

## Характеристика и ангиогенный потенциал ксеногенных костных трансплантационных материалов: роль клеток периодонтальной связки

Charlotte ROMBOUITS<sup>1\*</sup>, Charlotte JEANNEAU<sup>1\*</sup>, Josette CAMILLERI<sup>2</sup>, Patrick LAURENT<sup>1,3</sup> и Imad ABOUT<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Университет Экс-Марсель, Национальный центр по научным исследованиям (CNRS), Институт наук о движении (ISM), Марсель, Франция

<sup>2</sup> Кафедра восстановительной стоматологии, факультет хирургической стоматологии, Мальтийский университет, Мальта

<sup>3</sup> Государственная помощь — больницы Марселя (AP-ММ), больница Ля Тимон, отделение стоматологии, Марсель, Франция Автор, ответственный за корреспонденцию: Imad ABOUT; e-mail: imad.about@univ-amu.fr

Адекватная ревазуляризация — обязательное условие успешного заживления дефектов костной ткани пародонта. В этом исследовании были охарактеризованы три различных ксеногенных материала для регенерации костной ткани: Gen-Os лошадиного и свиного происхождения и неорганическая матрица Bio-Oss. Также оценивали их ангиогенный потенциал. Все материалы представляли собой оксипатит с невысокой степенью кристаллизации, при этом Bio-Oss имел больший размер частиц и дополнительно претерпевал карбонизацию неорганической фазы, а в материалах Gen-Os содержался коллаген. Применение двух материалов Gen-Os привело к статистически значимому усилению секреции фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) клетками периодонтальной связки (ПС). Статистически значимое увеличение пролиферации эндотелиальных клеток наблюдалось в культуральных средах с добавлением экстрактов из материалов Gen-Os различного происхождения, но не в среде, кондиционированной материалом Bio-Oss. Наконец, в обеих средах с добавлением экстрактов из материалов Gen-Os отмечалась интенсификация процесса ангиогенеза, что подтверждается усилением образования капиллярных структур. В совокупности полученные данные свидетельствуют, что исследуемые остеозамещающие материалы Gen-Os обладают высокой ангиогенной активностью, влияя на активность клеток ПС, скорее всего, за счет усиления синтеза VEGF.

**Ключевые слова:** характеристика, ангиогенез, VEGF, остеозамещающий материал, клетки периодонтальной связки

### ВВЕДЕНИЕ

Материалы для костной регенерации часто применяются для минимизации резорбции объема костной ткани после удаления зубов и лечения внутрикостных дефектов. Остеозамещающие материалы служат структурной основой (биосовместимой матрицей) для построения костной ткани в период ее регенерации и создают предпосылки для миграции остеоцитов в область костного дефекта<sup>1</sup>. Успех регенерации костной ткани во многом обусловлен проращением кровеносных сосудов в область, заполненную остеозамещающим материалом, из тканей, окружающих костный дефект. Проблемы с ревазуляризацией зоны дефекта приведут к нарушению процесса регенерации кости, что в свою очередь приведет к неадекватной оксигенации и недостатку питания тканей, а также к ограничению миграции клеток, отвечающих за восстановление объема костной ткани<sup>2-4</sup>.

Для оценки влияния различных факторов на скорость ревазуляризации исследователи проанализировали результаты добавления экзогенных ангиогенных факторов, таких как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), в область дефекта костной ткани<sup>5,6</sup>. Несмотря на перспективность данного метода, он не лишен недостатков. Из-за сложности моделирования необходимых физиологических условий *in vivo* и короткого периода полувыведения факторов роста, профиль высвобождения факторов роста в живых организмах нельзя воспроизвести только с помощью экзогенного введения данных веществ. Пациентам часто вводят сверхфизиологические дозы веществ, что может вызывать развитие нежелательных явлений<sup>5,7</sup>. Кроме того, стоимость рекомбинантных белков может быть достаточно высокой, что предполагает значительные финансовые затраты для пациента<sup>8</sup>.

Было доказано, что различные остеозамещающие материалы, успешно применяемые в клинической практике, обладают высоким ангиогенным потенциалом. Например, результаты различных исследований *in vitro* свидетельствуют об

увеличении секреции фибробластами фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактора роста фибробластов (FGF-2) после прямого и косвенного контакта с частицами 45S5 Bioglass<sup>®</sup>, что приводило к увеличению пролиферации эндотелиальных клеток и формированию сосудистой сети<sup>9-12</sup>. В ходе клинического исследования было зарегистрировано усиление ангиогенеза после применения пасты с нанокристаллическим гидроксипатитом после удаления зубов<sup>13</sup>.

Полученные данные свидетельствуют, что использование остеозамещающих материалов, обладающих ангиогенным потенциалом, для замещения дефектов альвеолярной кости может улучшить конечный клинический результат. В настоящем исследовании была дана характеристика трех ксеногенных материалов для костной регенерации, широко используемых в имплантологии и пародонтологии: коллагенсодержащий кортикально-губчатый костный материал лошадиного и свиного происхождения Gen-Os и материал Bio-Oss, состоящий из минеральных компонентов костной ткани крупного рогатого скота. Также была выполнена оценка их ангиогенного потенциала. Важная особенность данного исследования заключалась в том, что при резорбции кости альвеолярного отростка после удаления зубов или в результате пародонтита, остеозамещающий материал контактировал не только с костной тканью, но и с периодонтальной связкой (рис. 1). Авторы исследования выдвинули гипотезу, что материал для костной регенерации может влиять на ангиогенную активность клеток периодонтальной связки (ПС), что в свою очередь является обязательным условием успешной регенерации кости. В клинической практике клетки ПС могут подвергаться непосредственному воздействию остеозамещающего материала. Однако большая часть клеток ПС подвергается воздействию экстрактов из данных материалов. В настоящем исследовании *in vitro* моделировали клиническую ситуацию, при которой клетки ПС контактируют с экстрактами трех остеозамещающих материалов. В ходе исследования проводили измерения интенсивности секреции VEGF, то есть фактора роста, играющего важнейшую роль в процессе ангиогенеза<sup>14</sup>. Дополнительно влияние на ангиогенез оценивали с помощью анализа темпов пролиферации эндотелиальных клеток и формирования капилляроподобных структур, отражающих ангиогенную активность материалов *in vivo*.

