

СТЕРИЛЬНЫЙ ДЕИММУНИЗИРОВАННЫЙ МАТРИКС ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ РАСШИРЕННЫХ ДЕФЕКТОВ КОСТНОЙ ТКАНИ

Н.Ю. Анисимова¹, А.Н. Копылов¹, Е.А. Корнюшенков¹, Д.Е. Митрушкин¹, А.В. Максимкин²,
Е.А. Сушенцов¹, М.В. Киселевский¹

¹ ФГБУ «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина» РАМН, г. Москва

² Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС» (НИТУ «МИСиС»), г. Москва

Ключевые слова: матрикс, кость, деиммунизация, прочность, стерильность

На базе ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН был разработан метод получения из донорской кости стерильного деиммунизированного матрикса, который может быть использован в качестве основы биоимплантатов для замещения дефектов костной ткани. Целью исследования являлась оценка воздействия предлагаемого способа химической обработки на прочностные характеристики костей, а также на подавление развития реакции острого отторжения организмом реципиента при имплантации. Было доказано, что предлагаемый способ обеспечивает стерилизацию матрикса и снижает его иммуногенность, что проявляется в отсутствии признаков деградации и развитии реакции острого отторжения при сингенной гетеротопной имплантации мыши. При этом в результате применения данного способа получения костного матрикса в сравнении с исходной костью не наблюдается снижения прочностных характеристик, оцениваемых по показателям «предел текучести», «модуль упругости» и «предел прочности».

Введение

В последние годы наблюдается тенденция возрастания роли имплантационной хирургии. В частности, часто наблюдаются клинически обусловленные ситуации, когда в результате обширных травм, врожденных пороков развития или заболеваний возникает необходимость в реконструкции дефектов костной ткани. Аутологичные трансплантаты часто называют «золотым стандартом» трансплантологии, поскольку такой подход предполагает полную гистосовместимость, минимальный риск иммунологического отторжения и обеспечение остеогенных и остеоиндуктивных качеств пластического материала [1]. Применение костных аутоотрансплантатов, обеспечивая каркасную функцию, является хорошим выбором для сегментарных дефектов костей длиной до 5–6 см [2]. Аутоотрансплантат, как правило, имеет адекватные механические свойства, содержит основные компоненты для регенерации кости (жизнеспособные остеогенные клетки, остеоиндуктивные факторы роста), что обеспечивает высокую вероятность его интеграции. Однако недостатки такого подхода включают наличие очень ограниченного количе-

ства аутогенных тканей, которые можно было бы изъять без функционального ущерба, опасности затягивания времени операции, повышения вероятности осложнений в виде шока, боли и присоединения инфекции при нанесении дополнительной травмы больному [3, 4]. Следует также учитывать вероятность наличия неидентифицированной хирургом в момент резекции патологии донорского участка ткани, а также необходимость придания изъятому материалу требуемой анатомической формы. Следует иметь в виду, что, по сообщению De Long WG и соавторов, приблизительно у 20–30% пациентов, которым проводили реконструктивную аутоотрансплантацию костной ткани, отмечали хроническую болезненность в области донорского участка [5, 6].

В то же время возможность использования чужеродных тканей, взятых у трупов или с удаленных органов, значительно расширяет возможности пластической и реконструктивной хирургии. Однако такой подход ставит перед исследователями новые проблемы: преодоление или уменьшение тканевой несовместимости, необходимость разработки методов стерилизации и консервирования тканей, сохранение механических характеристик, свойственных исходной кости. Тканевая несовместимость – это основная причина трудностей, возникающих при пересадках аллогенных и ксеногенных тканей. Добиться истинного и стойкого

