

ПОЛНОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ АХИЛЛОВА СУХОЖИЛИЯ НАНОВОЛОКОННЫМ ИМПЛАНТАТОМ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

А.С. Сенотов, А.А. Ольхов, **Е.Д. Склянчук**, И.С. Фадеева, Р.С. Фадеев, Н.И. Фесенко,
А.А. Просвирин, М.В. Лекишвили, В.В. Гурьев, А.Л. Иорданский, В.С. Акатов

ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино; ФГБУН Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, ФГБОУ ВПО «Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова», ФГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва; ФГБОУ ВО «Пущинский государственный естественно-научный институт», Пущино; ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова» Минздрава России, Москва, РФ

Создание имплантатов, обеспечивающих восстановление связок и сухожилий при их полном/обширном повреждении, является актуальной задачей. В представленной работе исследовали эффективность восстановления полностью иссеченных ахилловых сухожилий у крыс линии Wistar после имплантации в зону дефекта нового материала, состоящего из биорезорбируемых опорных нитей Дар-Вин USP 5/0 и кондуктивного нановолоконного матрикса из полигидроксibuтирата, размещенного вокруг этих нитей. Для этого в зону полного иссечения ахиллова сухожилия помещали либо нановолоконный имплантат (опыт), либо опорные нити (контроль 1), либо рану ушивали после иссечения сухожилия без внесения какого-либо материала (контроль 2). Установлено, что со 2-й по 13-ю неделю после имплантации нановолоконного композита животные полноценно пользовались задними конечностями, в которые после иссечения сухожилия размещали нановолоконные имплантаты. Вместе с тем в контрольных группах 1 и 2 животные испытывали трудности при передвижении. В опытной группе через 6 и 13 нед после имплантации был виден соединительнотканый регенерат, соединяющий пяточный бугор и икроножную мышцу, и отсутствовала контрактура икроножной мышцы в отличие от контрольных групп. Гистологический анализ показал сходство регенерата на нановолоконном имплантате с нативным ахилловым сухожилием. Полученные результаты свидетельствуют о том, что предложенный имплантат обеспечивает функциональное и морфологическое восстановление полностью иссеченного ахиллова сухожилия у крыс и может быть рассмотрен в качестве перспективного прототипа новых материалов, иницирующих эффективную регенерацию связок и сухожилий при их обширном повреждении.

Ключевые слова: модель тотального иссечения ахиллова сухожилия, имплантаты сухожилий, ортотопическая имплантация, регенерация, морфофункциональное восстановление утраченного сухожилия.

Full-Function Restoration of Achilles Tendon with Nanofibrous Implant (experimental study)

A.S. Senotov, A.A. Ol'khov, **E.D. Sklyanchuk**, I.S. Fadeeva, R.S. Fadeev, N.I. Fesenko,
A.A. Prosvirin, M.V. Lekishvili, V.V. Gur'ev, A.L. Iordanskiy, V.S. Akatov

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Pushchino; Semenov Institute of Chemical Physics, Plekhanov Russian University of Economics, Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov, Moscow; Pushchino State Institute of Natural Sciences, Pushchino; N.N. Priorov Central Institute of Traumatology and Orthopaedics; Institute of Applied Economic Research, Moscow, Russia

Creation of implants for the restoration of ligaments and tendons in their complete/massive injury is an urgent task. The efficacy of the restoration of completely resected Achilles tendons after implantation of a new material consisting of absorbable pledged threads Dar-Vin USP 5/0 and conductive nonofibrous scaffolds of polyhydroxybutyrate placed around the threads into the zone of defect was studied in Wistar rats. Either nanofibrous implant (experiment) or pledged threads (control 1) were placed into the zone of completely resected Achilles tendon (control 1), or the postresection wound was sutured without placement of any material (control 2). It was stated that from 2nd to 13th week after implantation of nanofibrous implant the animals from the experimental group used their hind paws in full volume. In control groups 1 and 2 the animals moved with difficulties. In the experimental group of animals in 6 and 13 weeks after implantation a soft tissue regenerate connecting the calcaneal tuber and gastrocnemius muscle was present with the absence of gastrocnemius muscle contracture as compared with the control groups. Histologic examination showed the similarity of the regenerate on nanofibrous implant with the native Achilles tendon. Thus, the suggested implant ensured functional and morphologic restoration of totally resected Achilles tendon in rats and can

be considered as a perspective prototype of new materials initiating effective regeneration of ligaments and tendons in their massive injuries.

