УДК 616.314.17-008.1-031.81-085:616-003.93

О.С. Лисенко[1], А.В. Борисенко[1], Д.О. Зубов[2, 3], Р.Г. Васильєв[2, 3]

Оцінка цитотоксичності біокераміки, легованої іонами срібла й міді, у культурі мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини людини

[1]Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, м. Київ, Україна
[2]ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», м. Київ, Україна
[3]Біотехнологічна лабораторія «ilaya.regeneration», медична компанія «ilaya», м. Київ, Україна

Мета: вивчення біосумісності та цитотоксичних властивостей біоактивного керамічного композиту (БКК), насиченого комбінацією іонів міді та срібла, у культурі мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини (ММСК-ЖТ) людини *in vitro*.

Матеріали та методи. Під час синтезу гранули біокерамічного композиту додатково легуються у співвідношенні 2:1 комбінацією іонів срібла й міді в межах 2 та 1 ат.% відповідно. Для вивчення біосумісності отриманих зразків БКК проведені тести прямої та непрямої цитотоксичності згідно із критеріями ISO 10993 в культурі ММСК-ЖТ 3-го пасажу. Використовувались методи фазово-контрастної та флуоресцентної мікроскопії, статистичного аналізу.

Результати. Установлено, що 20 % екстракти зразків модифікованої біокераміки значуще не впливали на проліферацію клітин у межах 1 ат.% Ag^+ та 0,5 ат.% Cu^{2+}. Між тим гранули зразків БКК, починаючи з цієї ж концентрації срібла й міді, у прямому тесті викликали загибель клітин у культурі. Метод вітального фарбування клітин флуоресцеїном діацетатом і флуоресцентної мікроскопії підтверджує адгезію ММСК-ЖТ до поверхні гранул модифікованої біокераміки.

Висновки. Біокерамічний композит вибраного складу, легований комбінацією іонів срібла й міді в межах 0,5 та 0,25 ат.% відповідно, не проявляє цитотоксичний вплив і не перешкоджає адгезії ММСК-ЖТ.

Ключові слова: біокерамічний композит, кісткова імплантація, іони срібла й міді, непряма та пряма цитотоксичність, мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини.

Останнім часом відмічається підвищений інтерес до біокерамічних матеріалів з мультифункціональними властивостями, що використовують для кісткової пластики, у тому числі й у стоматологічній практиці. Сучасні технологічні можливості дозволяють модифікувати класичні кераміки на основі фосфату кальцію з метою покращити їх біоактивність і біорезорбційні показники. Створення макро- та мікропористості, структуризація елементів кераміки на нанорівні, введення додаткових органічних і неорганічних компонентів є одним з можливих варіантів.

Модифікації керамічних біоматеріалів, які базуються на введенні деяких білкових факторів (BMP – кістковий морфогенетичний білок, VEGF – ендотеліальний фактор росту судин, RANKL – ліганд рецептора активатора ядерного фактора капа-В, фібронектин), підтвердили свою біостимулюючу ефективність. Проте для отримання керамічно-білкових композитів необхідні складні, високовартісні технології та тривалий час виготовлення. Альтернативою може бути модифікування керамік шляхом насичення біологічно активними іонам металів, введеними в низьких концентраціях.

Додаткове введення іонів цинку, міді та срібла у структуру біокерамік та інших синтетичних біоматеріалів надає їм раніше непритаманну антибактеріальну активність [1, 2, 3]. Проте існують дані і про значну токсичність сполук срібла й міді на організм людини [4]. Є свідчення про високу токсичність у наностані навіть тих речовин, які при дії частинок мікрометрового діапазону виступають відносно біологічно інертними [5]. Указується і про більшу цитотоксичність наночасток Ag_2O порівняно з наночастками CuO [6].

Досліджено, що нанорозмірний гідроксиапатит, у структурі котрого відбулось катіонне заміщення кальцію сріблом у кількості 0,5–1,5 ат.%, поряд з антибактеріальною дією на *Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus* не перешкоджав адгезії остеобластів до своєї поверхні *in vitro* [7]. Проте концентрація 0,5 ат.% срібла визначена як оптимальна, що забезпечує не тільки адгезію, а і проліферацію остеогенних клітин. Гідроксиапатитна кераміка, легована іонами срібла в межах 0,5–2 мас.% з рівномірним і градієнтним розподілом, розміщуючись у культурі клітин кісткового мозку та мезенхімальних клітин, не гальмувала їх проліферацію за сім днів дослідження [8].

C. Balagna et al. (2011) продемонстрували, що срібловмісне біоактивне скло пригнічує проліферацію та диференціацію остеобластних клітин (лінія MG-63) через чотири доби культивування порівняно з нелегованим біосклом. Дослідники засвідчили, що накопичення іонів викликає загибель клітин і гальмує їх проліферацію [9].

Результати досліджень P.J. Newby et al. (2011) указують, що вищі концентрації іонів Ag^+, введені у склад каркасів з біоактивного скла, понижують кількість прикріплених остеобластних клітин через один тиждень культивування, однак мертвих клітин при цьому не спостерігають [10].

Значна кількість мікроелементів відіграє важливу роль у біохімічному обміні клітин в якості синтезу та експресії остеогенних білків, факторів місцевої ішемії. Із цієї точки зору C. Wu et al. [11, 12, 13] обґрунтовували наявність у складі склокерамічних систем іонів кобальту, бору та магнію. Зокрема, бівалентна мідь, між іншим,

відома істотним впливом на ангіогенез і формування кістки. Мідь розглядають як життєво необхідний, так званий ессенціальний мікроелемент. Вона виступає кофактором більш ніж тридцяти ензимних систем у живих організмах, забезпечуючи численні процеси життєдіяльності організму і його стійкості до бактеріальних інфекцій та інвазій. Мідь порівняно зі сріблом має менш виражені антисептичні властивості, але разом з тим значно посилює дію препаратів срібла [6, 14].