Адрес для корреспонденции

Анисимова Наталья Юрьевна
E-mail: n_anisimova@list.ru

приживления тканей одного организма на другом, по-видимому, не удастся. Через определенный период времени тканевой имплантат подвергается деструкции и замещению собственными тканями организма. Вместе с тем борьба за максимальное удлинение сроков существования функционального транс-/имплантата имеет большое значение для хирургической практики. Преодоление этой проблемы может быть осуществлено несколькими путями: подавление выраженности реакции со стороны макроорганизма на введение имплантата за счет индукции иммуносупрессии или удаление из тканей (материалов) имплантата клеток и молекул, опосредующих развитие этой защитной реакции. Говоря о первом пути, стоит учитывать, что хотя высокие дозы иммуносупрессантов уменьшают интенсивность острого отторжения аллотрансплантата, однако применение цитостатиков или облучения имеет множество побочных эффектов, в том числе может способствовать развитию гнойно-инфекционных процессов в области трансплантации за счет подавления реактивности иммунной системы организма пациента. Относительно второго пути – в целом подходы для решения этой проблемы сводятся либо к разработке протезов на основе биосовместимых синтетических материалов, либо к обработке тканей биологического происхождения физическими или химическими способами. При этом необходимо, чтобы метод приготовления матрикса (каркаса) наряду с сохранением целостности и прочности обеспечивал также функциональность имплантата. Для снижения иммуногенности необходимо не только убить клетки донора, но и максимально полно удалить их составляющие из бесструктурного внеклеточного матрикса. Подобный подход к созданию имплантатов естественного происхождения в настоящее время признан одним из наиболее перспективных. Есть сообщения о перспективности применения децеллюляризованных тканей для реконструкции сердечных клапанов, трахеи, мышц, сухожилий и брюшной стенки [7–12]. Однако наибольший интерес вызывает применение такого подхода для замещения дефектов костной и хрящевой ткани [13].

На базе РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН был разработан способ получения деиммунизированного костного матрикса путем химической обработки нативного костного материала.

Целью данного исследования являлась оценка воздействия предлагаемого способа на механические характеристики костей, стерильность пластического материала, а также на подавление развития реакции острого отторжения организмом реципиента при имплантации.

Материалы и методы

Способ получения матрикса. Кости очищали от мягких тканей, из костномозгового канала удаляли остатки костного мозга. При толщине стенки кости более 5 мм ее перфорировали. Затем кость помещали в деиммунизирующий 5–10% раствор, приготовленный из сухой смеси хлорита натрия, перхлората натрия, хлорида натрия в соотношении 7:2:1 и дистиллированной воды. Кость полностью погружали в приготовленный раствор и выдерживали в темноте от 1 до 4 мес в зависимости от размеров и толщины стенки кости. Костномозговой канал промывали раствором указанного состава 1 раз в 3 сут. Затем подготовленный матрикс многократно промывали стерильным 0,9% раствором хлорида натрия. До имплантации матрикс хранили в стерильном 0,9% растворе хлорида натрия в течение 5 сут.

Испытания механических свойств. Испытания на сжатие проводились на универсальной испытательной машине Zwick/Roell z202 в соответствии с общепринятыми требованиями исследования свойств материалов [14]. Прочность образцов intactных костей и бесклеточного костного матрикса изучали на сжатие по показателям «предел текучести», «модуль упругости» и «предел прочности» в соответствии с ГОСТ 4651-82 на участке деформационной кривой от 10 до 30 МПа. Обработку первичных данных и статистический анализ проводили с использованием специализированной аналитической программы testXpert II. Результаты механических испытаний на сжатие двух видов костей представлены как среднее арифметическое $\pm$ среднеквадратичное отклонение, вычисленные по результатам 3–5 измерений.

Исследование стерильности. С поверхности матрикса был взят мазок стерильным тампоном. Далее был проведен посев на поверхность среды Эндо, кровяного, BIGGY (висмут-глицин-глюкозо-дрожжевого), маннит-солевого, желчно-эскулинового азидного агара (все производства Pronadisa, Испания). Посевы инкубировали 18–24 ч в аэробных условиях. Также проводили посев пробы раствора хлорида натрия, в котором образцы матрикса инкубировали до имплантации, на тиогликолевую среду, сахарный бульон и среду Сабуро (все производства Pronadisa, Испания). Посевы инкубировали в аэробных условиях в течение 5 сут.