\*Авторы, которые внесли равный вклад в эту работу.

Цветные графики и изображения можно найти в онлайн-версии статьи, которая представлена на платформе J-STAGE.

Получено 5 января 2016 г.; принято к публикации 7 июля 2016 г.

doi:10.4012/dmj.2016-005 JOI JST.JSTAGE/DMJ/2016-005

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе исследования изучали свойства трех различных ксеногенных материалов для костной регенерации (таблица 1 и рис. 2):

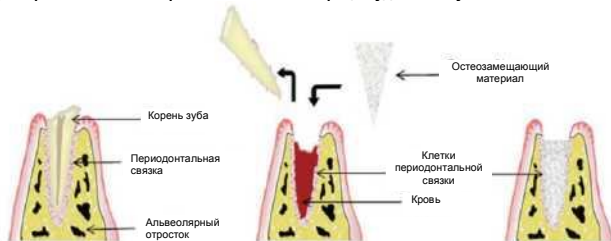
- Bio-Oss — препарат для костной регенерации, состоящий из минеральных компонентов костей крупного рогатого скота (Geistlich Pharma, Вольхузен, Швейцария).
- Gen-Os — коллагенсодержащий кортикально-губчатый костный материал лошадиного происхождения (OsteoBio<sup>®</sup>, Tecno<sup>®</sup>, Джавено, Италия).
- Gen-Os — коллагенсодержащий кортикально-губчатый костный материал свиного происхождения (OsteoBio<sup>®</sup>, Tecno<sup>®</sup>).

### Характеристика свойств материалов

Характеристики трех материалов для костной регенерации оценивали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), энергодисперсионной спектроскопии (ЭДС), рентгеновской дифрактометрии (РД) и инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (ИКФС).

С использованием сканирующего электронного микроскопа (Zeiss MERLIN Field Emission SEM, Carl Zeiss NTS, Оберкохен, Германия) и режима регистрации вторичных электронов при различных увеличениях рассматривали поверхность частиц порошков, распределенных по поверхности углеродной ленты на

#### а) Сохранение альвеолярной кости после операции удаления зуба



#### б) Замещение дефектов костной ткани при пародонтите



Рис. 1 Способ применения материалов для регенерации костной ткани после удаления зубов и при заболеваниях пародонта со схематичным отображением их контакта с пародонтальной связкой.

а) Сохранение альвеолярной кости после операции удаления зуба. После удаления зуба гранулы остеозамещающего материала добавляют в лунку, где они контактируют с клетками ПС, кровью и поверхностью альвеолярной кости. Материал для костной регенерации снижает вероятность резорбции костной ткани в области лунки удаленного зуба. Клетки ПС, находясь в тесном контакте с остеозамещающим материалом, могут влиять на процесс ангиогенеза и регенерации костной ткани. (б) Замещение дефектов костной ткани при пародонтите. В области пародонтального кармана полностью удаляют воспаленные ткани и заполняют область дефекта костной ткани остеозамещающим материалом. Клетки ПС, оставшиеся на поверхности корня, могут взаимодействовать со структурными элементами материала для костной регенерации.

алюминиевой пластине. Изучение свойств материалов также проводили с применением энергодисперсионного спектрометра (ЭДС). Фазовый анализ проводили с использованием метода рентгеновской дифрактометрии. С помощью рентгеновского дифрактометра (Bruker D8 Advance, Bruker, Биллерика, Массачусетс, США) регистрировали поглощение излучения Cu K $\alpha$  при 40 мА и 45 кВ, диапазон вращения детектора составлял 10–60°, шаг сканирования — 0,02° (2 $\theta$ ), а скорость сканирования — 0,6°/мин. Скорость вращения образца составляла 15 об/мин. Идентификацию кристаллических фаз выполняли с использованием программного обеспечения для поиска соответствий в базе данных ICDD (Международный центр дифракционных данных, Ньютаун-Сквер, Пенсильвания, США). ИК-Фурье спектроскопию проводили с использованием порошкообразных образцов, спрессованных в таблетки с бромидом калия (KBr). В ходе анализа 2–5 мг измельченного испытуемого материала смешивали со 100 мг бромида калия, формировали таблетки и помещали их в спектроскоп (IRAffinity-1, Shimadzu, Киото, Япония). Регистрацию сигнала проводили в диапазоне 400–4000 см<sup>-1</sup>.

### Гранулометрия

Распределение частиц по размерам исследовали с помощью лазерного анализатора размеров частиц (Hydro 2000, Malvern Mastersizer, Малверн, Вустершир, Великобритания) и водного диспергатора. Измерение размеров частиц каждого материала выполняли 10 раз. Далее строили графики, отражающие процентное содержание частиц различного диаметра в исследуемых материалах (указывали средние значения, выраженные в микронах).

### Приготовление клеточных культур и экстрактов из остеозамещающих материалов

Клетки ПС человека были получены при удалении здоровых третьих моляров в ходе ортодонтического лечения. Процедуры проводили в соответствии с законодательством Франции. Ткани пародонтальной связки дополнительно измельчали. Полученную клеточную смесь помещали в чашки для культивирования диаметром 100 мм. Субкультивирование



Рис. 2 Упаковки остеозамещающих материалов и их содержимое. Слева показан материал Bio-Oss, а справа — материал Gen-Os свиного происхождения (материал Gen-Os лошадиного происхождения макроскопически не отличается от представленного на фото).

