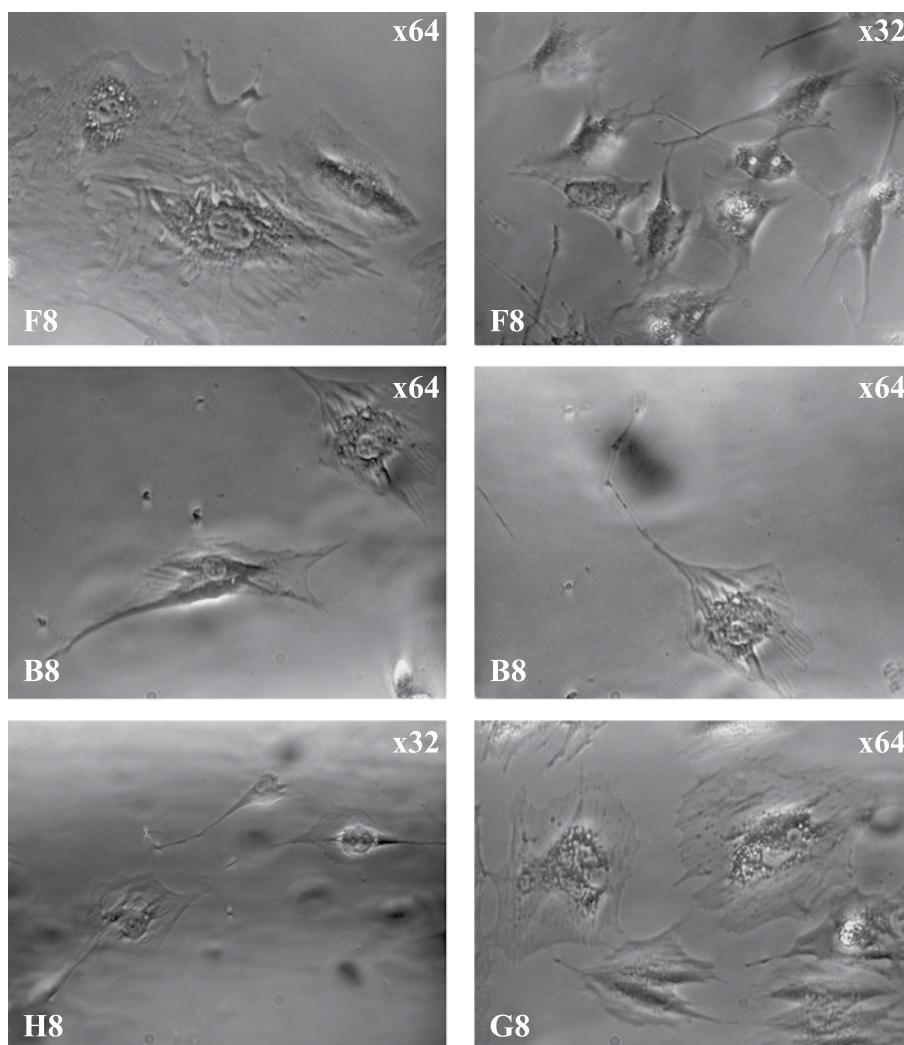


Рис. 2. Культура клеток REM-C-02 костей черепа эмбрионов крыс, полученная с помощью предельных разведений в 96-луночных планшетах (названия лунок указаны в левом нижнем углу каждой микрофотографии), 10 сут после посева. F8 и G8 – смешанные популяции клеток, представленные остеобластами (клетки многоугольной формы с хорошо развитым шероховатым эндоплазматическим ретикуломом), остеоцитами (клетки звёздчатой формы с небольшим телом клетки и длинными отростками) и/или остеобластами при их дифференцировке в остеоциты. B8 и H8 – клоны, состоящие исключительно из остеоцитов.

Методом СЭМ исследовали культуры клеток остеобластов после их инкубации на титановых дисках в течение разных периодов времени (рис. 3). На основании результатов сравнительного анализа, который включал три разных метода фиксации клеток перед СЭМ с использованием формалина или жидкости Карнуа, или глутарового альдегида мы обнаружили, что наиболее приемлемыми оказались методы на основе глутарового альдегида и жидкости Карнуа, в то время как использование фиксатора на основе формалина вызвало серьёзное изменение формы клеток.

Проведённое электронно-микроскопическое исследование двух клеточных культур RAD-C-01 и REM-C-02 через 2 и 48 ч после начала их инкубации с титановыми дисками

(рис. 3) показало, что после инкубации в течение 2 ч наблюдались в основном клетки округлой формы, что объясняется начальной стадией их адгезии. Однако клетки, культивируемые на поверхности титановых дисков в течение двух суток, были в основном веретенообразной и разветвленной формы, что является признаком успешной их адгезии и пролиферации. Следовательно, при проведении СЭМ культуры клеток остеобластов на поверхности титановых дисков мы наблюдали клеточную адгезию и изменения морфологии клеток, что указывает на пригодность полученных диплоидных культур клеток остеобластов крыс Wistar для исследования *in vitro* биосовместимости и остеоинтеграции разных имплантатов на основе титана и его сплавов.