Исследование развития реакции отторжения костного матрикса тканями реципиента проводили после подкожной трансплантации образцов мышам линии Balb/c ($n=10$). Для этого у мышей линии СВА изымали с соблюдением условий стерильности бедренные кости ($n=10$). Образцы контрольной группы хранили до начала исследования в растворе, состоящем из диметилсульфоксида (ПанЭко, РФ) и 6% раствора полиглюкина (Красфарма, РФ) – соотношение 1:9. Образцы опытной группы для полу-

чения костного матрикса обрабатывали указанным выше способом. Срок имплантации — 3 мес. Затем образцы извлекали и проводили морфологическое исследование.

Результаты

Изучение механических свойств

Для проведения исследований использовали лучевые и плечевые кости 5 взрослых собак, подвергнутых эвтаназии вследствие получения травм, несовместимых с жизнью. Средний возраст животных — $9 \pm 1,2$ года. Для сравнительного анализа механических свойств использовали диафизарные фрагменты костей цилиндрической формы высотой 20 мм. Подготовленные фрагменты костей были разделены на две группы: контрольная и опытная. Образцы опытной группы послужили основой для получения внеклеточного костного матрикса. Механические свойства образцов обеих групп были проанализированы согласно дизайну, подробно описанному нами в ранее опубликованном специализированном исследовании [15]. Таким образом, в результате выполнения настоящей работы был исследован один из важнейших аспектов изучения механических свойств костной ткани — прочность на сжатие.

Результаты исследования представлены в таблице.

Таблица. Сравнительный анализ физических характеристик образцов внеклеточного костного матрикса и исходной интактной кости собаки

Кость	Группа	Предел текучести $\delta_{0,2}$, МПа	Модуль упругости, МПа	Предел прочности, МПа
Плечевая	опытная	$84 \pm 2,1$	1740 ± 353	$89 \pm 2,1$
	контрольная	$81 \pm 12,5$	1602 ± 102	$90 \pm 5,2$
	p	0,3055	0,2127	0,3503
Лучевая	опытная	$78 \pm 8,2$	1720 ± 233	$87 \pm 16,3$
	контрольная	$79 \pm 21,0$	1852 ± 212	$94 \pm 18,6$
	p	0,4617	0,1881	0,2722

Согласно приведенным данным, достоверных различий по показателям, характеризующим прочность, в сравниваемых группах выявлено не было ($p > 0,05$). Это свидетельствует о том, что примененный нами способ химической обработки костей не ухудшает прочностные характеристики матрикса, предназначенного для замещения костных дефектов.

Исследование на стерильность

Для того чтобы доказать, что предложенный нами метод обработки кости способен обеспечить стерильность полученного в итоге пластического материала, с поверхности матрикса был взят мазок стерильным тампоном. Далее был проведен посев на спектр плотных питательных сред, способных

обеспечить рост различных микроорганизмов (как бактерий различных родов, так и грибов). Через 24 ч инкубации признаков роста колоний микроорганизмов на питательных средах отмечено не было.

Кроме того, было проведено исследование на стерильность 0,9% раствора хлорида натрия, в котором образцы матрикса инкубировали в течение 5 сут до имплантации. Проводили посевы на 3 типа питательных сред: тиогликолевую (на присутствие микроаэрофильных и анаэробных бактерий), сахарный бульон (на присутствие бактерий родов *Staphylococcus* и *Enterobacteriaceae*) и среду Сабуро (селективная среда для выращивания грибов). Полученные результаты свидетельствовали о том, что даже по истечении 5 сут не наблюдали признаков роста микроорганизмов в толще среды.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что предлагаемый нами способ обеспечивает получение костного матрикса, не контаминированного бактериальной или грибковой микрофлорой.

Исследование реактивности организма реципиента после гетеротопной имплантации костного матрикса

Возможность подавления иммуногенности костного матрикса, полученного описываемым способом, изучали по результатам гетеротопной

трансплантации сингенного матрикса мышам на 3 мес. Начиная с 3 сут после операции, на протяжении всего срока наблюдения у мышей опытной группы не наблюдалось отека, а также признаков болезненности в области имплантации; не было признаков развития гнойного воспаления. У мышей контрольной группы наблюдали выраженную отечность в области имплантации на протяжении 1,5–2 мес с момента проведения оперативного вмешательства; признаков болезненности при пальпации данного региона отмечено не было. У 2 мышей контрольной группы в области операционной травмы были отмечены признаки хронического локального воспалительного процесса: образовался свищ с периодическим истечением незначительного по объему экссудата.



