



Обзор матриц (scaffolds) для стволовых клеток

СОЛОВЬЕВА О., к.м.н., Научный Центр Здоровья Университета Техаса в Сан Антонио, Кафедра Эндодонтии, Зав.кафедрой проф.Кен Харгривз (Ken Hargreaves), США

Overview of scaffolds for stem cells

O. SOLOVYOVA



О. СОЛОВЬЕВА

Резюме

Регенеративная стоматология открывает новые перспективы в лечении различных заболеваний. Для роста и дифференцировки стволовых клеток, клеточной адгезии и миграции необходимы матрицы (скаффолды), представляющие собой физико-химическую и биологическую трехмерную среду, которые также могут служить средством переноса морфогенных субстратов. Матрицы должны обеспечивать транспортировку питательных веществ, кислорода и продуктов обмена. Желательно, чтобы подложки постепенно рассасывались, замещаясь регенерирующими тканями, сохраняя при этом функции структуры требуемой ткани. Кроме того, матрицы должны быть биосовместимы, не токсичны, обладать необходимой физико-механической прочностью. В данном обзоре представлена характеристика различных видов матриц.

Abstract

Scaffolds provide a physicochemical and biological three-dimensional micro-environment for cell growth and differentiation, promoting cell adhesion, and migration. The scaffold can also serve as a carrier for the morphogen. Scaffolds should be effective for the transport of nutrients, oxygen and waste. Preferably, a scaffold should be gradually degraded and replaced by the regenerated tissue, while retaining the features of the final tissue structure. Furthermore, it should be biocompatible, non-toxic, and have proper mechanical strength. Presenting an overview of different types of scaffolds used in dentistry.

Введение

Термин «стволовая клетка» был введен в научный оборот русским гистологом Александром Максимовым (1874-1928). Он впервые заявил о наличии стволовых клеток в составе крови. На заседании Гематологического общества в Берлине 1 июня 1909 года он представил концепцию Stammzelle, суть которой заключалась в более широком понятии лимфоцита, как клетки, способной стать стволовой в современном значении этого термина. Несмотря на то что стволовые клетки были открыты в начале прошлого века, условия для их изучения появились позднее, когда ученые научились их замораживать и, по необходимости, размораживать, при этом чтобы клетки оставались живыми и здоровыми.

Исторический обзор

В 2003 году стоматолог Dr. Songtao Shi обнаружил стволовые клетки в молочном зубе, когда ему удалось после удаления подвижного зуба у своей шестилетней дочери выделить и сохранить способность к регенерации полученных стволовых клеток,

которые он назвал термином «стволовые клетки выпавших молочных зубов человека» (stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHED) [1].

В 2000 году Gronthos S. и его коллеги из Национального института здоровья (NIH, США) обнаружили стволовые клетки в постоянных зубах [2]. Потентные стволовые клетки/прогениторы, полученные из пульпы зубов взрослых людей, назвали «стволовыми клетками пульпы зуба, СКПЗ» (dental pulp stem cells, DPSCs). Известие об открытии СКПЗ было опубликовано в пресс-релизе Национального института здоровья 21 апреля 2003 года.

В декабре 2006 года в издании PLoS One Национального института здоровья были опубликованы результаты исследования Dr. Shi и его коллег-исследователей из разных стран на тему использования стволовых клеток удаленных зубов мудрости для восстановления функции зубов за счет успешной регенерации корня зуба и окружающих периодонтальных связок на модели животных [3]. Исследования в данном направлении продолжают по сей день.

Однако неизвестно, существуют ли такие клетки в воспаленной пульпе (ВП). В 2010 году Alongi и соавт. и Shi опубликовали результаты, которые помогают понять, в каком случае СКПЗ могут быть обнаружены и изолированы из пульпы, а затем успешно выращены, в каком случае они сохраняют потенциал к регенерации тканей *in vivo*. Alongi и соавт. получали свежие СКПЗ из нормальной пульпы (НП) и из воспаленной пульпы (ВП), смоделированной *in vitro*, и испытывали их возможности в отношении регенерации тканей на модели *in vivo*. С помощью иммуногистохимического анализа Alongi и соавт. установили, что ВП имеет более высокий уровень маркеров мезенхимальных стволовых клеток STRO-1, CD90, CD105 и CD146 по сравнению с НП ($p < 0,05$). Флуориметрический анализ показал, что СКПЗ из НП и ВП обладают уровнями CD146, стадийно-специфического эмбрионного антигена-4, CD73 и CD166 от среднего до высокого. Удвоение общей популяции СКПЗ-ВП ($44,6 \pm 2,9$) было существенно ниже, чем у СКПЗ-НП ($58,9 \pm 2,5$)



