

Г.Н. Берченко, Г.А. Кесян, Д.С. Микелаишвили

ПРИМЕНЕНИЕ БИОКОМПОЗИЦИОННОГО НАНОСТРУКТУРИРОВАННОГО
ПРЕПАРАТА КОЛЛАПАН И ОБОГАЩЁННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ
АУТОПЛАЗМЫ В ИНЖИНИРИНГЕ КОСТНОЙ ТКАНИ

ФГУ «ЦИТО им. Н.Н. Приорова Росмедтехнологии», Москва, Россия

Ключевые слова: инжиниринг кости, гидроксипатит, Коллапан.

Несмотря на значительные успехи в хирургической технике, лечение переломов кости может сопровождаться развитием осложнений. Замедленное или полное несращение переломов кости развивается в 5% случаев всех переломов и до 20% случаев высокоэнергетичных переломов [9]. Предотвращение развития подобных осложнений, стимуляция процессов репаративной регенерации кости, а также лечение больших костных дефектов, формирующихся после тяжелых травм или различных заболеваний, требуют новых подходов с использованием биологически активных материалов и тканевого инжиниринга. В настоящее время в клинической практике с целью замещения костных дефектов используют кальцийфосфатные материалы [13], для активизации остеогенеза применяют обогащенную тромбоцитами аутоплазму (Platelet-Rich Plasma – PRP) [14,15].

В данной работе изучены особенности заживления сегментарных дефектов лучевой кости кроликов при имплантации PRP и Коллапана.

Материалы и методы исследования

Экспериментально-морфологическое исследование проведено на 60 кроликах породы Шиншилла (разделены на 4 группы, в каждой по 15 животных), массой $4 \pm 0,5$ кг. Под наркозом животным формировали дефект лучевой кос-

ти 0,6-0,7 см. с обнажением костномозгового канала. В 1-ой группе животных производилось послойное ушивание раны (контрольная группа); во 2-ой группе в полость костного дефекта вводилась обогащённая тромбоцитами аутоплазма (PRP); в 3-ей группе – Коллапан; в 4-ой группе – смесь PRP и Коллапана. Животные выводились из опыта через 30, 60 и 90 дней (по 5 животных на срок) после операции. Гистологические срезы исследуемого материала окрашивали гематоксилином и эозином, а так же пикрофуксином по Ван Гизону и изучали в светоптическом микроскопе.

Для получения аутологичной PRP производили забор крови из сердца животного (примерно 20-30мл), с последующим её двукратным центрифугированием. Первым этапом кровь центрифугировалась 10 мин. при $g - 1000$, вторым этапом остаток тромболейкоцитарной массы центрифугировался в течение 20мин. при $g - 3000$, с последующим удалением надосадочной жидкости после каждого центрифугирования. Коллапан – биокomпозиционный материал на основе наноструктурированного синтетического гидроксипатита (размер частиц гидроксипатита 20 нанометров), коллагена и антибиотика. Производится фирмой «Интермедапатит», Россия (фирма прошла сертификацию по европейскому стандарту

ИСО 13485-2003); регистрационный номер Коллапана в РФ - ФС 01034437/4437-06.

Результаты исследования и обсуждение

Морфологическое исследование показало, что через 1 месяц после операции во всех группах животных наблюдалось формирование первичной костно-хрящевой мозоли. В наименее зрелых участках мозоли – в центре костного дефекта во 2-ой и, особенно, 1-ой группах животных признаки остеогенеза выражены слабо, в тоже время в 3-ей и, особенно, в 4-ой группах видно активное формирование остеоида непосредственно на поверхности имплантированных гранул Коллапана без формирования между ними прослоек рыхлой соединительной ткани. Имплантированный Коллапан не вызывал воспалительной реакции в виде какой-либо клеточной инфильтрации ткани. Наиболее развитая интермедиарная мозоль располагалась вблизи опилов кортикальной пластинки, причем по степени зрелости она убывала от 4-ой к 1-ой группе животных. Наибольший объем новообразованной костной массы и более развитое пластинчатое строение формирующихся остеонов определялось в 4-ой группе животных (Рис. № 1А). В наиболее зрелых участках мозоли (вблизи опилов) элементы имплантированного Коллапана резорбировались и не выявлялись. В 3-ей и, особенно, 2-ой группах животных, по сравнению с 4-ой, новообразованная костная масса интермедиарной мозоли менее обширна, пластинчатое строение формирующихся в ней остеонов слабо выражено (рис. № 1Б). В 1-ой группе животных к данному сроку интермедиарная мозоль представлена лишь немногочисленными остеоидными костными трабекула-