Рис. 1. Внешний вид бедренной кости мыши после гетеротопной подкожной трансплантации: а) контрольный образец; б, в) образцы костного матрикса

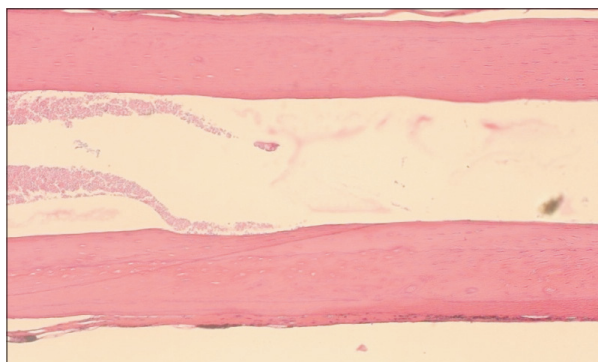


Рис. 2. Продольный срез образца матрикса из бедренной кости мыши через 3 мес после гетеротопной сингенной имплантации. Ув. $\times 100$

Через 3 мес после гетеротопной сингенной имплантации признаки механической и ферментативной деградации макро- и микроструктуры костного матрикса не наблюдали (рис. 1, 2). Анатомическая структура образцов была сохранена.

На поверхности образца костного матрикса отмечали формирование клеточного слоя, морфологически сходного с тканью надкостницы, и соединительнотканного слоя (Фиг. 3). При анализе микроструктуры контрольного образца наблюдали признаки его выраженной деструкции вследствие развития выраженной реакции отторжения чужеродной ткани реципиентом. Об этом, в частности, свидетельствует выраженная инфильтрация зоны