Більшість іонів міді у плазмі крові фіксуються церуплазміном, нестача якого призводить до перевантаження залізом таких органів, як головний мозок і печінка. Мідь – важливий компонент багатьох металоензимоподібних лизилооксидаз, за допомогою яких відбувається зшивання лізину та гідроксипроліну у структурі колагену. Комплекс Cu^{2+} із гліцин-гістидин-лізин-трипептидом як демонструє ангіогенну активність, так і стимулює ріст клітин попередників остеобластів in vivo. Зазначається також, що мідь сприяє синтезу колагену, проліферації та диференціації людських мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК), стимулює ангіогенез [15, 16]. Відомо, що дефіцит іонів міді викликає потоншення та дестабілізацію кісткової тканини завдяки зниженню остеогенного потенціалу, викликаючи зниження міцності кісток.

Однак значно менша кількість даних дозволяє судити про вплив неорганічної міді, що виділяються з біоматеріалів.

Зокрема, статистично істотне ($p < 0,01$) підвищення судинної щільності в гістоморфометричному дослідженні помічено при використанні гідрогелю на основі 50 % гіалуронової кислоти з іонами міді та при комбінації з ліофілізованим алоімплантатом кістки при введенні у м'які тканини [17].

Мідьвмісний мезопористий каркас на основі біоактивного скла демонстрував мультифункціональні властивості: ангіогенні, здатність до остеостимуляції та антибактеріальної активності in vitro [18]. Легування біоскла іонами Cu^{2+} в межах 1–5 мол.% не демонструвало цитотоксичних ефектів на клітини людини разом з концентраційно-залежним підвищенням інших біологічних якостей.

Макропористий і біорезорбуючий каркас із брушитного цементу, виготовлений шляхом 3D-друкування з порошку, насиченого сульфатом міді низької концентрації [19], впливав на ріст та активність остеобластних клітин, засіяних на поверхню матеріалу. Імунофлуоресцентний метод підтвердив секрецію деяких білків лінією остеобластних клітин лінії MG-63, опосередкованої присутністю міді, котра демонструвала активність і проліферацію клітин через десять діб спостереження. Особливо ефективним виявилось насичення брушитного цементу з концентрацією Cu(II) у межах 5,65–0,56 мкг/см^2. Брушит, насичений Cu(II) у концентрації 5,65 мкг/см^2, істотно підвищував ($p < 0,05$) на 72 % активність клітин та їх кількість на 55 % у концентрації 0,56 мкг/см^2 порівняно з матеріалом без міді.

Є повідомлення про сприятливий вплив модифікованого кальцій-фосфатного цементу з іонами Cu^{2+} на васкуляризацію макропор матеріалу *in vivo* [20]. Проте існують дані і про зниження остеогенної диференціації ММСК після 14-ти діб культивування [21] на поверхні кісткових імплантатів з міддю в межах 0,05–0,1 мМ. Отже, залишається актуальним подальше вивчення реакції клітин-попередників остеобластів на присутність сполук міді.

Щодо можливості модифікацій, не є винятком і вітчизняний біоактивний керамічний композит «Синтекість» (БКК), виробник – ТОВ «Промтехрезерв», Україна [22], що використовують у кістковій пластиці. Він представляє собою поєднання наноструктурованої кальцій-фосфатної та склокристалічної кераміки. Виробник запропоновав додаткове легування гранул матеріалу комбінацією іонів срібла й міді, яке розширює їх біологічні властивості (надає антимікробну та остеостимулюючу активність тощо).

Ураховуючи суперечливість даних про цитотоксичність біоматеріалів різного походження, модифікованих додатковим легуванням іонами металів, ***метою*** даного дослідження стало вивчення біосумісності та цитотоксичних властивостей БКК, насиченого комбінацією іонів міді та срібла різної концентрації, *in vitro*. Установлення залежності цих властивостей від концентрації зазначених іонів металів у складі кераміки та можливості даного остеопластичного матеріалу виступати в якості носія для ММСК із жирової тканини людини (ММСК-ЖТ) при виготовленні тканинно-інженерних конструкцій. Під ММСК людини розуміється субстрат-залежна фракція клітин зі строми будь-якої сполучної тканини, що відповідає критеріям, запропонованим M. Dominici et al. у 2006 році [23].

Матеріали та методи дослідження

Для даного дослідження була використана модифікація БКК, що представляє собою мікропористі гранули розміром від 300 до 1000 мкм. Ці гранули складаються з рівномірно розподілених наноструктурованих кристалів (величиною 30–50 нм) гідроксиапатит-трикальційфосфатної кераміки та склокристалічних фаз вибраного складу (ГА-ТКФ-СКФ). Останні отримані шляхом фазового перетворення нестехіометричного гідроксиапатиту та ситалів, легованих іонами срібла й міді, в атомному відношенні 2:1 у кількості від 0,1 до 10 ат.%. З метою легування сріблом і міддю синтезовані гранули БКК обробляли при кип'ятінні відповідною кількістю розчинів нітрату срібла (0,1–10 %) та міді (0,05–5 %) з наступним висушуванням при температурі 120°С та термічною обробкою при 600-700°С. Це призводить до повного розкладання нітратів срібла й міді, видалення оксидів азоту,

Таблиця 1

Зразки біоактивного керамічного композиту

Зразок БКК	Склад зразка	Концентрація легуючих елементів, іонів (в атомних %)	
		срібла (Ag^+)	міді (Cu^{2+})
1	ГА-ТКФ-СКФ	без додаткових легуючих елементів	
2		2	1
3		1	0,5
4		0,5	0,25
5		0,1	0,05