($p < 0,05$), остео/дентиногенный потенциал СКПЗ-ВП был ниже, чем у СКПЗ-НП при трансплантации их мышам с пониженным иммунитетом. Авторы пришли к заключению, что СКПЗ-ВП могут быть изолированы, и их маркеры мезенхимальных стволовых клеток схожи с НП. Несмотря на то что некоторые свойства стволовых клеток у СКПЗ-ВП измененные, в определенных случаях эти клетки сохраняют потенциал к регенерации тканей *in vivo* [4].

Изучаемые сегодня стволовые клетки и, в частности матрицы (scaffold), по праву являются одной из самых интересных и перспективных областей современной медицинской науки.

Матрицы для регенерации в стоматологии

Матрицы (матрикс, скаффолд) представляют собой физико-химические и биологические трехмерные микроstructures, обеспечивающие рост и дифференциацию клеток, клеточную адгезию и миграцию. Матрицы также могут служить средством переноса морфогенных субстратов.

Матрицы должны обеспечивать транспортировку питательных веществ, кислорода и продуктов обмена. Желательно, чтобы матрицы постепенно рассасывались, замещаясь регенерирующими тканями, сохраняя при этом функции структуры требуемой ткани. Кроме того, они должны быть биосовместимы, не токсичны, обладать необходимой физико-механической прочностью [5].

Немецкие исследователи считают, что в отношении развития стволовых клеток структура поверхности матрицы имеет большее влияние, нежели ее химический состав. Patrik Schmuiki и соавт. изучили поведение стволовых клеток на поверхностях с нанодоверстиями различных типов. Они обнаружили, что реакция стволовых клеток на нанодоверстия зависит от размера и топологии последних. Они предположили, что для регенерации тканей и имплантации в медицине могут быть полезны матрицы с поверхностями, полученными с помощью нанообъектов определенного строения. Schmuiki и соавт. предположили, что матрицы с поверхностями в виде наноструктуры, соответствующей по размерам стволовым клеткам (около 10 мкм), могут способствовать лучшей интеграции имплантатов.

Schmuiki заявил, что хотя и известно о влиянии структуры поверхности матрицы на рост и активность стволовых клеток, мы не знаем практически ничего о влиянии поверхности с размером структуры до 100 нм. Авторы продемонстрировали поведение мезенхимальных стволовых клеток на различных уровнях анодированных ZrO_2 отверстий различного диаметра от 10 до 50 нм за счет процесса самоорганизации на цирконии. Было установлено, что мезенхимальные стволовые клетки на поверхностях этих наноструктур показали зависимость от размера отверстий реакцию.

Авторы сравнили поведение клеток на этих нанодоверстиях ZrO_2 с данными исследованиями с нанодоверстиями TiO_2 различного диаметра. На обоих этих материалах, TiO_2 и ZnO_2 , наблюдали повышенную адгезию и распространение клеток в отверстиях диаметром 15-30 нм и существенный спад клеточной активности при диаметре более 50 нм. Таким образом, поведение клеток частично определяется специфической нанощкалой. Более того, даже когда отверстия полностью модифицировали плотным покрытием AuPd поверх сформированных слоев нанодоверстий, а также при изменении длины нанодоверстий, наблюдаемая зависимость от наноразмеров по-прежнему превалировала.

Данные исследования показали, насколько сильна зависимость активности клеток непосредственно от диаметра в пределах от 15 до 100 нм по сравнению с другими возможными факторами [6]. После модификации клетки получили возможность генерировать зеленый флуоресцентный протеин. Это позволило исследователям наблюдать реакцию между нанопервоверхностями и стволовыми клетками с помощью флуоресцентной микроскопии. Исследователи отметили, что плотность клеток, высаженных на нанопервоверхность, непосредственно связана с диаметром нанодоверстий, но не зависит от их длины или химического состава материала.