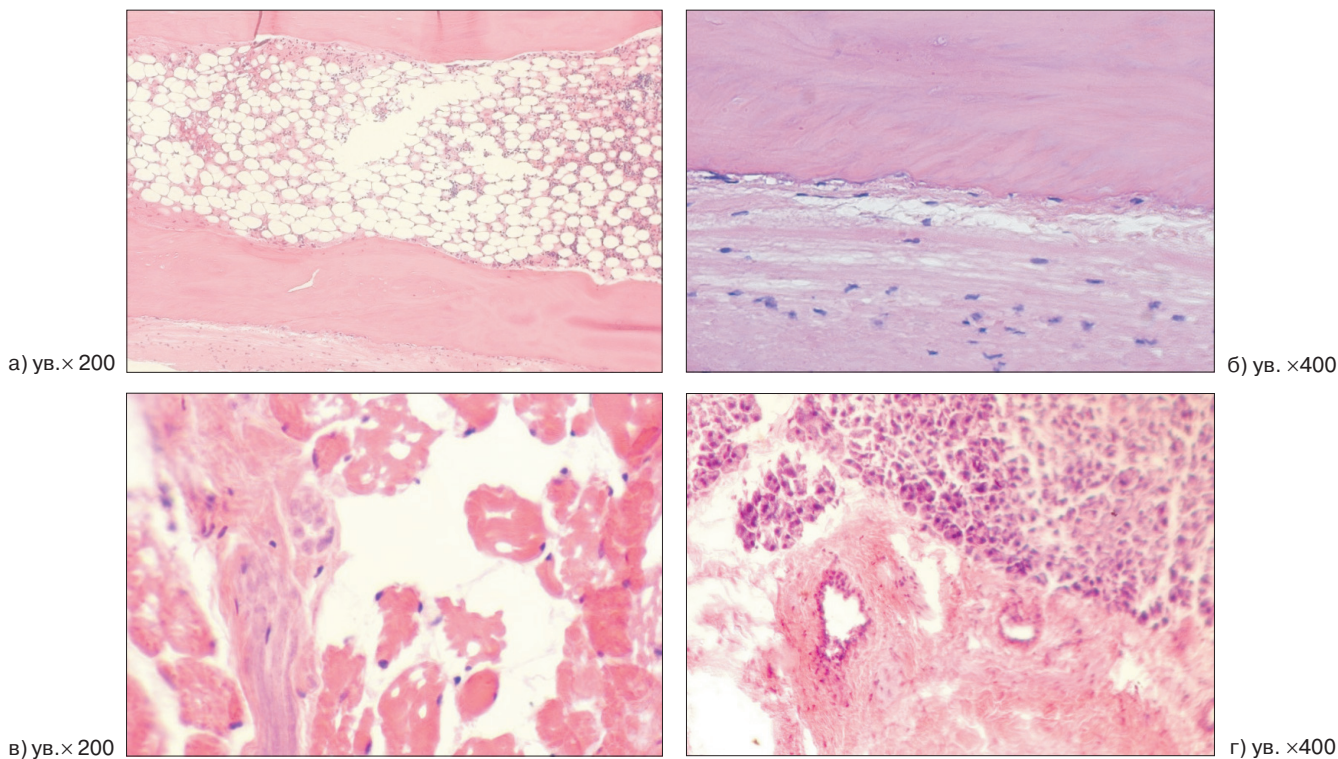


Рис. 3. Продольный срез образцов костного матрикса из бедренной кости мыши с сохранением структуры губчатого вещества костномозгового канала (а, б) и контрольный образец через 3 мес (в, г) после гетеротопной сингенной имплантации

имплантации иммунокомпетентными клетками реципиента и ее прорастание тяжами соединительной ткани.

Обсуждение

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что предлагаемый нами метод химической обработки нативной кости обеспечивает сохранение у бесклеточного матрикса механических свойств исходной кости, в частности, прочности на сжатие. Это качество особенно важно при изготовлении на основе матрикса костных биоимплантатов для замещения обширных дефектов, которые будут подвергаться в организме постоянным или циклическим нагрузкам. Известно, что поперечная сшивка молекул коллагена, ведущая к упорядочиванию ориентации его молекул в пластическом материале, способствует увеличению модуля Юнга почти в 3 раза [16]. Поскольку механические нагрузки приводят к разволокнению биологической ткани, создавая условия облегченного доступа гидролитическим и ферментативным агентам окружающей среды, можно предположить, что получение костного матрикса предложенным способом химической обработки способно обеспечить повышение биостабильности имплантата на его основе.

По результатам гетеротопной трансплантации мышам испытуемых образцов сингенного костного матрикса можно констатировать, что они оказались значительно более стабильными в организме реципиента в сравнении с контрольными образцами. Фактически, по окончании 3 мес пребывания в организме мыши испытуемые образцы костного матрикса не имели признаков деструкции, в то время как контрольные образцы были разрушены. Наряду с этим фактом было отмечено отсутствие признаков развития реакции острого отторжения имплантированного матрикса: через 3 сут после операции не наблюдалось болезненности, отека в области имплантации, не было признаков развития гнойного воспаления. По окончании эксперимента при изучении микроморфологии тканей не наблюдали значительной лейкоцитарной или гистиоцитарной инфильтрации в области имплантации, но отмечали признаки реколонизации матрикса клетками реципиента. Последнее свидетельствует о наличии у матрикса остеокондуктивных, а возможно, и остеоиндуктивных свойств за счет биоактивных составляющих внеклеточного аморфного вещества исходной кости. Таким образом, учитывая отсутствие признаков развития реакции отторжения и биодеструкции имплантата после его внедрения в организм мыши, мы можем сделать вывод о неиммуногенности или, во всяком случае, о значительном снижении иммуногенности костного матрикса, полученного описываемым нами способом.

В целом полученные нами результаты свидетельствуют о возможности получения описанным способом деиммунизированного стерильного костного матрикса. Этот подход, как нам представляется, способен обеспечить основу для создания биоимплантатов с высокой прочностью для замещения значительных по площади костных дефектов, не инициирующих развитие реакции отторжения тканями реципиента.