Таблиця 2

Експериментальні групи та методи оцінки цитотоксичності зразків БКК

Групи/тести	Непрямий	Прямий (100 мг матеріалу)
Гр. 1 (n = 3) контрольна, лише клітини	культивовані ММСК-ЖТ	культивовані ММСК-ЖТ
Гр. 2 (n = 3) контрольна, БКК 1 + клітини	20 % екстракт (БКК 1) + ММСК-ЖТ	гранули БКК 1 + ММСК-ЖТ
Гр. 3 (n = 3) БКК 2 + клітини	20 % екстракт (БКК 2) + ММСК-ЖТ	гранули БКК 2 + ММСК-ЖТ
Гр. 4 (n = 3) БКК 3 + клітини	20 % екстракт (БКК 3) + ММСК-ЖТ	гранули БКК 3 + ММСК-ЖТ
Гр. 5 (n = 3) БКК 4 + клітини	20 % екстракт (БКК 4) + ММСК-ЖТ	гранули БКК 4 + ММСК-ЖТ
Гр. 6 (n = 3) БКК 5+ клітини	20 % екстракт (БКК 5) + ММСК-ЖТ	гранули БКК 5 + ММСК-ЖТ

а також твердофазної дифузії, унаслідок чого атоми срібла й міді вбудовуються у кристалічну структуру гідроксиапатиту та ситалу, займаючи місця іонів Ca^{2+}. Частково вони фіксуються на поверхні матеріалу або його пор у вигляді кластерів, що складаються з атомів срібла ц міді.

При цій схемі синтезу отримано такі зразки БКК вибраного складу з різними комбінаціями легуючих елементів (табл. 1). Гранули зразків кераміки розфасовувались по окремих пакетах і були готові до використання.

Біосумісність зразків біокераміки in vitro оцінювали згідно із критеріями ISO 10993 за рахунок вивчення прямої та непрямої цитотоксичності синтезованих гранул матеріалу в культурі клітин ММСК-ЖТ [24]. У непрямому тесті вивчався вплив екстрактів зразків БКК на клітини. При визначенні прямої цитотоксичності вивчали безпосередню дію гранул матеріалу, що контактують із клітинною культурою.

Тест на непряму цитотоксичність з використанням екстрактів зразків біоактивного керамічного композиту. Кожний зразок БКК попередньо стерилізували сухим жаром протягом 60 хв. за 180°С та в кількості 100 мг/лун. розміщували в лунках 6-лункової плашки (Costar, США). Далі в кожну лунку зі зразками БКК заливали ростове середовище такого складу: DMEM:F12 (Sigma-Aldrich, США), 10 % ембріональної телячої сироватки (Sigma-Aldrich, США), по 100 МО/мл пеніциліну та стрептоміцину (Дарниця, Україна), 2 мМ *L*-глутаміну (Sigma-Aldrich, США) та витримували в CO_2-інкубаторі (Binder, Німеччина) протягом 24-х годин при 37°С і 5 % атмосфері CO_2 для отримання добового екстракту БКК. При цьому паралельно оцінювали наявність можливого негативного впливу складових зразків БКК (нефізіологічно лужні/кислі) на *pH*-залежну зміну кольору ростового середовища, що містить феноловий червоний барвник (червоний при фізіологічному значенні *pH* 7,2–7,4), або в лужний бік (фіолетовий колір), або в кислий бік – жовтий колір. Далі за добу екстракти БКК з лунок відбирали й у кількості 20 % додавали до свіжого ростового середовища того самого складу. Культивовані ММСК-ЖТ людини 3-го пасажу засівалися в кількості $3{,}0\times10^4$/лун./екстракт зі зразка БКК з ростовим середовищем за такою схемою: по три лунки із $3{,}0\times10^4$ ММСК-ЖТ на кожний екстракт зі зразка БКК (усього 15 лунок) та три лунки з контрольною культурою клітин (табл. 2).

Тест на пряму цитотоксичність зразків біоактивного керамічного композиту. Кожний зразок БКК попередньо стерилізували сухим жаром протягом 60 хв. при 180°С та в кількості 100 мг/лун., поміщали в лунки 6-лункової плашки (Costar, США) та заливали кожну лунку зі зразком БКК ростовим середовищем, що містило культивовані ММСК-ЖТ людини 3-го пасажу в кількості $3{,}0\times10^4$/лун./зразок БКК за такою схемою: по три лунки із $3{,}0\times10^4$ ММСК-ЖТ на кожний зразок БКК (усього 15 лунок) та три лунки з контрольною культурою клітин (див. табл. 2). Засіяні таким чином плашки залишали в CO_2-інкубаторі (Binder, Німеччина) протягом трьох діб при 37°С і 5 % атмосфері CO_2.

Вітальне фарбування клітинної культури флуоресцеїн діацетатом. Для візуалізації клітин на оптично щільних гранулах зразків БКК застосовували метод прижиттєвого фарбування суспензії клітин розчином флуоресцеїна діацетата – fluorescein diacetate, FDA (Sigma-Aldrich, США) в ростовому середовищі протягом 5 хв. при кімнатній температурі в кількості 1 мл робочого розчину (5 мкмоль/л) барвника на лунку, далі розчин зливали, культуру промивали та залишали у фосфатно-сольовому буфері (PAA, Австрія) й негайно розглядали в мікроскопі. Життєздатні клітини визначалися за фібробластоїдною морфологією й зеленим флуоресцентним світінням при I_{ex} = 450–490 нм, I_{em} = 520 нм (*filter set 09*, Karl Zeiss, Німеччина).

Візуалізацію (методами інвертованої мікроскопії у світлі, що проходить, фазово-контрастної та флуоресцентної мікроскопії) *і фотодокументування культур клітин* проводили за допомогою інвертованого флуоресцентного мікроскопу «AxioObserver.A1» ПЗ з обробкою зображення ZEN lite 2011 (blue edition) і цифрової камери «AxioCam ERc 5s» (Karl Zeiss, Німеччина). Клітинні культури мікроскопували при 100-разовому збільшенні. При цьому на третю добу підраховували загальну кількість життєздатних і мертвих клітин у кожній лунці з відповідної групи за допомогою камери Горяєва.