В исследованиях регенерации в стоматологии, проводимых в последние годы, использовали матрицы из различных материалов – от медленно резорбируемой пористой керамики с гидроксиапатитом, полученных естественным путем молекул, способных к деградации в среднеотдаленные сроки (например коллаген и хитозан), до отно-

сительно нестойких полимеров, таких как полигликолиевая кислота (PGA), полилактид (PLA) и поли-(D, L-полилактид) (PLGA) [7, 8].

Натуральные полимеры, такие как коллаген и фибронектин, обладают преимуществом хорошей цитосовместимости и биоактивности. Фибронектин способен сдерживать сцепление сигнальных молекул и играть роль при взаимодействии между внеклеточным матриксом и клетками, перестраивать цитоскелет поляризованных преодонтобластов при заживлении пульпы после травмы [9]. Место забора фибронектина критично в отношении клеточной адгезии [10]. Коллаген обладает химическими и биологическими свойствами, схожими с естественными тканями, а также низкой антигенностью. Коллаген I типа является основным компонентом структуры дентина и пульпы зуба. Наличие коллагена I типа в дентине считается определяющим фактором для инициации кальцификации [11]. Коллаген также позволяет перестраивать преодонтобласты и связывает новообразованные одонтобласты с тканями пульпы, создавая необходимые условия для репаративного дентиногенеза [12]. Таким образом, многие исследователи работают с данным типом матричного материала. Наконец, коллаген часто используют в качестве материала для обеспечения регенерации всего пульпо-дентинового комплекса [13]. Это интересное исследование, поскольку для тканевой инженерии необходимы трехмерные матрицы, имитирующие естественный внеклеточный костный матрикс для обеспечения адгезии, пролиферации и дифференциации клеток. Также матрица должна быть резорбируемой. Матрицы высокой пористости были предложены для внедрения двух внеклеточных компонентов, обнаруженных в кости – коллагена и гидроксиапатита (ГА). Коллагеновым компонентом матрицы является афибрилярный мономерный атеколлаген I типа, полученный из кожи нижней части голени эмбриона. Это создает новое окружение для введения порошка ГА. 500 000 первичных остеобластов человека высевали на матрицы кубической формы размером 4 мм с различной степенью соотношения ГА/коллагена. Анализировали образцы с соотношением ГА: коллаген в следующих пропорциях (по весу) – 1:99, 25:75, 50:50 и 75:25. Матрицы с клетками выращи-

вали в течение 21 дня. ДНК-анализ и окрашивание для определения жизнеспособности показали, что все матрицы обеспечивают пролиферацию и жизнеспособность клеток. Опыт с алкалайн-фосфатазой показал схожее поддержание фенотипа остеобласта у всех трехмерных матриц через 21 день. Исследование микро-КТ показало увеличение общего объема образца (что соответствует увеличению продуцирования неминерализованной матрицы). Также с помощью этой методики наблюдали равномерное распределение ГА в коллагеновой матрице. Через три недели наблюдали уменьшение процентного соотношения минерализованной фазы в данных конструкциях. Результаты показали, что при каждом из соотношений ГА:коллаген матрицы обладали существенным потенциалом в отношении инженерии костной ткани [27].

Также в качестве потенциальных матриц для репаративного дентиногенеза были предложены синтетические внеклеточные матрицы [14]. Альгинатный гидрогель способствовал ранозаживлению пульпы и позволял доставлять факторы роста, такие как TGF β 1, для усиления естественных возможностей регенерации пульпы зуба [15].

Минерал триоксид агрегат (МТА) – порошок, состоящий из гидрофильных частиц трикальций-силиката, трикальций-оксида и силикат-оксида, – недавно был предложен в качестве потенциального реставрационного материала. МТА устанавливает наличие влаги, препятствует микроподтеканиям, является биосовместимым и обеспечивает репаративное формирование дентина [16]. Керамика на основе фосфата кальция также широко применяется для восстановления твердых тканей благодаря своей высокой биосовместимости и возможности поддерживать дифференциацию остеогенных клеток. В стоматологии материалы на основе фосфата кальция широко используются в качестве материалов для покрытия пульпы [17]. В частности, для улучшения эктопического формирования кости используют пористую керамику, состоящую из гидроксиапатита (ГА) и трикальций фосфата (ТКФ). В исследованиях *in vivo* эти материалы при засевании СКПЗ отчетливо продемонстрировали прорастание тканей и васкуляризацию [18].

