

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ДЕМИНЕРАЛИЗОВАННЫХ КОСТНЫХ ИМПЛАНТАТОВ, ИЗГОТОВЛЕННЫХ ПО ТЕХНОЛОГИИ ЦИТО

Ю.Б. Юрасова¹, М.В. Лекишвили², А.Ю. Рябов³, Г.П. Тер-Асатуров⁴, А.С. Панкратов⁵, А.Г. Хамидов⁶, А.Т. Бигвава⁴

¹Российская детская клиническая больница, главный врач – д.м.н. профессор Н.Н. Ваганов

²ФГУ «ЦИТО им. Н.Н. Приорова», директор – академик РАН и РАМН, д.м.н. профессор С.П. Миронов

³ГУ «МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского», директор – чл.-кор. РАМН д.м.н. профессор Г.А. Оноприенко

⁴Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова, ректор – академик РАН и РАМН, д.м.н. профессор М.А. Пальцев

⁵Российский государственный медицинский университет, ректор – академик РАМН д.м.н. профессор Н.Н. Володин

⁶ФГУ «НКЦ оториноларингологии Росздрава», директор – д.м.н. профессор Н.А. Дайхес
Москва

Исследование посвящено экспериментальной оценке остеиндуктивных свойств деминерализованных костных имплантатов (ДКИ), изготовленных по технологии ЦИТО с использованием процессов лиофилизации и радиационной стерилизации потоком быстрых электронов. В качестве экспериментальных животных были выбраны белые крысы на модели эктопического остеогенеза сроком на 40 дней и кролики, которым ДКИ имплантировали в дефект нижней челюсти со сроками эксперимента 10, 20, 30, 60 и 90 дней. Результаты морфологических исследований свидетельствовали об отсутствии токсичности, наличии высоких показателей биоинтеграции и остеиндуктивности изучаемых ДКИ. Предложенная технология обработки костной ткани позволяет сохранять биологическую активность тканей и получать биологические материалы с выраженными пластическими свойствами. Полученные в числе прочих данные явились основанием для решения об использовании этих материалов в клинике костных патологий различного генеза и локализации.

Ключевые слова: деминерализованные костные имплантаты, экспериментально-морфологические исследования, остеиндуктивность.

Research is devoted to an experimental estimation of osteoinductive properties of demineralized bone implants (DBA) made on technology CITO with use of lyophilization and radiating sterilization by stream of fast electrons. As experimental animals, white rats on ectopic osteogenesis model for a period of 40 days and rabbits to which DBA implanted into defect of the jaw with terms of experiment 10, 20, 30, 60 and 90 days have been chosen. Results of morphological researches testified to absence of toxicity, presence of high indicators of biointegration and osteoinductance studied DBA. The offered technology of processing of a bone tissue allows to keep biological activity of tissues and to receive biological materials with the expressed plastic properties. Obtained among other data were the bases for the decision of use of these materials in clinic of different bone pathologies.

Key words: demineralized bone allografts, experimental morphological researches, osteoinductance.

Введение

Начало системного изучения свойств и качества деминерализованной костной ткани пришлось на середину прошлого столетия. Сегодня в мировой биоимплантологии существует уже достаточно большое количество технологий получения пластических материалов на основе деминерализованной костной ткани, которые, как правило, изначально разрабатывались для нужд стоматологии и челюстно-лицевой хирургии [1, 3]. Наличие остеиндуктивных свойств деминерализованных костных имплантатов (ДКИ) при соблюдении ряда обязательных условий их изготовления было определено многими экспериментальными исследованиями [2, 5, 6]. После доказательства эффективности и безопасности ДКИ данный пластический материал был ус-

пешно внедрен в клиническую практику различных направлений медицины, в том числе и в травматологии и ортопедии [3–5, 7].

В то же время, отечественная история исследования деминерализованной костной ткани, способов получения и ее свойств насчитывает около 30 лет [1]. За этот период ДКИ в России имели свое как почти безоговорочное признание, так и отсутствие к ним интереса по различным причинам, часто весьма далеким от медицины. Накопленный опыт научных исследований показал, что поиск вариантов изготовления пластических материалов в России на основе деминерализованной кости, предназначенных для восстановления дефектов костной ткани и ускорения регенеративных процессов, еще далек от своего завершения, и существует ряд возможностей его совершенствования [1, 2, 4]. В этой

связи в тканевом банке ЦИТО на основе отечественного и мирового опыта была разработана оригинальная технология изготовления ДКИ (патент РФ на изобретение 2147800 от 17.02.1999).