Таблица 1. Обзор использованных материалов для костной регенерации (данные, предоставленные изготовителями)

Материал / стандартный образец	Изготовитель	Происхождение	Гранулометрия частиц (мкм)
Bio-Oss/30643.3	Geistlich	Крупный рогатый скот	250–1000
Gen-Os/M1005FE	Tecno <sup>®</sup>	Лошадиное происхождение	250–1000
Gen-Os/M1005FS	Tecno <sup>®</sup>	Свиное происхождение	250–1000

конфлюэнтных культур проводили с использованием минимальной поддерживающей среды (MEM) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС), глутамин 2 ммоль, пенициллина 100 МЕ/мл, стрептомицина 100 пг/мл и амфотерицина В 0,25 пг/мл (Dominiq Dutscher, Брюмат, Франция). Эндотелиальные клетки из пупочной вены человека (HUVES) культивировали в базальной среде для роста эндотелиальных клеток (EBM-2) с добавлением смеси для поддержания жизнеспособности клеток SupplementMix (PromoCell, Гейдельберг, Германия). Экстракты каждого материала для костной регенерации (таблица 1, рис. 2) получали путем их инкубации в бессывороточной среде MEM (концентрация 20 мг/мл) в течение 24 часов при температуре 37 °C.

#### *Влияние остеозамещающих материалов на секрецию VEGF клетками ПС*

Кондиционированные среды получали путем культивирования клеток ПС с плотностью монослоя 30 000 клеток/см<sup>2</sup> в 6-луночных планшетах. В каждую лунку добавляли по 1 мл экстрактов. Через 24 часа или 3 дня супернатанты (= кондиционированная среда) собирали для количественного определения VEGF с использованием набора DuoSet ELISA, в соответствии с инструкциями производителя (R&D Systems, Лилль, Франция). В качестве контроля использовали надосадочную жидкость, полученную при культивировании клеток в той же среде, но без добавления экстрактов исследуемых материалов.

#### *Влияние остеозамещающих материалов на пролиферацию клеток HUVES и неоангиогенез*

Для оценки пролиферации клеток HUVES и темпов ангиогенеза готовили кондиционированные среды в соответствии с процедурой, описанной выше. Использовали среды без добавления сыворотки и факторов роста (EBM-2); культуры клеток ПС инкубировали в течение 3 дней. Для оценки параметров пролиферации клеток HUVES культивирование проводили при низкой плотности монослоя (1000 клеток/см<sup>2</sup>) в 96-луночных планшетах. К клеткам добавляли кондиционированные среды и оценивали их пролиферацию через 2, 5 и 7 дней при помощи теста на активность митохондриальной сукцинатдегидрогеназы (МТТ-тест), как описано в предыдущих работах<sup>15</sup>. Результаты МТТ-теста показывают процент жизнеспособных клеток в контрольной среде после культивирования.

Для оценки ангиогенной способности HUVES ( $4 \times 10^5$  клеток/лунка) высевали на внеклеточный матрикс Matrigel и культивировали в кондиционированной среде. Процесс организации эндотелиальных клеток отслеживали с помощью фазово-контрастного микроскопа (Carl Zeiss Axiovert200) (Carl Zeiss S.A.S., Марли Ле Рой, Франция) в течение трех дней. Ангиогенную активность количественно оценивали с помощью программного обеспечения ImageJ<sup>16</sup> путем измерения периметра сосудов.

#### *Статистический анализ данных*

Все биологические эксперименты выполняли как минимум в трех повторностях. Статистическую значимость полученных результатов ( $p < 0,05$ ) оценивали с использованием критерия Стьюдента. При этом сравнивали наборы данных для каждого материала и результаты соответствующего контрольного испытания. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

#### *Характеристика свойств материалов*

Микрофотографии образцов трех материалов для костной регенерации, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа в режиме регистрации вторичных электронов, представлены на рисунке 3. Изображения, полученные при низкой мощности излучения, дают представление о размерах и форме частиц, в то время как

изображения, полученные при более высокой мощности излучения, демонстрируют морфологию поверхности. Размеры и форма частиц значительно варьировались: у материалов Gen-Os различного происхождения наблюдались меньшие размеры и менее угловатая форма частиц по сравнению с материалом Bio-Oss. Характер поверхности различных материалов также различался.

Результаты ЭДС показывают, что все материалы в основном состоят из кальция и фосфора, а также содержат следы натрия и магния. У материала Bio-Oss отмечалось более низкое соотношение кальция к фосфору по сравнению с материалами Gen-Os, независимо от их происхождения (таблица 2).

График дифракции рентгеновских лучей (XRD) и спектр ИКФС показаны на рис. 4а) и б) соответственно. Согласно данным рентгеновской дифрактометрии все исследуемые материалы имели аналогичную кристаллическую структуру (рис. 4а). Степень кристалличности материалов была невысокой, основные пики наблюдались при  $25,88^\circ 2\theta$  (0,0,2), широкий пик в области  $31,31^\circ$  (2,1,1),  $32,18^\circ$  (3,0,0) и  $33,81^\circ 2\theta$  (2,0,2) и один невысокий пик при  $39,76^\circ 2\theta$  (1,3,0). Другие проиндексированные пики показаны на рис. 4а). Эти пики являются типичными для оксиапатита (ICDD: 04-011-1880).