Методи статистичної обробки результатів включали оцінку кількісних характеристик випадкових величин чисельності клітин у лунках, що представлені у вигляді середніх значень, і стандартних помилок середніх значень, за допомогою варіаційного та дисперсного аналізу. Значимість розбіжностей показників оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення

Проведені дослідження продемонстрували, що в контрольній групі 1 (за відсутності гранул біокераміки) на третю добу культивування кількість клітин у культурі збільшувалась майже в 1,5 разу.

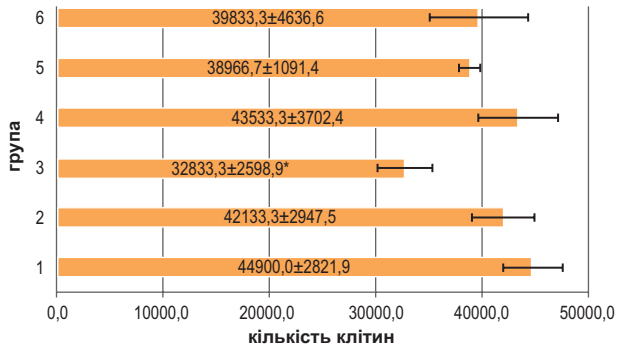


Рис. 1. Діаграма результатів визначення проліферативної активності ММСК-ЖТ людини при оцінці непрямої цитотоксичності екстрактів зразків БКК, третя доба.
* – вірогідність відмінностей (p) < 0,05 порівняно з контрольною групою 1.

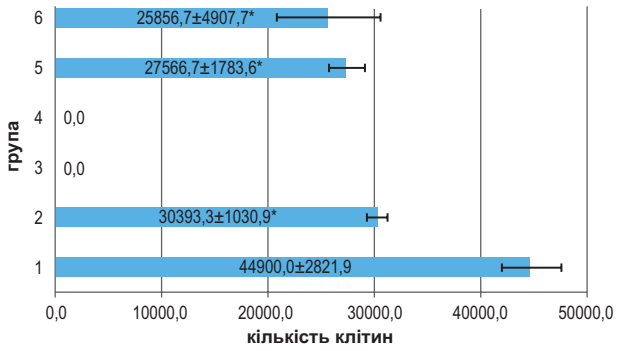


Рис. 2. Діаграма результатів визначення проліферативної активності ММСК-ЖТ людини при оцінці прямої цитотоксичності зразків БКК, третя доба.
* – вірогідність відмінностей (p) < 0,01 порівняно з групою 1.

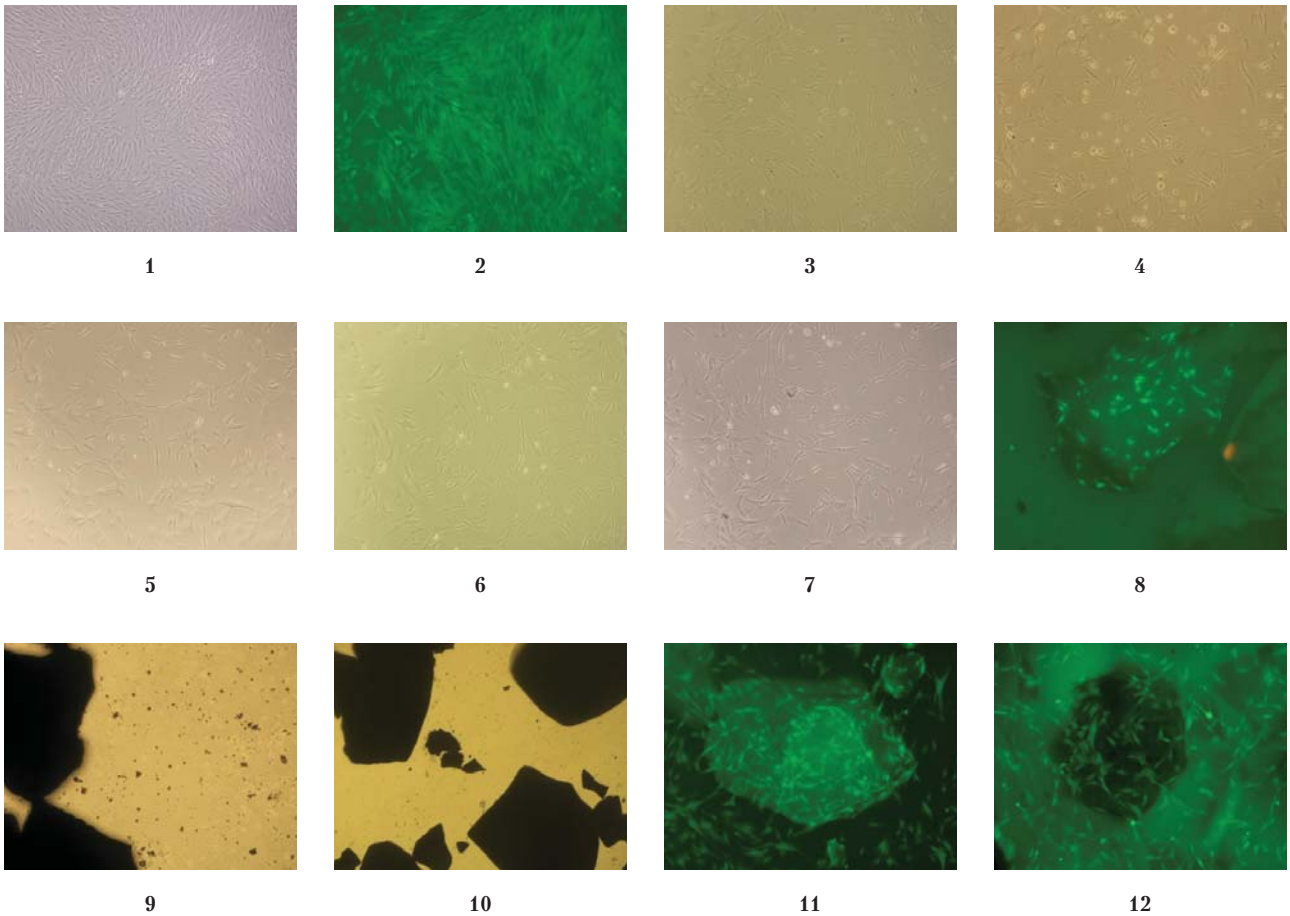


Рис. 3. Мікрофотознімки культур ММСК-ЖТ людини 3-го пасажу – оцінка цитотоксичності зразків БКК за непрямим (екстракти) і прямим методами (3-тя доба інкубації; зб. ×100; флуоресцентна мікроскопія – вітальне фарбування флуоресцеїном діацетатом):