Цель представленных экспериментальных исследований – оценка остеоиндуктивных и других свойств ДКИ, изготовленных по технологии ЦИТО, выявление зависимости изучаемых свойств от степени деминерализации, их проявления в системе *in vivo* в алло- и ксеновариантах.

В качестве экспериментальных животных были выбраны крысы линии вистар, которым делали пересадку материала в область мышц живота и паравертебральные мышцы. С целью получения максимально достоверных сравнительных результатов исследования каждому животному имплантировали по четыре разных образца материалов. Для этого были изготовлены по технологии ЦИТО ДКИ разной степени деминерализации. Материалы, для консервации и стерилизации которых используют низкие температуры и пары формалина, выступили в качестве контрольной группы эксперимента. Степень деминерализации первых трех групп образцов ДКИ составила $18,3 \pm 1,5\%$, $31,4 \pm 2,7\%$ и $62,8 \pm 1,3\%$ после помещения очищенной нативной кости в раствор 0,6 Н соляной кислоты соответственно на 1, 6 и 24 часа. Согласно технологии, все деминерализованные образцы затем были охлаждены до -30°C , лиофилизированы, после чего помещены в стандартную пластиковую упаковку и стерилизованы потоком быстрых электронов дозой поглощения 20–25 кГр.

Для первой серии эксперимента были изготовлены имплантаты из кортикального слоя бедренных костей крыс и имплантированы в мышцы брюшной стенки животных (20 крыс). Для второй серии источником имплантатов служил кортикальный слой большеберцовых костей человека, которые также имплантированы в мышцы брюшной стенки и паравертебральные мышцы лабораторных крыс (32 животных). Срок эксперимента составил 40 суток.

Дополнительные исследования ДКИ, изготовленных по технологии ЦИТО, были проведены на 25 половозрелых самцах кроликов породы шиншилла весом от 2 до 2,5 кг. После выполнения наружным разрезом хирургического доступа к области ветви нижней челюсти в ней создавали сквозные костные дефекты, которые заполняли деминерализованными имплантатами, полученными из костей свода черепа человека. Контрольный дефект оставался свободным и заполнялся кровяным сгустком. Животных выводили из эксперимента в сроки 10, 20, 30, 60 и 90 суток. На каждый срок использовали по 5 лабораторных животных.

Результаты исследования показали, что после имплантации в мышцы образцов пластического материала на 40 суток эксперимента в обеих сериях наблюдалась как разная гистологическая картина, так и различная реакция окружающих тканей на имплантаты. На гистологических препаратах все имплантаты, стерилизованные парами формалина, имели вид компактной кости пластинчатого строения. Вокруг них, как в алло-, так и ксеноварианте, формировалась фиброзная капсула, что свидетельствовало о реакции организма на инородное тело и как следствие этого о невысокой биологической доступности такого материала. Морфологические явления воспаления вокруг имплантатов были умеренными (рис. 1). Состояние имплантированных ДКИ низкой степени деминерализации и в алло-, и в ксеновариантах имело сходство. На гистологических препаратах имплантаты были частично резорбированы и фрагментированы. Деградация материала была наиболее выражена на их периферии. Фиброзная ткань вокруг имплантатов формировалась незначительно, но сосудистая реакция вокруг их была более выраженной, чем у материалов, изготовленных с применением паров формалина (рис. 2).

При имплантации ДКИ человека высокой степени деминерализации через 40 дней эксперимента значительная часть имплантатов резорбировалась. У части животных обнаружены картины формирования хондро-остеоидных структур. У других элементы костно-хрящевой ткани формировались вблизи фрагментированных имплантатов (рис. 3).

Наиболее выраженные изменения были выявлены в области имплантации ДКИ высокой степени деминерализации, изготовленных из костной ткани крыс, в алловарианте. Результаты эксперимента показали, что на 40 суток эктопическая кость была сформирована примерно в 50% случаев. Ее формирование произошло наряду с образованием очагов кроветворения (рис. 4), что продемонстрировало наличие выраженных остеоиндуктивных свойств исследуемых образцов.

Относительно слабое остеоиндуктивное воздействие ДКИ человека высокой степени деминерализации на формирование эктопической кости у животных можно объяснить пока не совсем ясными процессами, которые возникают при использовании биологических тканей животных другого вида по сравнению с алловариантом. Существует мнение, что биологические материалы другого вида животных часто не показывают того эффекта, который возникает при применении внутривидовых тканей [4] вследствие наличия факторов тканевой несовместимости [1]. Поэтому идея использования ксено-

материалов на сегодняшний день, по многим аспектам, остается крайне интересной, перспективной и дискуссионной.