На ИКФС спектре (рис. 4б) виден двойной пик в области спектра  $550\text{--}600\text{ см}^{-1}$  и валентные колебания в области  $1038\text{ см}^{-1}$ . Они типичны для  $\text{PO}_4^{3-}$  и были более выраженными в спектрах Bio-Oss по сравнению со спектрами материалов Gen-Os. Кроме того, пики  $\text{CO}_3^{2-}$  в области 1463 и  $1412\text{ см}^{-1}$  и  $872\text{ см}^{-1}$  свидетельствуют о более высоком содержании карбоната в апатите в материале Bio-Oss по сравнению с другими исследуемыми материалами. Полоса в области  $1641\text{ см}^{-1}$  соответствует  $\text{H}_2\text{O}$  и имеет более высокое разрешение в материале Bio-Oss. В спектре материала Bio-Oss также присутствовали характерные ОН-диапазоны в области  $3562\text{ см}^{-1}$ . Спектры материалов Gen-Os свиного и лошадиного происхождения имели полосы в области  $1650$  и  $1560\text{ см}^{-1}$ , характерные для валентных колебаний амидной связи  $\text{C}=\text{O}$  и колебания связи  $\text{N}-\text{H}$ . Присутствие коллагена в образцах двух типов материала Gen-Os подтверждается наличием полос в области  $3450$  и  $1450\text{ см}^{-1}$ , характерных для валентных колебаний ОН.

#### *Гранулометрия*

Процентное содержание частиц различного диаметра в исследуемых материалах показано на рис. 5. Данные о размерах частиц, предоставленные производителем, приведены в таблице 1. Материал Bio-Oss имеет больший размер частиц по сравнению с Gen-Os, что подтверждается результатами сканирующей электронной микроскопии. Размер основной массы частиц всех материалов находился в диапазоне  $100\text{--}275\text{ мкм}$ . Материалы Gen-Os различного происхождения имели бимодальное распределение частиц по размеру; размер некоторых частиц соответствовал  $20\text{--}80\text{ мкм}$ .

#### *Влияние остеозамещающих материалов на секрецию VEGF клетками ПС*

Все три материала для костной регенерации статистически значимо увеличивали секрецию VEGF клетками ПС после 1- и 3-дневной экспозиции (рис. 6). По сравнению с начальным уровнем секреции VEGF ( $755\text{ пг/мл}$ ), при добавлении экстракта из материала Bio-Oss интенсивность секреции возросла в два раза, а в присутствии экстрактов из материалов Gen-Os (свиного и лошадиного происхождения) — приблизительно в три раза. Кроме того, в присутствии экстрактов из материалов Gen-Os свиного и лошадиного происхождения уровень секреции VEGF был статистически значимо выше по сравнению с наблюдаемым при добавлении экстракта из материала Bio-Oss.

#### *Влияние остеозамещающих материалов на пролиферацию клеток HUVES и неоангиогенез*

В кондиционированных средах, полученных в результате 3-дневного контакта питательной среды с материалами Gen-Os

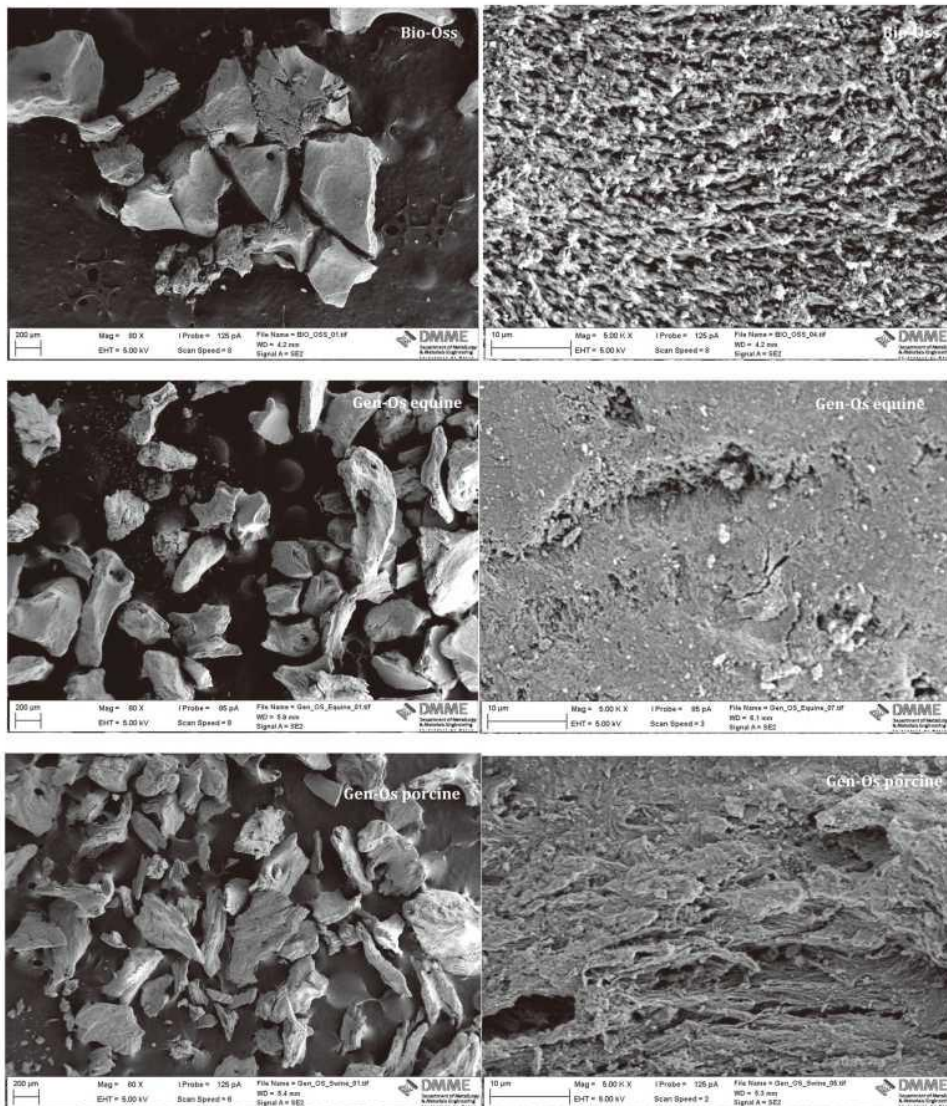


Рис. 3 Микрофотографии образцов трех материалов для костной регенерации, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа в режиме регистрации вторичных электронов. На микрофотографиях показана микроструктура поверхности материалов.