Можно определенно отметить, что, несмотря на отсутствие истинного приживления имплантированных тканей, последние играют важную роль в процессе замещения дефектов тканей и служат каркасом для разрастания в пересаженном участке тканевых элементов реципиента. Исходя из вышесказанного, представляется обоснованным использование для изготовления имплантатов клеточных технологий, предусматривающих заселение децеллюляризированного матрикса клетками реципиента *in vitro*. Привнесение клеточного компонента в биоконструкцию для замещения тканевых дефектов является, по мнению ряда специалистов, одним из необходимых факторов [17, 18]. Это может способствовать защите поверхности матрикса от гуморальных и клеточных факторов биodeградации, а также ускорению его биоадаптации в организме реципиента. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки на сегодняшний день считаются одним из самых перспективных видов аутологичного материала для клеточной терапии и тканевой инженерии [19]. Эти клетки характеризуются рядом общих свойств, среди которых: высокая способность к адгезии и пролиферации, легкоиндуцируемая дифференцировка в эндотелио-, остео-, хондро-, мио- и адипогенном направлениях. В последние годы на основе накопленного многолетнего опыта специалисты РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН проводят углубленные исследования по созданию деиммунизированных костно-хрящевых матриксов, заселенных мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками, выделенными из костного мозга реципиентов, что призвано снизить образование грануляций в области анастомоза и способствовать эпителизации и реваскуляризации трансплантата [20, 21]. Кроме того, для уменьшения биodeградации и повышения механической устойчивости может быть использована новая технология, предусматривающая модификацию поверхности матрикса нанокompозитными тонкопленочными материалами с последующим заселением мезенхимальными клетками реципиента [22].

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (ГК 14.512.11.0005).