Key words: model of complete Achilles tendon resection, tendon implants, orthotopic implantation, regeneration, morphofunctional restoration of the lost tendon.

Введение. Разработка эффективных материалов для пластики и реконструкции поврежденных связок и сухожилий является одной из самых актуальных задач современной спортивной медицины, травматологии и ортопедии [1–4]. Несмотря на острый дефицит материалов для замены или реконструкции поврежденных связок и/или сухожилий, имеющиеся на сегодняшний день биоимплантаты недостаточно эффективны для хирургического восстановления связок и сухожилий, особенно при их обширном/тотальном повреждении. Данное обстоятельство объясняется, прежде всего, недостаточностью знаний о механизмах биоинтеграции имплантированных материалов в организме реципиента и отсутствием четкого понимания того, каким должен быть материал для восстановления связок и сухожилий [4].

На сегодняшний день особый практический интерес представляют неиммуногенные искусственные или биоискусственные имплантаты для регенерации сухожильно-связочного аппарата, способные обеспечивать выполнение функции поврежденной ткани в начальный период времени после имплантации, и одновременно индуцировать морфофункциональное восстановление сухожилий/связок. Ранее авторами работы было предложено использовать для этих целей изготовленный способом электроформования нановолоконный имплантат из полигидроксibuтирата (ПГБ) [5–8]. Разработанный композиционный имплантат состоял из опорных полиамидных нитей и кондуктивного биорезорбируемого нановолоконного материала. Было показано, что уже по истечении 6 нед после внедрения имплантата в область тотально иссеченного ахиллова сухожилия происходит формирование соединительнотканной структуры, соединяющей икроножную мышцу с пяточным бугром и обеспечивающей функциональную роль ахиллова сухожилия у крыс. При этом было отмечено, что нерезорбируемые опорные нити к 6-й неделе после имплантации прорезали мышечную и хрящевую ткань и не обеспечивали связывание мышцы с пяточным бугром. Следующим шагом нашей работы стало создание полностью резорбируемого имплантата для регенерации связок и сухожилий, в котором опорные нити были заменены на рассасывающийся полигликолидный шовный материал.

Цель работы заключалась в выявлении принципиальной возможности индукции морфофункционального восстановления тотально иссеченного ахиллова сухожилия у крыс путем замещения нановолоконным имплантатом на основе ПГБ, изготовленного с применением резорбируемых опорных нитей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали имплантат, изготовленный подобно тому, как описано ранее [5–8], но с применением в качестве опорных нитей шовного материала Дар-Вин USP 5/0, представляющего собой синтетическую рассасывающуюся нить со сроком резорбции 60–90 дней и сроком сдерживания 21–28 дней.

Исследование регенерационного потенциала сухожильных имплантатов проводили на модели тотального дефекта ахиллова сухожилия у крыс линии Wistar (самцы, масса тела 180–200 г), который создавали полным иссечением ахиллова сухожилия от икроножной мышцы до пяточного бугра [9]. Для оценки эффективности восстановления ахиллова сухожилия использовали 2 группы животных по 5 особей в каждой. В опытной группе на обеих задних конечностях крысы полностью иссекали ахиллово сухожилие (рис. 1, а, б). Далее в правой конечности на место иссеченного сухожилия (к икроножной мышце и к пяточному бугру) фиксировали нановолоконный имплантат на опорных нитях (рис. 1, в), а в левой конечности аналогичным образом фиксировали только опорные нити без нановолоконного материала. В отличие от опытной группы во второй группе в правой задней конечности после тотального иссечения сухожилия также фиксировали нановолоконный имплантат (контроль 1), в то время как левая задняя конечность оставалась интактной. В третьей экспериментальной группе правая задняя конечность крыс подвергалась только тотальному иссечению ахиллова сухожилия (без имплантата или опорных нитей, контроль 2), при этом левая задняя конечность оставалась интактной.