Таблица 2. Соотношение кальция и фосфатов в испытуемых материалах

Материал	Соотношение Ca/P
Gen-Os свиного происхождения	2,15
Gen-Os лошадиного происхождения	2,07
Bio-Oss	1,63

различного происхождения, отмечалось статистически значимое усиление пролиферации эндотелиальных клеток через 2, 5 и 7 дней (рис. 7). Спустя 7 дней наблюдалось снижение клеточной пролиферации по сравнению с показателями 2-го и 5-го дня, что можно объяснить достижением клетками конfluenceнтности и снижением их метаболизма, что подтверждается снижением интенсивности преобразования МТГ в формазан<sup>17)</sup>. В среде, кондиционированной материалом Bio-Oss, через 2 дня регистрировали рост пролиферации эндотелиальных клеток, но данный эффект был краткосрочным — через 5 и 7 дней жизнеспособность клеток значительно снизилась до значений, составляющих 66 и 55 % соответственно от значений, наблюдаемых в контрольных средах.

Через 3 дня культивирования на внеклеточном матриксе Matrigel наблюдалось образование хорошо организованных капиллярноподобных закрытых структур из эндотелиальных клеток во всех средах с добавлением экстрактов из остеозамещающих материалов, а также в контрольных средах (рис. 8). Результаты измерения периметров данных структур

свидетельствовали, что в средах, кондиционированных материалами Gen-Os (свиного и лошадиного происхождения), отмечались более высокие значения данного параметра по сравнению со средами, кондиционированными материалом Bio-Oss. Периметры сосудов в средах с экстрактами из материала Bio-Oss были сопоставимы с периметрами сосудов в контрольных средах.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании изучали свойства трех материалов для костной регенерации, используемых для лечения дефектов альвеолярной кости, а также проводили эксперименты *in vitro* для оценки ангиогенного потенциала материалов при контакте их частиц с клетками ПС. Важная особенность данного исследования заключалась в том, что остеозамещающий материал контактировал не только с костной тканью, но и с периодонтальной связкой (рис. 1). Предполагается, что второй тип контакта может способствовать усилению ангиогенеза, что является необходимым условием для регенерации костной ткани. Ангиогенез, который представляет собой процесс врастания кровеносных сосудов из тканей, окружающих костный дефект, связан со стимуляцией эндотелиальных клеток различными ангиогенными факторами, включая VEGF, активацией пролиферации эндотелиальных клеток и структурной перестройкой этих клеток с образованием новых кровеносных сосудов.

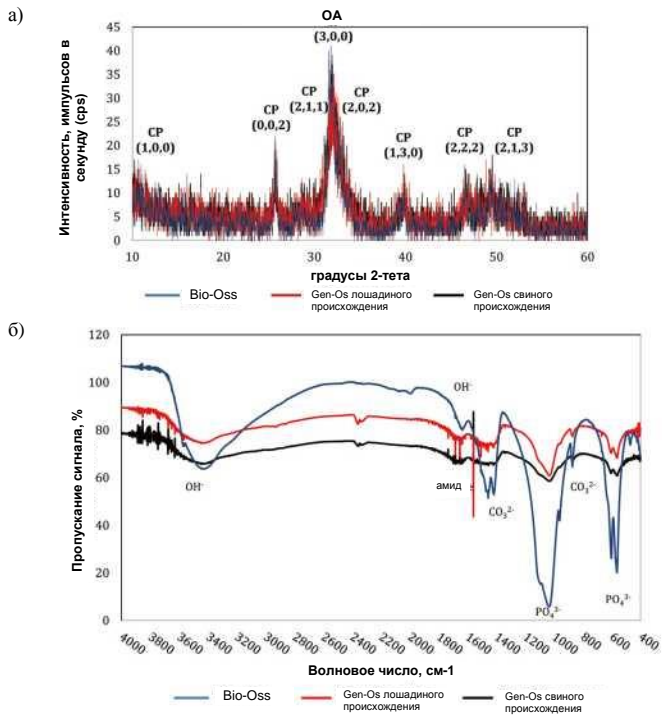


Рис. 4 Характеристика свойств материалов: (а) рентгенодифракционный анализ, информация о присутствующих в смеси фазах. Основные пики являются типичными для оксипатита (ОА; ICDD: 04-011-1880). (б) ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье (ИКФС), химический состав материалов.

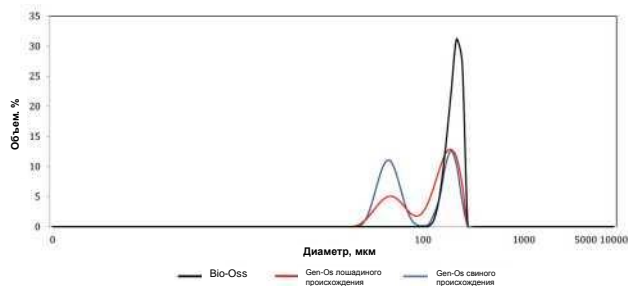


Рис. 5 Данные о распределении частиц остеозамещающих материалов по размерам, полученные с помощью лазерного анализатора размеров частиц.

Характеристики указанных материалов оценивали с использованием различных методов, включая СЭМ и ЭДС, которые дали представление о размерах и форме частиц. ЭДС позволила оценить качественный и количественный элементный состав материалов. Рентгенодифракционный анализ показал, что материалы имеют кристаллическую структуру, а также представил информацию о присутствующих в смеси фазах, в то время как спектр ИКФС отобразил химический состав материалов. Таким образом, была дана точная характеристика химических свойств материалов, что важно для оценки влияния материалов на активность клеток.