ми. Ко 2-3-му месяцу после операции признаки созревания и ремоделирования костной мозоли в виде увеличения костной массы, перестройки грубоволокнистых незрелых костных структур в пластинчатую кость и постепенной ориентации остеонов вдоль оси кости прогрессировали, что в наибольшей степени выражено в 4-ой группе животных. В центральных отделах костного дефекта 3-ей группы животных в костном массиве интермедиарной мозоли и некоторых трабекулах эндостальной мозоли выявлялись отдельные частицы Коллапана, тогда как в 4-ой группе они полностью резорбировались. Формирование новообразованной костной массы, её ремоделирование с образованием пластинчатых структур и ориентированных остеонов более активно происходило в 3-ей группе животных, по сравнению со 2-ой. Наименее зрелая костная мозоль определялась в 1-ой группе животных, где интермедиарная мозоль была представлена преимущественно тканью в виде губчатой кости.

Полное сращение дефекта лучевой кости у животных происходило: в 1-ой группе - на $75 \pm 4,6$, во 2-ой – на $69 \pm 3,7$, в 3-ей – на $66 \pm 3,4$, в 4-ой – на $55 \pm 3,5$ сутки после операции.

На моделях различных животных показано, что некоторые кальцийфосфатные материалы, такие как синтетический гидроксиапатит, бетатрикальций фосфат, бифазная трикальцийфосфатная керамика индуцируют эктопический (внекостный) остеогенез, то есть обладают остеоиндуктивными свойствами [10,16]. В культуре клеток определённые кальцийфосфатные материалы способствуют дифференцировке стволовых мезенхимальных клеток костного мозга человека в остеобласты в ус-

ловиях отсутствия в культуральной среде остеогенных стимулирующих факторов, что свидетельствует о важной роли клеточно-матриксного взаимодействия в направлении дифференцировки плюрипотентных малодифференцированных клеток [12].

В многочисленных экспериментально- и клинко-морфологических исследованиях нами обнаружено, что материал Коллапан, обладая антимикробными, остеокондуктивными и остеоиндуктивными свойствами, является постепенно резорбируемой матрицей, на поверхности которой в условиях условно асептических и инфицированных костных дефектов формируется новообразованная кость [1,2,3,4,5,6,8]. При этом вокруг частиц Коллапана при различных сроках исследования признаков воспалительной реакции не выявляется, между имплантируемым материалом и новообразованной костью прослойка фиброзной ткани не формируется. Использование Коллапана в клинике у больных с открытыми и закрытыми переломами, с несросшимися переломами и ложными суставами длинных трубчатых костей (313 больных), при комплексном лечении хронического остеомиелита (92 пациента), способствовало сокращению сроков пребывания больных в стационаре, предотвращению рецидивов хронического воспалительного процесса и повторной госпитализации в связи с отсутствием осложнений [6,8].

В настоящее время в клинической практике с целью активизации остеогенеза находит метод использования обогащенной тромбоцитами аутоплазмы (PRP) [14,15]. Аутологичная PRP представляет собой концентрированную суспензию тромбоцитов в ограниченном объеме плазмы. Метод основан на

применении аутологичных тромбоцитов, в которых содержатся многочисленные факторы роста и цитокины, способствующие регенерации поврежденной кости. В α гранулах тромбоцитов выявлено свыше 30 ростовых факторов, среди которых наиболее важное значение для регенерации кости имеют тромбоцитопродуктивный фактор роста (PDGF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и трансформирующий фактор роста (TGF- β). Последний представляет собой большую группу белков, среди которых TGF- β 1 и морфогенетические белки кости модулируют клеточную пролиферацию и дифференцировку малодифференцированных клеток в остеобласты, увеличивают синтез внеклеточного матрикса кости и ингибируют его деградацию.