В эксперименте на кроликах морфологические исследования свидетельствовали, что ДКИ к 10-ым суткам в основном резорбировались макрофагами и начинали замещаться костными регенератами, заполняющими, в отличие от контроля, большую (около двух третей) часть объема дефектов. Одновременно остеоидные балки регенератов были более зрелыми, чем в контроле. Через 20 суток ткань регенератов созрела, при этом сами регене-

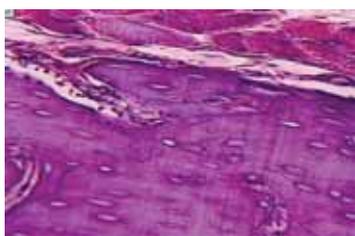


Рис. 1. Гистологический препарат замороженной кортикальной кости крысы через 40 дней после имплантации в мышечную ткань. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x250

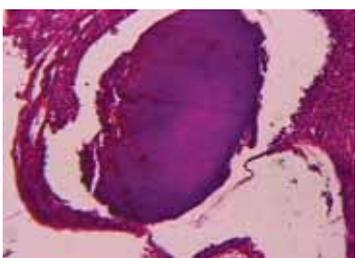


Рис. 2. Гистологический препарат частично деминерализованной кости человека через 40 дней после имплантации в мышечную ткань крысы. На препарате имплантат в виде компактной кости со стертой структурой пластинчатого строения, частично фрагментирован (стрелка 1). Вокруг имплантата соединительнотканная капсула (стрелка 2). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x100

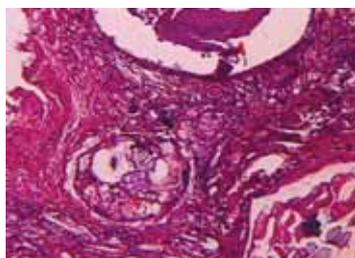


Рис. 3. Гистологический препарат деминерализованной кортикальной кости человека высокой степени деминерализации через 40 дней после имплантации в мышечную ткань крысы. Фрагментированный имплантат (стрелка 1) окружен соединительнотканной капсулой. Хондро-остеоидные структуры (стрелка 2). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x100

раты заполняли уже всю площадь дефектов. К месячному сроку процесс созревания костной ткани усиливался: нарастала компактизация, имелись четкие линии склеивания балок, формировались остеоны. В пространствах между балками образовывался костный мозг. Оставались очаги хондронидной ткани (рис. 5). К 2-му месяцу экспериментального исследования костная ткань регенератов созрела и практически не отличалась от интактной кости (рис. 6). К 3-му месяцу эксперимента сформировавшаяся костная ткань уже не менялась по сравнению с предыдущим сроком.

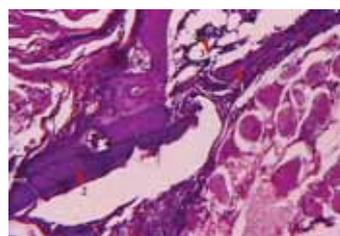


Рис. 4. Гистологический препарат деминерализованной кортикальной кости крысы высокой степени деминерализации через 40 дней после имплантации в мышечную ткань. Новообразованная губчатая кость имеет пластинчатый рисунок строения (стрелка 1) и формируется рядом с деминерализованным имплантатом (стрелка 2). В межтрабекулярном пространстве элементы кроветворения костного мозга (стрелка 3). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x100

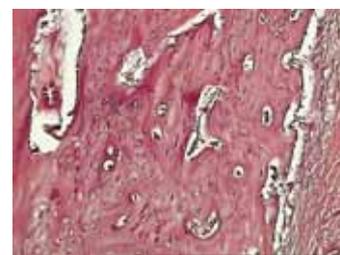


Рис. 5. Деминерализованный имплантат, изготовленный из костей свода черепа человека, 30 суток. Относительно зрелая костная ткань, выполняющая дефект. В ней небольшой участок хондронидной ткани. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x200

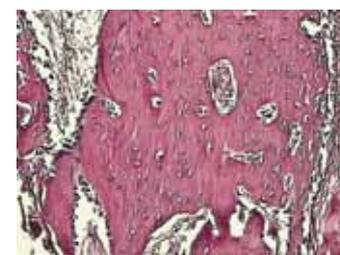


Рис. 6. Деминерализованный имплантат, изготовленный из костей свода черепа человека, 60 суток. Зрелая компактизированная ткань в дефекте. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x200

Наиболее качественно проявили себя аллоимплантаты высокой степени деминерализации, которые характеризовались отсутствием токсичности, выраженными морфологическими показателями биологической интеграции и индуктивности. ДКИ высокой степени деминерализации продемонстрировали выраженные как остеокондуктивные, так и остеоиндуктивные свойства, особенно в случаях использования материала в алловарианте. Необходимо отметить, что по мере удаления минерального компонента из костной ткани ее механические свойства снижаются, и чем выше степень деминерализации, тем меньше прочностные характеристики деминерализованной кости [1]. Часто от пластического материала требуются именно его высокие механические параметры, особенно при проведении хирургических пособий замещения пораженной кости имплантатом в области опорных отделов скелета.