Полученные результаты однозначно указывают на то, что оба материала Gen-Os (свиного и лошадиного происхождения) приводят к статистически значимому увеличению секреции VEGF и обладают более высоким ангиогенным потенциалом по сравнению с материалом Bio-Oss. При культивировании клеток ПС в среде с добавлением экстрактов из материалов Gen-Os отмечается увеличение секреции VEGF. Это связано с усилением пролиферации эндотелиальных клеток и образованием капиллярноподобных структур. Изучение особенностей формирования указанных структур позволяет провести экстраполяцию данных для оценки процесса ангиогенеза *in vivo*. Ангиогенную способность можно оценить в экспериментах *in vitro* с помощью дифференцировочного анализа с применением внеклеточного матрикса Matrigel<sup>19</sup>. С помощью этого анализа

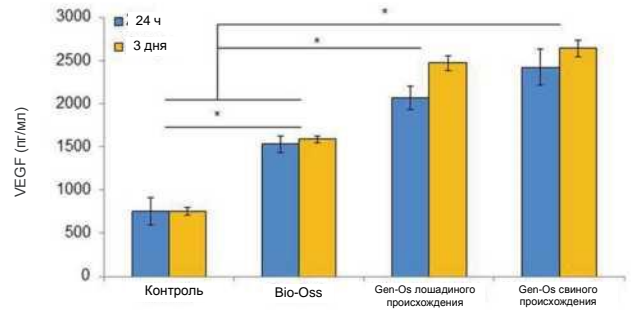


Рис. 6 Влияние материалов для костной регенерации на секрецию VEGF. Количественные данные о секреции VEGF клетками ПС в кондиционированной среде, полученные после инкубации клеток с экстрактами трех остеозамещающих материалов в течение 24 ч и 3 дней. В качестве контроля использовали культуру клеток ПС в среде MEM без добавления сыворотки. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. Звездочкой обозначены результаты, соответствующие уровню значимости  $p < 0,05$  (критерий Стьюдента).

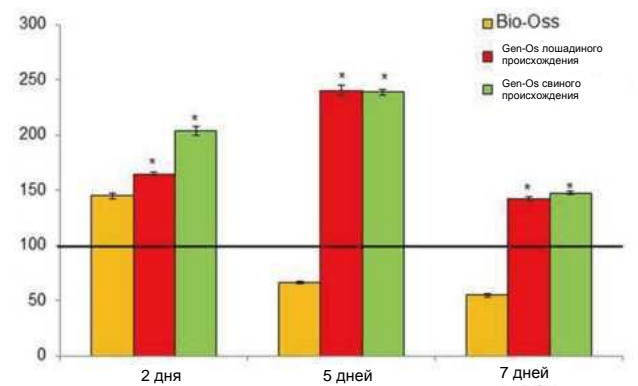


Рис. 7 Влияние остеозамещающих материалов на пролиферацию эндотелиальных клеток.

Пролиферация клеток HUVEC, подвергшихся воздействию кондиционированной среды EBM-2, полученной после 3-дневной инкубации клеток ПС. Данные получены через 2, 5 и 7 дней и выражены как процент жизнеспособных клеток в контрольной среде (клетки ПС в среде EBM-2 без добавления сыворотки после инкубации в течение 3 дней). Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. Разница между значениями, полученными с использованием кондиционированных и контрольных сред, была статистически значимой ( $p < 0,05$ ). Звездочкой отмечены статистически значимые различия между материалами Gen-Os и Bio-Oss ( $p < 0,05$ ).

можно количественно оценить интенсивность образования капиллярноподобных структур эндотелиальными клетками после контакта с биоматериалами путем подсчета количества сосудистых структур, оценки их ветвления и измерения периметров сосудов. В настоящем исследовании результаты измерения периметров сосудов наряду с результатами определения интенсивности пролиферации эндотелиальных клеток использовались для оценки ангиогенного потенциала материалов<sup>20,21</sup>.

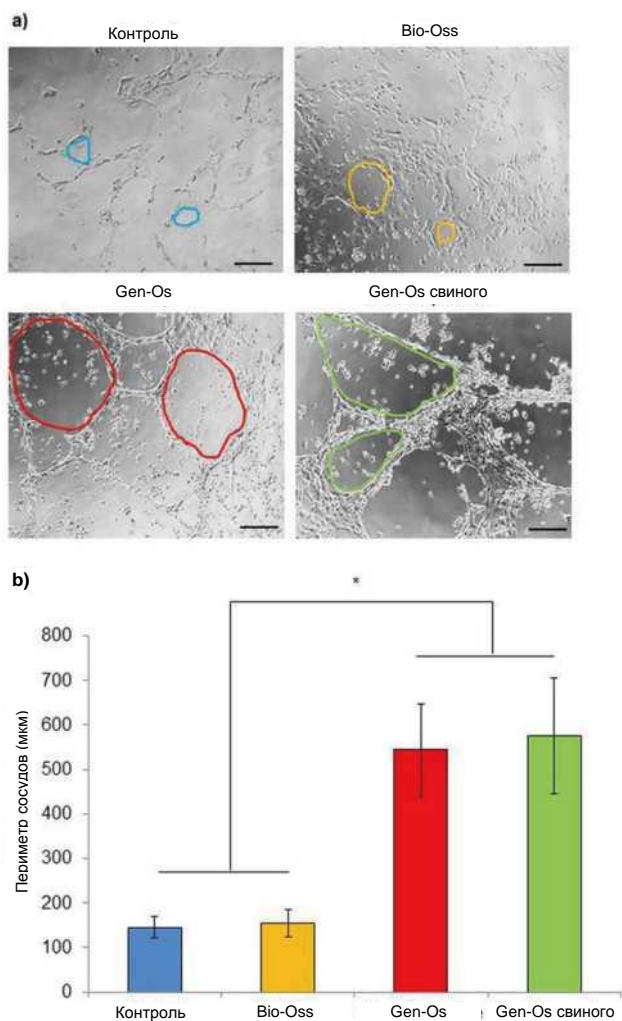


Рис. 8 Влияние материалов для костной регенерации на интенсивность ангиогенеза *in vitro*.