Все манипуляции с животными осуществляли в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 10993-2-2009. До и после операции животных содержали в стандартных условиях вивария (корм — *ad libitum*). Все оперативные вмешательства проводили в асептических условиях под ксилазин/золетиловым наркозом.

Для выполнения комплексного гистологического анализа использовали продольные криосрезы нативных сухожилий и экспериментальных образцов новообразованных регенератов, которые подвергали стандартному (гематоксилин и эозин) и дифференциальному (трихром по Лилли, трихром по Массону) гистологическому окрашиванию. Гистотопограммы экспериментальных образцов получали с помощью ПрО NIS-Elements микроскопической станции Nikon Ti-E (Япония).

Количественную оценку возможной патологической минерализации в образцах до и после имплантации проводили методом адсорбционной спектроскопии, используя планшетный ридер Infinity F200



Рис. 1. Модель тотального иссечения ахиллова сухожилия.

а — вид выделенного ахиллова сухожилия крысы; б — тотальное иссечение ахиллова сухожилия от икроножной мышцы до пяточного бугра; в — вид нановолоконного имплантата, фиксированного в месте тотально иссеченного ахиллова сухожилия (места крепления обозначены стрелками).

(«TECAN», Австрия) и стандартный набор Calcium ASFS (Arsenazo III; DiaSys, Германия). Определяли среднее значение и стандартную ошибку среднего значения. Учитывая непараметрическое распределение количественных признаков для выявления разницы в полученных результатах использовали U-критерий Манна — Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Визуальная оценка поведения всех прооперированных животных и анализ их передвижений проводились на протяжении всего эксперимента.

Так же, как и в предыдущем исследовании [5], было отмечено, что, начиная со 2-й недели после имплантации, животные из опытной группы начинали активно использовать для передвижения конечность с замененным на нановолоконный имплантат сухожилием. Начиная с 4-й недели после имплантации, не было разницы в использовании интактных и прооперированных с использованием

нановолоконного имплантата конечностей. В отличие от вышесказанного, те животные, у которых ахиллово сухожилие иссекали полностью и не протезировали либо протезировали только опорными нитями, при движении подволакивали эти лапы, приоритетно используя интактные или с внедренным имплантатом конечности.

В соответствии с поставленными задачами и требованиями стандартов ISO 10993, эксплантация проводилась на сроках как 6, так и 13 нед (13 нед — это пограничный срок выявления последствий субхронической токсичности исследуемых материалов, а также предельный срок исследования эффекта имплантации для резорбируемых материалов) [10, 11]. В образцах, полученных на обоих сроках, мы обнаружили соединительнотканые регенераты на месте всех ПГБ-имплантатов. Макроскопически эти структуры были схожи с нативным сухожилием (рис. 2). Ни в одном из образцов признаков сохранения нановолоконного материала и опорных нитей обнаружено не было, т. е. уже к 6-й неделе после имплантации имела место полная резорбция нановолокон ПГБ.

При гистологическом анализе структуры матрикса 6-недельного неорегенерата и нативного сухожилия было отмечено, что структура новообразованной ткани морфологически была сходна с нативным сухожилием; новообразованный матрикс был преимущественно коллагеновой природы и состоял из утолщенных, но достаточно структурированных и упорядоченных волокон (рис. 3). Также было отмечено, что матрикс регенерата был насыщен эозинофильными областями, свидетельствующими о выраженном процессе перифокального формирования волокнистой соединительной ткани, был неоваскуляризован и равномерно содержал большое количество клеток в структурированном внеклеточном матриксе уже к 6-й неделе после имплантации подобно нативному сухожилию (рис. 3, в, г).