Из полученных в эксперименте с кроликами результатов можно сделать несколько заключений. Животным имплантировали ДКИ, изготовленные из костной ткани человека, представляющие кости свода черепа, которые, по общему устоявшемуся мнению, считаются тканями с низкой биологической потенциальностью. Однако в эксперименте данные ДКИ продемонстрировали высокие пластические свойства, являясь к тому же ксеноматериалом для животных. Следовательно, технологический процесс изготовления ДКИ позволяет не только сохранить изначальные биологические возможности, но и создавать биологические имплантаты, ускоряющие процессы костной регенерации у объектов другого вида.

Выводы

Результаты экспериментов показали, что исследованные материалы имеют разные показатели токсичности и биосовместимости. Наиболее качественно проявили себя деминерализованные аллоимплантаты, которые характеризовались отсутствием токсичности, высокими показателями биоинтеграции и индуктивности. В эксперименте они продемонстрировали выраженные как остеокондуктивные, так и остеоиндуктивные свойства при имплантации в организм реципиента, что явилось прямым указанием на возможность использования этих материалов в клинике костных патологий. Эти результаты однозначно доказывают, что предложенная технологическая обработка кости кислотами и спиртами сохраняет биологическую ак-

тивность материала. Аналогичное утверждение касается и стерилизации потоком быстрых электронов в дозах 20–25 кГр, так как при таком воздействии на имплантаты последние обладают индуктивными свойствами. Кроме того, с помощью данных экспериментов удалось определить и обосновать основные параметры обработки и стерилизации компактной костной ткани для её последующего использования в процессе лечения больных с различной костной патологией.

Литература

1. Лекишвили, М.В. Технологии изготовления костного пластического материала для применения в восстановительной хирургии : дис. ... д-ра мед. наук / Лекишвили М.В. — М., 2005. — 290 с.
2. Савельев В.И. Получение и сохранение деминерализованной костной ткани для клинического применения / В.И. Савельев // Деминерализованные костные трансплантаты и их использование в восстановительной хирургии : сб. науч. трудов. — СПб., 1996. — С. 3–12.
3. Dall'Agnol. Induction of osteogenesis by demineralized homologous and xenograft bone matrix / Dall'Agnol [et al.] // Acta Chir. Bras. — 2003. — Vol. 18, N 3. — P. 301–308.
4. Mironov, S.P. Alloplasty in conjunction with metallosteosynthesis for bone defects replacement in paediatrics of tumour-like pathologies of skeleton / S.P. Mironov [et al.] // Adv. Tissue Bank. — 2002. — Vol. 6. — P. 89–99.
5. Reddi, A.H. Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins / A.H. Reddi // Clin. Orthop. — 1998. — N 355 Suppl. — P. S66–72.
6. Urist, M.R. Bone formation by autoinduction / M.R. Urist // Science. — 1965. — Vol. 150, N 12. — P. 893–899.
7. Von Versen, R. The peracetic acid/low pressure cold sterilization — a new method to sterilize corticocancellous bone and soft tissue / R. Von Versen, R. Starke // J. Exp. Chir. Transplant. Kunstl. Org. — 1989. — Bd. 22, N. 1. — S. 18–21.

Контактная информация:

Юрасова Юлия Борисовна — д.м.н. врач-нефролог;
 Лекишвили Михаил Васильевич — д.м.н. заведующий лабораторией «Тканевой банк» ЦИТО им. Н.Н. Приорова;
 Рябов Алексей Юрьевич — к.м.н. ассистент кафедры челюстно-лицевой хирургии и стоматологии;
 Тер-Асатуров Геннадий Парисович — д.м.н. профессор, ведущий научный сотрудник кафедры челюстно-лицевой хирургии;
 Панкратов Александр Сергеевич — д.м.н. профессор кафедры челюстно-лицевой хирургии и стоматологии;
 Хамидов Анвар Гаджиевич — аспирант;
 Бигвава Арчил Тимурович — ассистент кафедры челюстно-лицевой хирургии детского возраста.

EXPERIMENTAL ESTIMATION OF THE DEMINERALIZED BONE ALLOGRAFTS MADE BY TECHNOLOGY OF CITO

Yu.B. Yurasova, M.V. Lekishvili, A.Yu. Ryabov, G.P. Ter-Asaturov, A.S. Pankratov, A.G. Khamidov, A.T. Bigvava