При инкубации эндотелиальных клеток в кондиционированных средах EBM-2, полученных после 3-дневной инкубации клеток ПС, они организовывались в закрытые структуры и образовывали капиллярную сеть. В качестве контроля использовали кондиционированную среду, полученную после инкубации клеток ПС в среде EBM-2 без добавления сыворотки в течение 3 дней. (а) Репрезентативные микроскопические изображения для количественного определения периметра сосудов с помощью программного обеспечения ImageJ (масштабный отрезок 50 мкм). (б) Диаграмма с указанием средних значений периметров сосудов и отображением стандартных отклонений. Звездочкой обозначены результаты, соответствующие уровню значимости  $p < 0.05$ .

В среде, кондиционированной материалом Bio-Oss, наблюдалось менее выраженное усиление секреции VEGF и менее активное образование капиллярноподобных структур. Согласно результатам ИКФС, материал Bio-Oss демонстрирует более высокое содержание карбоната в кристаллах апатита. Предыдущие работы свидетельствуют, что карбонизация гидроксиапатита приводила к снижению секреции VEGF. Это было продемонстрировано на примере остеобластоподобных клеток MG63, подвергшихся воздействию карбонизированного и неизмененного гидроксиапатита<sup>22</sup>. Кроме того, в данном исследовании наблюдалось возможное токсическое действие материала Bio-Oss: пролиферация эндотелиальных клеток статистически значимо снизилась после 5 и 7 дней культивирования. Полученный результат согласуется с данными исследования Zimmerman и соавт., которые сообщали о токсическом действии элюатов материала Bio-Oss на мезенхимальные стволовые клетки свиней. Возможно, данный эффект наблюдался из-за присутствия токсичных веществ,

элюируемых из материала Bio-Oss во время приготовления экстракта<sup>23</sup>.

Клиническая эффективность материала Bio-Oss в отношении замещения дефектов альвеолярной кости и сохранения объема костной ткани после удаления зубов была подтверждена<sup>24</sup>, однако следует отметить, что в данном исследовании использовали материал Bio-Oss без добавления коллагена, тогда как в других исследованиях использовали материал Bio-Oss Collagen<sup>25,26</sup>. Материалы Gen-Os различного происхождения также подтвердили свою клиническую эффективность<sup>(27,28)</sup>. Положительные результаты, по-видимому, были связаны с наличием коллагена в составе указанных материалов. Уникальная низкотемпературная технология производства материалов Gen-Os позволяет сохранить естественную коллагеновую матрицу<sup>29</sup>. Присутствие коллагена в материалах Gen-Os различного происхождения было подтверждено данными ИКФС. Было высказано предположение, что присутствие в остеозамещающем материале коллагена создает благоприятные условия для регенерации костной ткани. Прямой контакт эндотелиальных клеток с коллагеном материала для костной регенерации способствует росту сосудов<sup>30</sup>. Специфическое взаимодействие между интегрином и последовательностью аминокислот 496–507 коллагена типа  $\alpha 1(I)$  обеспечивает прямое присоединение эндотелиальных клеток к матрице материала<sup>31</sup>.

Данные, полученные в настоящем исследовании, отражают результаты непрямого контакта клеток и материалов для костной регенерации. Для оценки последствий контакта остеозамещающего материала с клетками ПС *in vivo* использовали экстракты, полученные из материалов для костной регенерации. Данная работа помогает понять молекулярные и клеточные механизмы, лежащие в основе эффектов, наблюдаемых в клинических исследованиях. Таким образом, исследование ангиогенного потенциала остеозамещающих материалов дает дополнительное объяснение клиническому успеху, наблюдаемого при применении материалов Gen-Os. Усиленная секреция VEGF клетками ПС будет способствовать ускорению васкуляризации, что необходимо для успешной регенерации костной ткани в случае добавления остеозамещающего материала в область костного дефекта. Несмотря на то, что данное исследование *in vitro* является краткосрочным и не может полностью объяснить долгосрочные эффекты применения остеозамещающих материалов, его результаты создают предпосылки для дальнейшего изучения свойств материалов в условиях *in vivo*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данного исследования *in vitro* было продемонстрировано, что материалы Gen-Os свиного и лошадиного происхождения обладают более высоким ангиогенным потенциалом по сравнению с материалом Bio-Oss. Материалы Gen-Os различного происхождения обладают способностью индуцировать секрецию VEGF клетками ПС. Это важная особенность данных материалов, поскольку снижает потребность в применении экзогенного фактора роста. Кроме того, материалы Gen-Os стимулируют ангиогенез, а значит будут способствовать процессу регенерации костной ткани за счет интенсификации процесса ревазуляризации в области закладки материала.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Данное исследование финансировалось за счет гранта Университета Экс-Марсель и Национального центра научных исследований (Франция).