Тканевой инжиниринг является альтернативой для использования ауто-трансплантатов и костных аллоимплантатов. Инжиниринг тканей – это создание в лабораторных условиях живых функциональных компонентов, которые могут быть использованы для регенерации неправильно функционирующих тканей [11]. В инжиниринге кости используется три компонента: 1) живые клетки (обычно мезенхимальные стволовые клетки, полученные из костного мозга и способные дифференцироваться в остеобласты или хондробласты); 2) матрица, обладающая остеокондуктивными свойствами, к которой могут прикрепляться предшественники остеобластов с последующим ростом и формированием кости; 3) факторы роста, стимулирующие клеточную активность и дифференцировку с развитием остео- или хондрогенеза. Исходя из основных принципов тканевого инжиниринга, с целью активизации регенерации костной ткани, сотрудниками ЦИТО разработан метод сочетанного при-

менения Коллапана и обогащённой тромбоцитами аутоплазмы в травматолого-ортопедической практике. В данном случае в качестве живых клеток используется концентрат собственных тромбоцитов, которые разрушаясь в костном дефекте выделяют многочисленные факторы роста, запускающие и активирующие процессы остеогенеза, тогда как Коллапан выполняет роль постепенно лизирующейся матрицы, обладающей не только остеокондуктивными, антибактериальными, но и остеоиндуктивными свойствами.

Как показало данное исследование, сочетанное применение Коллапана с аутологичной PRP, по-видимому, за счёт синергизма их действия, вызывает значительную активизацию репаративной регенерации кости, выраженную в большей степени, чем при использовании Коллапана или аутологичной PRP в отдельности. В данном случае Коллапан, кроме всего прочего, служит средством локальной доставки выделяющихся из тромбоцитов аутологичных факторов роста. Не исключено, что факторы роста могут связываться физическими или ковалентными связями с элементами Коллапана с последующим пролонгированным выделением в костном дефекте. Локально выделяющиеся аутологичные факторы роста, стимулируя адгезию, пролиферацию, дифференцировку клеток-предшественников остеобластов, функциональную активность остеобластов и синтез этими клетками внеклеточного матрикса кости, значительно усиливают остеоиндуктивные свойства биокомпозицион-

ного материала Коллапан, ускоряют этапы репаративной регенерации кости. Использование данного метода в клинике способствовало у 30-ти больных с замедленно консолидирующимися переломами сокращению сроков сращения на $7\pm 3,2$ дня, а у 42 больных с несросшимися переломами и ложными суставами – на $12\pm 4,8$ дня [7].

Выводы. Использование в инжиниринге костной ткани биокомпозиционного наноструктурированного препарата Коллапан в сочетании с факторами роста обогащённой тромбоцитами аутоплазмы (PRP), является безопасным и эффективным методом активизации репаративной регенерации кости, который может быть рекомендован для широкого внедрения в клиническую практику.

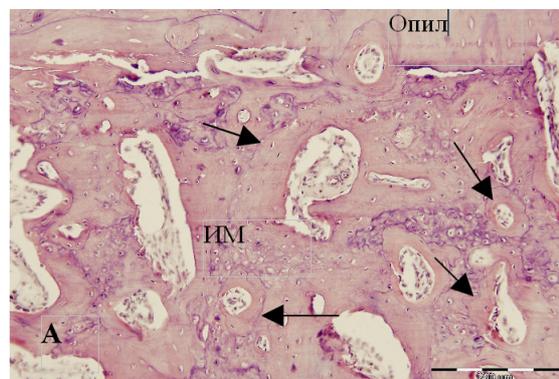


Рис. 1А. Интермедиарная мозоль (ИМ), прилежащая к опилу лучевой кости, представлена массивом новообразованной костной ткани с неориентированными остеонами, вокруг которых формируется пластинчатая кость (стрелки). 4-я группа животных. 1 мес. после операции. Окраска гематоксилином и эозином. X 200.