К примеру, Yang и соавт. изучали *in vitro* и *in vivo* поведение стволовых

клеток пульпы зуба (СКПЗ), высеянных на матрицы электроспан поли- (эпсилон-капролактон) (PCL)/желатина с добавлением или без добавления наногидроксиапатита (нГА). В исследовании *in vitro* измеряли состав ДНК, активность алкалайн фосфатазы (АЛФ) и остеокальцин (ОК). Определили, что матрицы способствовали адгезии СКПЗ, их пролиферации и дифференциации одонтобластов. Более того, присутствие нГА регулировало активность АЛФ и усиливало формирование ОК. Данные исследований в реальном времени подтвердили эти результаты. Фотографии СЭМ качественно подтвердили пролиферацию и свойства минерализации СКПЗ на обеих матрицах. Затем обе матрицы с СКПЗ были имплантированы подкожно мышам со сниженным иммунитетом. Матрицы с нГА, но без СКПЗ, были имплантированы в качестве контроля.

Гистологическое исследование показало, что все имплантаты покрылись капсулой тонкой фиброзной ткани без какой-либо адгезии. Композиты из клеток и матрицы показали отчетливое формирование твердой ткани *in vivo*, однако не наблюдалось признаков врастания ткани. Далее, комбинация нГА в матрице позволила регулировать экспрессию специфических одонтогенных генов. В заключение, включение нГА в нановолокна действительно увеличило дифференциацию СКПЗ в сторону остеобластоподобного фенотипа *in vitro* и *in vivo* [19].

Титан обладает высокой биосовместимостью и прочностью. Эти свойства определили самое широкое использование титана для костной регенерации и в дентальной имплантации [20, 21].

Несмотря на неспособность к резорбции пористые и волокнистые матричные конструкции из титана обладают большим потенциалом в отношении инженерии твердых тканей. Титановая волокнистая сетка поддерживает дифференциацию СКПЗ и способствует процессу кальцификации *in vitro* [22]. Кроме того, было также подтверждено успешное применение такой матрицы *in vivo* [23].

Альтернативой применению синтетических матричных материалов является использование трехмерных культур в комбинации с эндогенным внеклеточным матриксом. Недавно была разработана система безматричной культуры под назва-

нием «инженерия клеточных гранул» (cell-pellet engineering) [24]. Система предполагает образование гранул или конгломератов клеток, что обеспечивает пространственное взаимодействие между соседними клетками, которое приводит к синтезу внеклеточного матрикса в грануле [25].

Также, Zhang и соавт. изучали *in vitro* и *in vivo* поведение стволовых клеток пульпы зуба человека (СКПЗ), полученных из ретинированных третьих моляров, высаженных на различные трехмерные (3D) матрицы из различных материалов: губчатый коллаген, пористая керамика и титановая волокнистая сетка.

Заполненные СКПЗ матрицы были разделены на две группы. В первой группе клетки *in vitro* были внесены в средство остеогенной дифференциации на четыре недели. Во второй группе образцы имплантировали подкожно мышам на срок от 6 до 12 недель. Образцы, выращенные *in vitro*, анализировали с помощью сканирующей электронной микроскопии и RT-PCR на наличие сиалофосфопротеина дентина (СФПД). Образцы *in vivo* изучали гистологически, клетки показали выраженное депонирование минерализованного внеклеточного матрикса с формированием СФПД во всех материалах. Эксперимент по немедленной имплантации показал формирование ткани, которая была СФПД-положительная у всех трех матричных материалов. Однако у всех трех материалов ткань образовывалась в большей степени соединительная, нежели дентиноподобная. Ограниченная кальцификация внеклеточного матрикса наблюдалась только у керамики. В обоих экспериментах никаких дополнительных различий между тремя материалами обнаружено не было. В заключение можно сказать, что необходимы дальнейшие исследования *in vivo* поведения СКПЗ и взаимодействия их с трехмерными матричными материалами, без чего невозможно их успешное использование в клинической практике [26].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ НАХОДИТСЯ В РЕДАКЦИИ

Поступила 10.11.2010

Координаты для связи
с автором:
osolovieva@list.ru