Авторы статьи выражают благодарность доктору Jean-Charles GARDON за предоставление третьих моляров, использованных в ходе данного исследования, а также преподавателям химического факультета Мальтийского университета профессору Claude FARRUGIA и Jonathan SPITERI, а также James CAMILLERI, представляющему факультет металлургии и материаловедения инженерного

факультета Мальтийского университета, за проведение технической экспертизы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1) Liu J, Kerns DG. Mechanisms of guided bone regeneration: a review. *Open Dent J* 2014; 8: 56-65.
- 2) Saran U, Gemini Piperni S, Chatterjee S. Role of angiogenesis in bone repair. *Arch Biochem Biophys* 2014; 561: 109-117.
- 3) Stegen S, van Gastel N, Carmeliet G. Bringing new life to damaged bone: the importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. *Bone* 2015; 70: 19-27.
- 4) Novosel EC, Kleinhans C, Kluger PJ. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2011; 63: 300-311.
- 5) Gothard D, Smith EL, Kanczler JM, Rashidi H, Qutachi O, Henstock J, Rotherham M, El Haj A, Shakesheff KM, Oreffo RO. Tissue engineered bone using select growth factors: A comprehensive review of animal studies and clinical translation studies in man. *Eur Cell Mater* 2014; 28: 166207.
- 6) Du B, Liu W, Deng Y, Li S, Liu X, Gao Y, Zhou L. Angiogenesis and bone regeneration of porous nano-hydroxyapatite/ coralline blocks coated with rhVEGF165 in critical-size alveolar bone defects in vivo. *Int J Nanomed* 2015; 10: 25552565.
- 7) Aryal R, Chen X, Fang C, Hu Y. Bone morphogenetic protein-2 and vascular endothelial growth factor in bone tissue regeneration: new insight and perspectives. *Orthop Surg* 2014; 6: 171-178.
- 8) Roux BM, Cheng M-H, Brey EM. Engineering clinically relevant volumes of vascularized bone. *J Cell Mol Med* 2015; 19:903-914.
- 9) Gerhardt L-C, Boccaccini AR. Bioactive glass and glass- ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Materials* 2010; 3: 3867-3910.
- 10) Gorustovich AA, Roether JA, Boccaccini AR. Effect of bioactive glasses on angiogenesis: a review of in vitro and in vivo evidences. *Tissue Eng Part B Rev* 2010; 16: 199-207.
- 11) Detsch R, Stoor P, Grünwald A, Roether JA, Lindfors NC, Boccaccini AR. Increase in VEGF secretion from human fibroblast cells by bioactive glass S53P4 to stimulate angiogenesis in bone. *J Biomed Mater Res A* 2014; 102: 40554061.
- 12) Day RM. Bioactive glass stimulates the secretion of angiogenic growth factors and angiogenesis in vitro. *Tissue Eng* 2005; 11: 768-777.
- 13) Canuto RA, Pol R, Martinasso G, Muzio G, Gallesio G, Mozzati M. Hydroxyapatite paste Ostim, without elevation of full-thickness flaps, improves alveolar healing stimulating BMP- and VEGF-mediated signal pathways: an experimental study in humans. *Clin Oral Implants Res* 2013; 24 Suppl A: 42-48.
- 14) Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 2413-2422.
- 15) Mathieu S, Jeanneau C, Sheibat-Othman N, Kalaji N, Fessi H, About I. Usefulness of controlled release of growth factors in investigating the early events of dentin-pulp regeneration. *J Endod* 2013; 39: 228-235.
- 16) Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012; 9: 671-675.
- 17) Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. *Cell Viability Assays*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2013.
- 18) Folkman J, Shing Y. *Angiogenesis*. *J Biol Chem* 1992; 267: 10931-10934.
- 19) Arnaoutova I, George J, Kleinman HK, Benton G. The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis* 2009; 12: 267-274.
- 20) Tran-Hung L, Mathieu S, About I. Role of human pulp fibroblasts in angiogenesis. *J Dent Res* 2006; 85: 819-823.
- 21) Salani D, Taraboletti G, Rosano L, Di Castro V, Borsotti P, Giavazzi R, Bagnato A. Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Am J Pathol* 2000; 157: 17031711.
- 22) Adams BR, Mostafa A, Schwartz Z, Boyan BD. Osteoblast response to nanocrystalline calcium hydroxyapatite depends on carbonate content. *J Biomed Mater Res A* 2014; 102: 32373242.
- 23) Zimmermann CE, Gierloff M, Hedderich J, Açil Y, Wiltfang J, Terheyden H. Biocompatibility of bone graft substitutes: effects on survival and proliferation of porcine multilineage stem cells in vitro. *Folia Morphol (Warsz)* 2011; 70: 154-160.
- 24) Carmagnola D, Adriaens P, Berglund T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss. *Clin Oral Implants Res* 2003; 14: 137-143.
- 25) Nevins ML, Camelo M, Lynch SE, Schenk RK, Nevins M. Evaluation of periodontal regeneration following grafting intrabony defects with bio-oss collagen: a human histologic report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2003; 23: 9-17.
- 26) Schulz MC, Kallweit MB, Kallweit S, Koch R, Lauer G, Mai R, Hoffmann T. Autogenous bone and a bovine bone substitute for ridge preservation — preliminary clinical and histologic findings. *Aust Dent J* 2015; doi: 10.1111/adj.12313.
- 27) Cardaropoli D, Cardaropoli G. Preservation of the postextraction alveolar ridge: a clinical and histologic study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2008; 28: 469-477.
- 28) Festa VM, Addabbo F, Laino L, Femiano F, Rullo R. Porcine- derived xenograft combined with a soft cortical membrane versus extraction alone for implant site development: a clinical study in humans. *Clin Implant Dent Relat Res* 2013; 15: 707-713.
- 29) Figueiredo M, Henriques J, Martins G, Guerra F, Judas F, Figueiredo H. Physicochemical characterization of biomaterials commonly used in dentistry as bone substitutes —comparison with human bone. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010; 92: 409-419.
- 30) Barone A, Nannmark U. *Bone, Biomaterials & Beyond*. Edra Masson; 2014. 200 p.
- 31) Sweeney SM, DiLullo G, Slater SJ, Martinez J, Iozzo RV, Lauer-Fields JL, Fields GB, San Antonio JD. Angiogenesis in collagen I requires  $\alpha 2\beta 1$  ligation of a GFP\*GER sequence and possibly p38 MAPK activation and focal adhesion disassembly. *J Biol Chem* 2003; 278: 30516-30524.