1 – ММСК-ЖТ, моношар, нативний препарат – фазово-контрастна мікроскопія;
2 – ММСК-ЖТ, моношар;
3 – ММСК-ЖТ із 20% екстрактом БКК 1, нативний препарат – фазово-контрастна мікроскопія;
4 – ММСК-ЖТ з 20% екстрактом БКК 2, нативний препарат – фазово-контрастна мікроскопія;
5 – ММСК-ЖТ із 20 % екстрактом БКК 3, нативний препарат – фазово-контрастна мікроскопія;
6 – ММСК-ЖТ із 20 % екстрактом БКК 4, нативний препарат – фазово-контрастна мікроскопія;
7 – ММСК-ЖТ із 20 % екстрактом БКК 5, нативний препарат – фазово-контрастна мікроскопія;
8 – ММСК-ЖТ із гранулами БКК 1;
9 – ММСК-ЖТ із гранулами БКК 2, нативний препарат;
10 – ММСК-ЖТ із гранулами БКК 3, нативний препарат;
11 – ММСК-ЖТ із гранулами БКК 4;
12 – ММСК-ЖТ із гранулами БКК 5.

Керамічний композит без іонів срібла та міді (контрольна група 2) не мав цитотоксичних властивостей – істотно не пригнічував ні адгезію, ні проліферацію ММСК-ЖТ. При цьому дифузія в ростове середовище його компонентів не впливала на зміну *pH* і створення інших неадекватних умов інкубації. Було виявлено, що ні один зі зразків БКК не змінював фізіологічного значення *pH* ростового середовища протягом доби інкубації. Проте його модифікації в залежності від концентрації іонів срібла й міді проявляли різні цитотоксичні властивості при непрямому та прямому методі визначення.

При непрямому тестуванні (рис. 1) визначення цитотоксичності всі досліджувані зразки біоактивного керамічного композиту не впливали негативно на виживання та проліферацію клітин. Екстракти зразків гранул біокераміки, легованих іонами срібла й міді в межах 2 ат.% та 1 ат.%, не призводили до загибелі клітин на третю добу культивування. Хоча за наявності екстракту із групи 3 (з найбільшою концентрацією іонів срібла й міді) спостерігалась тенденція до зменшення кількості клітин, чим істотно ($p < 0,05$) відрізнялась від інших груп. Між тим у групі 4 (БКК, легований 1 ат.% срібла та 0,5 ат.% міді) проліферація ММСК-ЖТ клітин була максимальною і практично не відрізнялась від показників контрольної групи 1.

При прямому тесті (рис. 2) цитотоксична дія модифікованої кераміки при її безпосередньому контакті із клітинами зростала, звужуючи цитосумісний діапазон концентрації іонів срібла й міді. У межах концентрації іонів 0,5 ат.% срібла та 0,25 ат.% міді керамічні гранули не перешкоджали життєдіяльності клітин у культурах, однак і не стимулювали їх проліферацію (група 5). Хоча проліферація клітин і знижувалася за наявності біокераміки порівняно з контрольною групою 1, статистично істотних змін кількості клітин у лунках зі зразками групи 5 і 6 на третю добу не спостерігали ($p > 0,05$), порівнюючи їх зі зразком БКК без іонів срібла й міді (група 2). Слід також відзначити й механічну втрату клітин з моношару (злущування), зумовлену перекачуванням гранул БКК в лунках із клітинами при транспортуванні плашок, що не пов'язано з цитотоксичністю зразків, зокрема у групі 2. Однак у групах 3 й 4 в ці ж строки спостереження визначалась цілковита загибель клітин, що демонструє виражену пряму цитотоксичність зразків БКК із груп 3 й 4.

Отримані дані можна співставити з іншими подібними дослідженнями. Підтверджуються факти відсутності цитотоксичного впливу іонів срібла й міді у складі кераміки на клітини людського організму за збереження антибактеріальної дії, проте лише за незначної концентрації цих легуючих агентів. Установлено, що при однакових концентрацях кераміка з комбінацією іонів срібла й міді проявляє більш виражену цитотоксичну дію порівняно з керамікою, у складі котрої присутні лише іони срібла або міді. Між тим саме за рахунок комбінації іонів срібла й міді підсилюються їх антимікробні властивості [7, 14] і створюються передумови для остео- та ангіогенної активності.

Оптимальною виявилася концентрація іонів срібла й міді в біокераміці, синтезованої запропонованим методом, у межах 0,5 ат.% срібла та 0,25 ат.% міді. Оскільки дана модифікація біокераміки не перешкоджає адгезії та проліферації ММСК-ЖТ людини, її можна розглядати в якості клітинного носія для імплантації в кісткову тканину (рис. 3).

Висновки

Дані, отримані в результаті проведених досліджень, дають певні підстави рекомендувати клінічне застосування вітчизняного біокерамічного композиту, легованого комбінацією іонів срібла й міді в межах відповідно 0,5 і 0,25 ат.%. Остання модифікація забезпечує не тільки остеокондуктивні, ангіогенні та антимікробні властивості [14, 18], а й можливість створення певної остеоіндуктивної дії. Вибраний зразок БКК може виступати в якості потенційного носія культивованих ММСК людини з метою регенеративної та реконструктивно-відновної хірургії.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jaiswal S. Preparation and rapid analysis of antibacterial silver, copper and zinc doped sol-gel surfaces / S. Jaiswal, P. McHale, B. Duffy // Colloids Surf. B. Biointerfaces. – 2012. – Vol. 94. – P. 170–176.