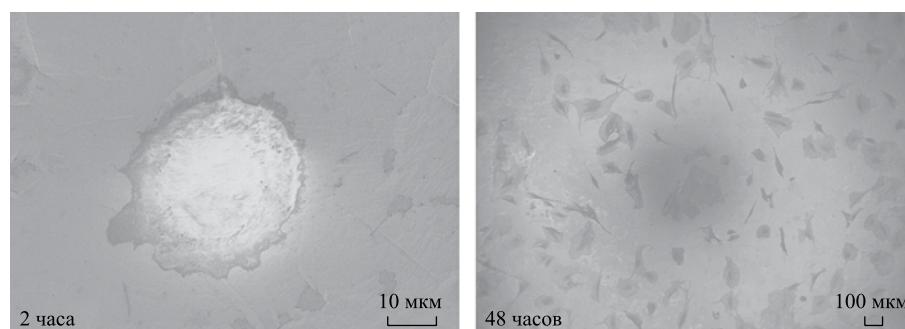


Рис 3. СЭМ-изображения клеток RAD-C-01, фиксируемых в разное время после начала культивирования на титановых дисках.

Таким образом, в наших исследованиях мы подтвердили эффективность использования двух диплоидных культур клеток остеобластов крыс RAD-C-01 и REM-C-02. Мы адаптировали методы получения культур клеток остеобластов из костей свода черепа взрослых крыс и 12-дневных эмбрионов и провели первоначальные исследования по биосовместимости. Представленные данные являются многообещающими для дальнейшего изучения титановых имплантатов нового поколения с использованием культур клеток RAD-C-01 и REM-C-02 в качестве моделей при доклинических исследованиях по биосовместимости и остеоинтеграции.

Электронно-микроскопические исследования были проведены в лаборатории структурных методов анализа и свойств материалов и наноматериалов ЦКП УрФУ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, субсидия на реализацию комплексных проектов по созданию высокотехнологичного производства в рамках реализации постановления Правительства Российской Федерации от 9 апреля 2010 года № 218, очередь 8 по теме “Создание высокотехнологичного цифрового производства прецизионных металлических комплексов для имплантации на базе аддитивных технологий”, номер соглашения 02.G25.31.0234.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications / D.M. Brunette, P. Tengvall, M. Textor, P. Thomsen. Eds. B.; Heidelberg; N.Y.; Barcelona; Hongkong; L.; Mailand; P.; Singapore; Tokio: Springer, 2001. 1019 p.
2. Jin G., Qin H., Cao H., Qiao Y., Zhao Y., Peng X., Zhang X., Liu X., Chu P.K. // *Biomaterials*. 2015. V. 65. P. 22–31.
3. Olivares-Navarrete R., Hyzy S.L., Boyan B.D., Schwartz Z. // *BioMed Res. Intern*. 2015. V. 2015. P. 1–9.
4. Brie I.-C., Soritau O., Dirzu N., Berce C., Vulpoi A., Popa C., Todea M., Simon S., Perde-Schrepler M., Virrag P., Barbos O., Chereches G., Berce P., Cernea V. // *J. Biol. Eng*. 2014. V. 8. № 14. P. 1–19.
5. Schuermann M., Wolff A., Widera D., Hauser S., Heilmann P., Huetten A., Kaltschmidt C., Kaltschmidt B. // *Stem Cell Research*. 2014. V.13. № 1. P. 98–110.
6. Matena J., Petersen S., Gieseke M., Kampmann A., Teske M., Beyerbach M., Escobar H.M., Haferkamp H., Gellrich N.-C., Nolte I. // *Intern. J. Mol. Sci*. 2015. V. 16. № 4. P. 7478–7492.
7. Oates C.J., Wen W., Hamilton D.W. // *Materials*. 2011. V. 4. № 5. P. 893–907.
8. Dillon J.P., Waring-Green V.J., Taylor A.M., Wilson P.J.M., Birch M., Gartland A., Gallagher J.A. *Methods in Molecular Biology: Bone Research Protocols*. Edinburgh: Human Press, 2012. V. 816. P. 3–18.
9. Rodan G.A., Rodan S.B. // *Bone and Mineral Res*. 1983. V. 2. P. 244–285.
10. Doty S.B. // *Calcified Tissue Intern. J*. 1981. V. 33. № 1. P. 509–512.