В криосрезах регенератов хорошо визуализировались вытянутые вдоль по длине коллагеновых

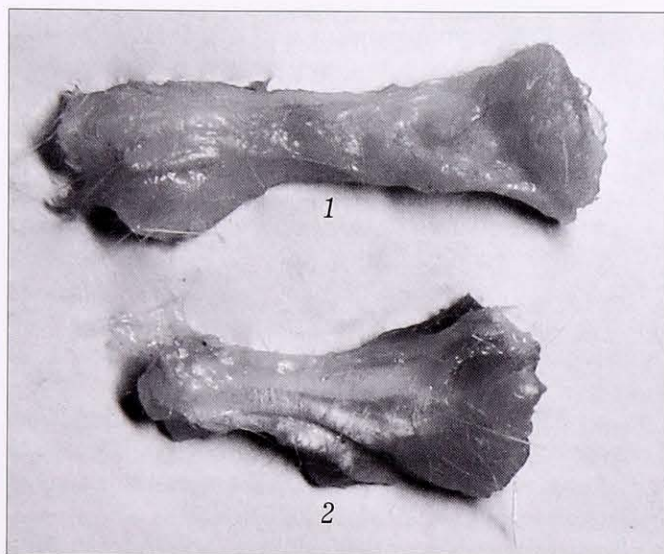


Рис. 2. Внешний вид выделенного новообразованного сухожильноподобного регенерата по прошествии 6 нед после имплантации (1) и нативного ахиллова сухожилие (2).

волокон ядра клеток, что морфологически подобно расположению тендиноцитов в нативном хряще (см. рис. 3, б, г). Из представленных рисунков также видно, что, несмотря на столь малый срок после тотального иссечения нативного сухожилия, общая картина новообразованного регенерата во многом морфологически сходна с таковой контрольного нативного сухожилия.

Гистологический анализ дифференциально окрашенных срезов показал, что в новообразованном регенерате пучки волокон коллагена ориентированы непосредственно вдоль линии нагрузки (оси напряжения) на сухожилие, что соответствует ориентации волокон, характерной для нативного сухожилия, однако сами пучки упорядочены хуже, чем в контрольном образце, и визуально выглядят массивнее. При этом между пучками волокон неорегенерата, в аналогии с нативным сухожилием, расположены тендиноцитоподобные, вытянутые вдоль длинника волокна клетки (см. рис. 3). В дистальных отделах неорегенератов в непосредственной близости от сесамовидного хряща пяточного бугра

волокнистая структура новообразованного сухожилия перемежалась тяжами новообразованной хрящевой ткани, свидетельствующей об активном процессе полноценной регенерации (см. рис. 3, б).

С целью выявления признаков патологического асептического кальциноза исследуемых имплантатов в организме реципиента мы проводили количественное измерение содержания минерализованного кальция в образцах неорегенератов спустя 6 и 13 нед после имплантации. Было установлено статистически значимое ($p < 0,05$) отсутствие признаков минерализации неорегенератов и окружающих их тканей — содержание минерализованного кальция составило $0,1 \pm 0,2$ и $0,2 \pm 0,2$ мг кальция на 1 г сухого веса ткани в опыте и контроле (нативное сухожилие) соответственно.

Полученные результаты указывают на перспективность применения нановолоконных имплантатов для морфофункционального восстановления связок и сухожилий при больших повреждениях. Для выявления механизмов этого процесса, его динамических характеристик требуются дальнейшие исследования. Важно выполнить также сравнительные исследования восстановления связок и сухожилий с использованием нановолоконного имплантата у молодых и пожилых экспериментальных животных. И, наконец, большой интерес