ЛИТЕРАТУРА

1. Samartzis D., Shen F.H., Goldberg E.J., An H.S. Is autograft the gold standard in achieving radiographic fusion in one-level anterior cervical discectomy and fusion with. *Spine*. 2005, v. 30 (15), p. 1756-1761.
2. Nandi S.K., Roy S., Mukherjee P., Kundu B., De D.K., Basu D. Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review. *Indian J. Med. Res.* 2010, v. 132, p. 15-30.
3. Habibovic P., de Groot K. Osteoinductive biomaterials-properties and relevance in bone repair. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2007, v. 1, p. 25-32.
4. Scheller E.L., Krebsbach P.H., Kohn D.H. Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation. *J. Oral. Rehabil.* 2009, v. 36, p. 368-389.
5. De Long W.G., Einhorn T.A., Koval K., McKee M., Smith W., Sanders R., Watson T. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *J. Bone Joint. Surg. Am.* 2007, v. 89 (3), p. 649-658.
6. Schwartz C.E., Martha J.F., Kowalski P., Wang D.A., Bode R., Li L., Kim D.H. Prospective evaluation of chronic pain associated with posterior autologous iliac crest bone graft harvest and its effect on postoperative outcome. *Health and Quality of Life Outcomes*. 2009, v. 7, p. 49.
7. Badylak S.F., Weiss D.J., Caplan A., Macchiarini P. Engineered whole organs and complex tissues. *Lancet*. 2012, v. 379, p. 943-952.
8. D'Onofrio A., Cresce G.D., Bolgan I., Magagna P., Piccin C., Aurimemma S., Fabbri A. Clinical and hemodynamic outcomes after aortic valve replacement with stented and stentless pericardial xenografts: a propensity-matched analysis. *J. Heart Valve Dis.* 2011, v. 20, p. 319-325.
9. Macchiarini P., Jungebluth P., Go T. et al. Clinical transplantation of a tissueengineered airway. *Lancet*. 2008, v. 372, p. 2023-2030.
10. Ricchetti E.T., Aurora A., Iannotti J.P., Derwin K.A. Scaffold devices for rotator cuff repair. *J. Shoulder Elbow Surg.* 2012, v. 21, p. 251-265.
11. Martinello T., Bronzini I., Volpin A. et al. Successful recellularization of human tendon scaffolds using adipose-derived mesenchymal stem cells and collagen gel. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2012, doi: 10.1002/term.1557. [Epub ahead of print].
12. Meyer T., Schwarz K., Ulrichs K., Höcht B. A new biocompatible material (Lyoplast) for the therapy of congenital abdominal wall defects: first experimental results in rats. *Pediatr. Surg. Int.* 2006, v. 22, p. 369-374.
13. Benders K.E., van Weeren P.R., Badylak S.F. et al. Extracellular matrix scaffolds for cartilage and bone regeneration *Trends in Biotechnology*. 2013, v. 31 (3), p. 169-176.
14. Currey J. Measurement of the Mechanical Properties of Bone: a recent history. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2009, v. 467, p. 1948-1954.
15. Анисимова Н.Ю., Максимкин А.Б., Копылов А.Н., Корнюшенков Е.А., Митрушкин Д.Е., Киселевский М.В. Опыт исследования механических свойств трубчатых костей собак. Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. 2012, № 4, с. 53-58.
16. Jia S., Liu L., Pan W. et al. Oriented cartilage extracellular matrix-derived scaffold for cartilage tissue engineering. *J. Biosci Bioeng.* 2012, v. 113, p. 647-653.
17. Kessler M.W., Grande D.A. Tissue engineering and cartilage. *Organogenesis*. 2008, v. 4 (1), p. 28-32.
18. Peltari K., Wixmerten A., Martin I. Do we really need cartilage tissue engineering? *Swiss Med. Wkly.* 2009, v. 139 (41-42), p. 602-609.
19. Keating A. Mesenchymal stromal cells. *Curr. Opin. Hematol.* 2006, v. 13 (6), p. 419-425.
20. Анисимова Н.Ю., Доненко Ф.В., Киселевский М.В. Способ получения биоинженерной конструкции для замещения костных дефектов. Заявка на патент РФ. Рег. № 2012120883/15(031567) от 22.05.2012. Решение о выдаче патента на изобретение 23.01.2013.
21. Давыдов М.И., Анисимова Н.Ю., Доненко Ф.В., Полоцкий Б.Е., Корнюшенков Е.А., Митин В.В., Кулешова Я.А., Киселевский М.В. Способ получения трахеобронхиального биоимпланта. Рег. № 2011115461 от 20.04.2011. Патент РФ №2458635 (опубл. 20.08.2012. Бюл. № 23).
22. Анисимова Н.Ю., Киселевский М.В., Штанский Д.В., Левашов Е.А., Доненко Ф.В., Ситдикова С.М., Решетникова В.В., Корнюшенков Е.А., Кулешова Я.А., Давыдов М.И. Биоимплантат с многофункциональным биоактивным наноструктурированным покрытием. Рег. № 2012111815 от 28.03.2012.

Статья поступила 20.05.2013 г., принята к печати 30.07.2013 г.
Рекомендована к публикации Б.Ю. Боханом

THE STERILE DEIMMUNIZED MATRIX FOR THE REPLACEMENT OF EXTENDED DEFECTS IN BONE

Anisimova N.Yu.¹, Kopylov A.N.¹, Korniyushenkov E.A.¹, Mitrushkin D.E.¹, Maximkin A.V.², Sushenzov E.A.¹, Kiselevsky M.V.¹

¹FGBU N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russian Federation

²National University of Science and Technology «MISIS»

Key words: matrix, bone, deimmunization, strength, sterility

On the base of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS had been designed the method of acquiring sterile deimmunized matrix from donor bone. This matrix can be used as a base for bioimplants for replacing bone defects. The aim of the research was the estimation of influence of the chemical treatment to the bone mechanical properties and the suppression of acute implant rejection. It was proved that the method provides sterilization and decreases immunogenicity of the matrix (absence of any degradation signs and absence of rejection reaction spreading during syngenic heterotopic transplantation in mice). After applying this method, we do not observe any signs of decreasing of mechanical properties (yield stress, Young's modulus, ultimate stress) in comparison with intact bone.