2. In vitro assessment of antibacterial activity and cytocompatibility of silver-containing PHBV nanofibrous scaffolds for tissue engineering / Z.C. Xing, W.P. Chae, J.Y. Baek et al. // Biomacromolecules. – 2010. – Vol. 11. – P. 1248–1253.

3. Цинк-, серебросодержащие гидроксиапатиты: синтез и свойства / И.В. Фадеева, Н.В. Бакунова, В.С. Комлев и др. // Доклады академии наук. – Т. 442, № 6. – 2012. – С. 780–783.

4. Ершов Ю.А. Механизмы токсического действия неорганических соединений: монография / Ю.А. Ершов, Т.В. Плетнева. – М.: Медицина, 1989. – 272 с.

5. Глущенко Н.Н. Токсичность наночастиц цинка и его биологические свойства / Н.Н. Глущенко, А.В. Скальный // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2010. – № 3, (21). – С. 118–121.

6. Структура, свойства и токсичность наночастиц оксидов серебра и меди / И.Н. Андрусишина, И.А. Голуб, Г.Г. Дидикин и др. // Биотехнология. – 2011. – Т. 4, № 6. – С. 51–59.

7. Antibacterial nanosized silver substituted hydroxyapatite : Synthesis and characterization / N. Rameshbabu, K.T.S. Sampath, T.G. Prabhakar et al. // J. Biomed. Mater. Res. – 2007. – Vol. 80, A. – P. 581–591.

8. Фархан М.М. Застосування гідроксилапатитної кераміки, збагаченої іонами срібла, для пластики кісткових порожнин (експериментально-клінічне дослідження): Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.21 / Фархан М.М.; Ін-т патології хребта та суглобів ім. М.І. Ситенка АМН України. – Х., 2001. – 20 с.

9. Biocompatibility and antibacterial effect of silver doped 3D-glass-ceramic scaffolds for bone grafting / C. Balagna, C. Vitale-Brovarone, M. Miola et al. // Journal Biomater. Appl. – 2011. – Vol. 25, № 6. – P. 595–617.

10. Ag-doped 45S5 Bioglass-based bone scaffolds by molten salt ion exchange : processing and characterization / P.J. Newby, R. El-Gendy, J. Kirkham et al. // J. Mater. Sci.: Mater. Med. – 2011. – Vol. 22, № 3. – P. 557–569.

11. Hypoxia-mimicking mesoporous bioactive glass scaffolds with controllable cobalt ion release for bone tissue engineering / C. Wu, Y. Zhou, W. Fan et al. // Biomaterials. – 2012. – Vol. 33, № 7. – P. 2076–2085.

12. Proliferation, differentiation and gene expression of osteoblasts in boron-containing associated with dexamethasone deliver from mesoporous bioactive glass scaffolds / C. Wu, R. Miron, A. Sculeaan et al. // Biomaterials. – 2011. – Vol. 32, № 29. – P. 7068–7078.

13. Magnetic mesoporous bioactive glass scaffolds with hierarchical pore structure and multifunction / C. Wu, W. Fan, Y. Zhu et al. // Acta Biomater. – 2011. – Vol. 7, № 10. – P. 3563–3572.

14. Борисенко А.В. Антимікробні властивості біоактивного керамічного композиту «Синтекість», збагаченого іонами срібла та міді / А.В. Борисенко, О.С. Лисенко // Современная стоматология. – 2013. – № 4. – С. 30–35.

15. The stimulation of angiogenesis and collagen deposition by copper / C. Gerard, L.J. Bordeleau, J. Barralet, C.J. Doillon // Biomaterials. – 2010. – Vol. 31, № 5. – P. 824–831.

16. Rodriguez J.P. Modulation of the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells by copper / J.P. Rodriguez, S. Rios, M. Gonzalez // J. Cell. Biochem. – 2002. – Vol. 85, № 1. – P. 92–100.

17. Giavaresi G. Blood vessel formation after soft-tissue implantation of hyaluronan based hydrogel supplemented with copper ions / G. Giavaresi, P. Torricellia, P.M. Fornasari // Biomaterials. – 2005. – Vol. 26. – P. 3001–3008.

18. Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity / W. Chengtie,

Z. Yinghong, X. Mengchi et al. // Biomaterials. – 2013. – Vol. 34, № 2. – P. 422–433.

19. The effect of Cu(II)-loaded brushite scaffolds on growth and activity of osteoblastic cells / A. Ewald, C. Кдppel, E. Vorndran et al. // J. Biomed. Mater. Res. Part A. – 2012. – Vol. 100, A. – P. 2392–2400.

20. Angiogenesis in calcium phosphate scaffolds by inorganic copper ion release / J. Barralet, U. Gbureck, P. Habibovic et al. // Tissue Eng. Part A. – 2009. – Vol. 15, № 7. – P. 1601–1609.

21. A dual role of Copper on the surfaces of bone implants / F. Lьthen, C. Bergemann, U. Bulnheim et al. // Mat. Sci. Forum. – 2010. – Vols. 638-642. – P. 600–605.

22. Біоактивний керамічний композит для відновлення кісткової тканини «Синтекість» / ТУ У 33.1-31280163–001:2005. Виробник: ТОВ «Промтехрезерв» (м. Київ) // Свідоцтво про державну реєстрацію № 3653/2005.

23. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller et al. // Cytotherapy. – 2006. – Vol. 8, № 4. – P. 315–317.

24. International Organization for Standardization (ISO). Biological Evaluation of Medical Devices, ISO 10993 - Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity; International Organization for Standardization: Geneve, Switzerland, 2009.