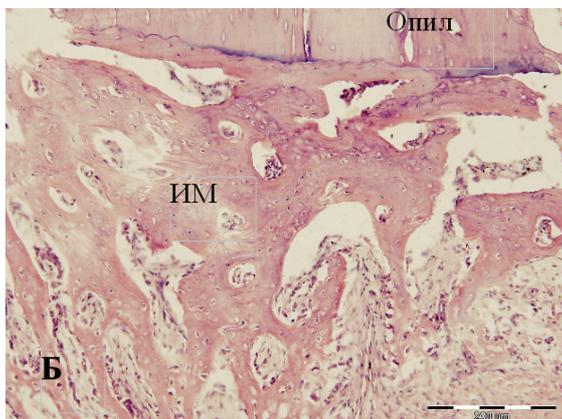


Рис 1Б. Менее обширная и зрелая интермедиарная мозоль (ИМ), прилежащая к опилу лучевой кости, в которой формирования пластинчатого строения вокруг неориентированных остеонов почти не наблюдается. 2-я группа животных. 1 мес. после операции. Окраска гематоксилином и эозином. X 200.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арсеньев И.Г. Экспериментально-морфологическое обоснование клинического применения деградируемых биоимплантатов в комплексном лечении переломов и ложных суставов длинных трубчатых костей: Автореф. дис. ... кандидата мед. наук. – М., 2007. – 25 с.
2. Берченко Г.Н., Кесян Г.А., Уразгильдеев Р.З. и др. Сравнительное экспериментально-морфологическое исследование влияния некоторых используемых в травматолого-ортопедической практике кальций-фосфатных материалов на активизацию репаративного остеогенеза // Журнал «Бюллетень Восточно-сибирского научного центра Сибирского отделения РАМН», №4, Иркутск, 2006. - С.327-332.
3. Берченко Г.Н., Кесян Г.А. Активизация репаративного остеогенеза при заполнении сегментарного дефекта

длинной трубчатой кости композиционным препаратом Коллапан. // Журнал «Травма». 2008. Том 9. № 3. Стр. 282-286.

4. Берченко Г.Н.. Биокomпозиционный наноструктурированный препарат Коллапан в инжиниринге костной ткани. Сборник работ 5-го научно-практического семинара «Искусственные материалы в травматологии и ортопедии». М., 2009. С. 7-13.

5. Жердев К.В. Применение имплантата Коллапан-гель в детской костной патологии. Автореф. дис. . кандидата мед. наук. – М., 2007. – 22 с.

6. Кесян Г.А., Берченко Г.Н., Уразгильдеев Р.З и др. Обоснование использования отечественного биокomпозиционного препарата Коллапан в комплексном лечении переломов и ложных суставов длинных трубчатых костей. // Журнал «Вестник Российской академии медицинских наук». 2008, № 9. Стр. 24-32.

7. Кесян Г.А., Берченко Г.Н., Уразгильдеев Р.З и др. Применение Коллапана и факторов роста в лечении травматолого-ортопедических больных. Сборник работ 5-го научно-практического семинара «Искусственные материалы в травматологии и ортопедии». М, 2009. С. С. 45-48.

8. Уразгильдеев З.И., Бушуев О.М., Берченко Г.Н. Применение Коллапана для пластики остеомиелитических дефектов кости // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. – 1998. № 2. – С.31 -35.

9. Dickson G., Buchanan F., Marsh D et al.. Orthopaedic tissue engineering and bone regeneration. Technology Health Care. 2007. V. 15. P. 57-67.

10.Habibovic P., Sees T.M., van den Doel M.F., et al..Osteoinduction by biomaterials – physicochemical and structural influences. J. Biomed. Mater. Res. 2006. V. 77A. P. 747-762.

11.Hench L.L., Jones J.R., Biomaterials, artificial organs and tissue engineering. Woodhead Publishing Limited, 2005. 287 P.

12.Muller P., Bulnheim U., Diener A., et al.. Calcium phosphate surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. J. Cellular Molec. Medicine. 2007. V.12. Issue 1. P. 281-291.

13.Ransford A.O., Morley T., Edgar M.A., et al. Synthetic porous ceramic compared with autograft in scoliosis surgery. A prospective, randomized study of 341 patients. J Bone Joint Surg [Br]. 1998. V. 80-B. P. 13-18.

14.Simman R., Hoffmann A., Bohinc J. et al. Role of platelet-rich plasma in acceleration of bone fracture healing. Ann. Plast. Surg. 2008. V. 61. P. 337-344.

15.Wrotniak M., Bielecki T., Gazdzik T.S. Current opinion about using the platelet-rich gel in orthopaedics and trauma surgery. Ortopedia Traumatologia Rehabilitacja. 2007. V. 9 № 3. P. 227-238.

16.Yuan H., van Blitterswijk CA., de Groot K. et al..Cross-species comparison of ectopic bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) scaffolds. Tissue Eng. 2006. V. 12. P. 1607-1615.