Оценка цитотоксичности биокерамики, легированной ионами серебра и меди, в культуре мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека

А.С. Лысенко, А.В. Борисенко, Д.А. Зубов, Р.Г. Васильев

Цель: изучение биосовместимости и цитотоксических свойств биоактивного керамического композита (БКК), насыщенного комбинацией ионов меди и серебра, в культуре мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани (ММСК-ЖТ) человека *in vitro*.

Материалы и методы. Гранулы биокерамического композита при синтезе дополнительно легируются в соотношении 2:1 комбинацией ионов серебра и меди в пределах 2 и 1 ат.% соответственно. Для изучения биосовместимости полученных образцов БКК проведены тесты определения прямой и непрямой цитотоксичности согласно критериев ISO 10993 в культуре ММСК-ЖТ 3-го пассажа. Использовались методы фазово-контрастной и флюоресцентной микроскопии, статистического анализа.

Результаты. Установлено, что 20 % экстракты образцов модифицированной керамики существенно не влияли на пролиферацию клеток в пределах 1 ат.% Ag^{+} и 0,5 ат.% Cu^{2+}. Между тем гранулы образцов БКК, начиная с этой же концентрации серебра и меди, при прямом тесте вызывали гибель клеток в культуре. При помощи метода витальной окраски клеток флюоресцентным диацетатом и флюоресцентной микроскопии подтверждена адгезия ММСК-ЖТ к гранулам модифицированной биокерамики.

Выводы. Биокерамический композит выбранного состава, легированный комбинацией ионов серебра и меди в пределах 0,5 и 0,25 ат.% соответственно, не проявляет цитотоксическое влияние и не препятствует адгезии ММСК-ЖТ.

Ключевые слова: биокерамический композит, костная имплантация, ионы серебра и меди, непрямая и прямая цитотоксичность, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки.

The cytotoxicity examination for silver and copper ion's doped bioceramics in human adipose-derived mesenchymal stromal cell culture

O. Lysenko, A. Borysenko, D. Zubov, R. Vasyliev

Aim: to investigate a biocompatibility and cytotoxic properties of the bioactive ceramic composite (BCC) doped with copper and silver ion's combination in human adipose-derived mesenchymal stromal cell (MCSs) culture *in vitro*.

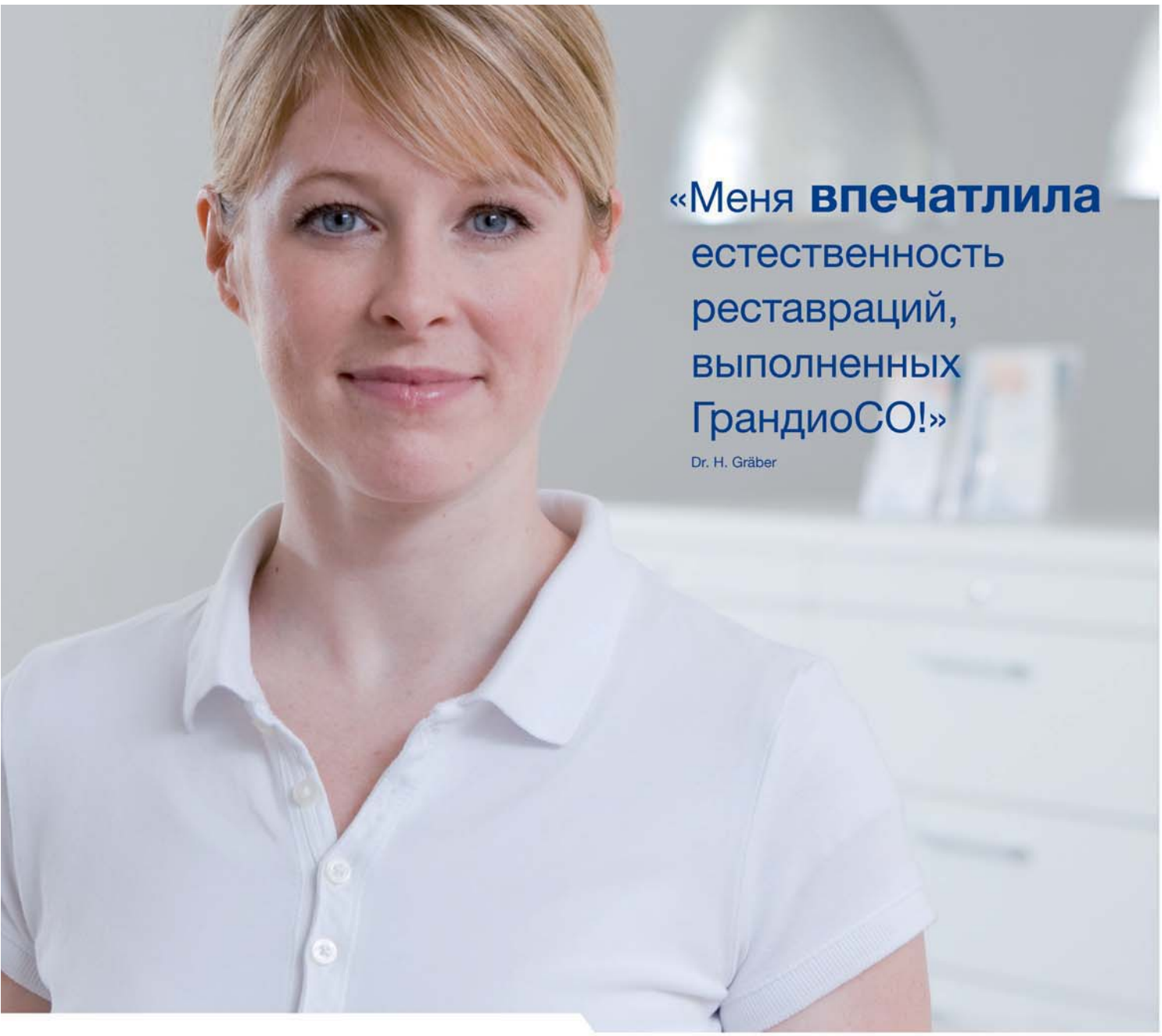
Materials and methods. During a synthesis, the bioceramic composite granules were doped additionally with silver and copper ion's combination at 2:1 ratio within 2 at.% and 1 at.% range accordingly. To investigate the biocompatibility of BCC samples, the indirect and direct cytotoxicity tests according to ISO 10993 criteria have been conducted in P3 MCSs culture. Phase contrast, fluorescence microscopy and statistical analysis have been used.

Results. It was determined, 20 % extracts of modified ceramic samples had no significant effect on cell proliferation within 1 at.% Ag^{+} and 0.5 at.% Cu^{2+} range. Meanwhile, the BCC sample's granules in such ion concentration in direct cytotoxicity test caused cell death in culture. By vital fluorescein diacetate (FDA) staining and fluorescence microscopy it was confirmed the adhesion of MSCs to the modified bioceramic's granules.

Conclusions. Selected bioceramic composite doped with a combination of silver and copper ions within 0.5 at.% and 0.25 at.% range respectively does not exhibit cytotoxic effect and does not inhibit MSCs adhesion.

Key word: bioceramic composite, bone grafting, silver and copper ions, indirect and direct cytotoxicity, multipotent mesenchymal stromal cells.

Лисенко Олександр Сергійович *– аспірант кафедри терапевтичної стоматології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.*
Адреса: *04119, м. Київ, вул. Зоологічна, 1.*
Тел.: *(044) 483-13-20.*
E-mail: *dr.alex.lysenko@gmail.com*
Анатолій Васильович Борисенко *– д-р мед. наук, проф.; завідувач кафедри терапевтичної стоматології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.*
Адреса: *04119, м. Київ, вул. Зоологічна, 1.*
Зубов Дмитро Олександрович *– канд. біол. наук; ст. н. с. лабораторії імунології відділу клітинних та тканинних технологій ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України".*
Адреса: *04114, м. Київ, вул. Вишгородська, 67.*
Васильєв Роман Геннадійович *– н. с. лабораторії експериментального моделювання відділу клітинних та тканинних технологій ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України".*
Адреса: *04114, м. Київ, вул. Вишгородська, 67.*



БЛИЖЕ ВСЕГО К ЗУБУ

GrandioSO

Благодаря комплексному сочетанию физических свойств ГрандиоСО имеет самые приближенные к тканям зуба характеристики.* Для Вас это означает: долговечные, надежные реставрации и, самое главное, довольные пациенты.

- Универсальное применение, удовлетворение самых высоких требований к эстетике во фронтальном и боковом участке
- Естественная опаковость и получение превосходных результатов с помощью лишь одного оттенка
- Разумная шкала с введением новых рациональных оттенков GA3.25 и GA5
- Пластичная консистенция, высокая устойчивость к свету, простая полировка с быстрым достижением блестящей поверхности

Официальные дистрибьюторы в Украине:
Дентал депо Запорожье · Медсервис · Меридиан · Вершина-Дент · Оксия · Стамил · Усмішка

* Запрашивайте научную информацию о наших материалах.

VOCO
THE DENTALISTS

VOCO GmbH · Anton-Flettner-Straße 1-3 · 27472 Cuxhaven · Германия · Тел. +49 4721 719-0 · www.voco.com

ТАНТУМ ВЕРДЕ®

БЕНЗИДАМИН

Лекарственное средство для устранения боли и воспаления в полости рта![1]

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ[1]

МЕСТНОАНЕСТЕЗИРУЮЩИЙ[2]

АНТИСЕПТИЧЕСКИЙ[3,4]

- ✓ Пародонтит[5]
- ✓ Гингивит[1]
- ✓ Консервативное и оперативное лечение зубов[1]

Р/с № UA/3920/01/01

Информация о лекарственном средстве для специалистов здравоохранения для использования в профессиональной деятельности

ANGELINI DileO FARMA

04119, г. Киев, ул. Мельникова, 83-Д, оф. 404,
тел.:(044)538-0126, факс: (044) 538-0127

Краткая характеристика лекарственного средства Тантум Верде®.
Состав: 100 мл раствора для ротовой полости содержит 0,15 г бензидамина гидрохлорида. Тантум Верде® является нестероидным противовоспалительным и анальгетическим средством. При местном применении Тантум Верде® действует как дезинфицирующее средство. Применяется для симптоматического лечения раздражающе-воспалительных заболеваний ротоглотки: боли, обусловленные травмами, ушибами, хирургическим вмешательством, воспалительные процессы полости рта или с целью профилактики. Как правило, Тантум Верде® хорошо переносится. Сообщения о побочных эффектах при применении препарата в рекомендованных дозах не было. Иногда возможно появление жжения или раздражения в области применения, что связано с присутствием этанола в составе препарата. Полный перечень возможных побочных эффектов указан в инструкции для медицинского применения препарата.

1. Інструкція для медичного застосування препарату Тантум Верде®, розчин для ротової порожнини. Реєстраційне посвідчення № UA/3920/01/01. Затверджені Наказом Міністерства охорони здоров'я України № 1615 від 22.11.2012 р. **2.** Suhonen S, Olkinuora M, Vehkalahti M, Tenovuo J. Effect of benzydamine mouthrinse on the viability of periodontal pathogens in vitro. Acta Odontol Scand. 2000 Jun;58(3):101-4. **3.** Escribano-Paton et al. Actividad antibacterica in vitro de la benzidamina HCl. P.O.E. 2003, Vol.6, No.3, 285-290. **4.** Pryes R. "Study of Benzydamine in vitro Activity against Periodontal Pathogens". Microbiology Service. Hospital de Sant Pau. Barcelona, Spain (2001). **5.** Coulter S. et al. "The use of Tantum Verde in painful oral inflammations". Dent Cadmos 1998;7:65-70.