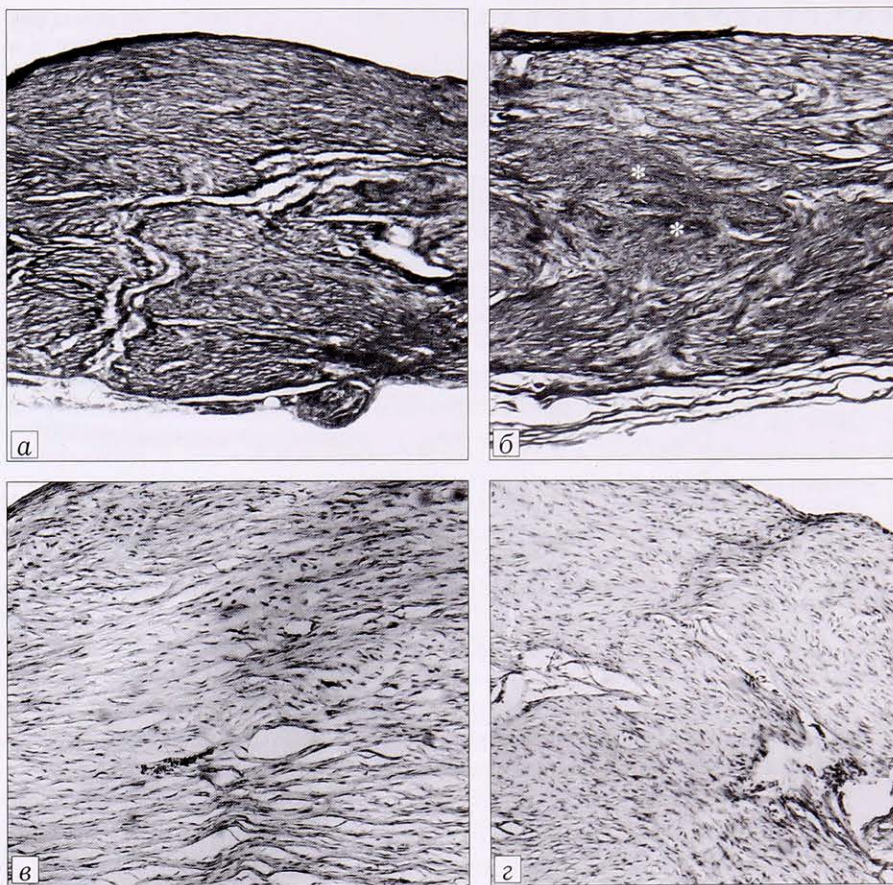


Рис. 3. Фрагменты гистотопограмм продольных срезов части нативного сухожилия (а, в) и неорегенерата сухожилия, образованного на месте нановолоконного имплантата через 6 нед после имплантации (б, г). $\times 100$.

а, б — окраска трихромом по Лилли, в, г — окраска гематоксилином и эозином. Звездочками обозначены хрящеподобные тяжи новообразованной ткани, наблюдающиеся в непосредственной близости от хряща пяточного бугра.

представляют клинические исследования восстановления сухожильно-связочного аппарата различной локализации при повреждениях больших размеров. Наши последующие исследования будут направлены на решение перечисленных задач.

Заключение. В ходе настоящей работы установлено, что через 6 нед после имплантации предложенной конструкции на ее месте формируется соединительнотканый регенерат, полноценно выполняющий функцию ахиллова сухожилия, и в этом регенерате в основном присутствуют зоны, содержащие упорядоченные волокна с организацией, подобной таковой в нативном сухожилии, что максимально выражено в местах сужения перед энтезисом, а также участки внедрения/новообразования хрящевой ткани, также свойственной нормальному нативному сухожилию. Учитывая тот факт, что после тотального удаления нативного сухожилия прошло всего 6 нед, архитектура новообразованного регенерата является необычайно структурированной и функционально сбалансированной.

Работа проведена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН «ФИМТ» (№ ФИМТ-2014-136), ГЗ ВУЗу (Проект № 768), а также Фонда содействия РМП НТС с использованием приборов ЦКП ИТЭБ РАН.

ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]

1. Meier Bürgisser G., Buschmann J. History and performance of implant materials applied as peritendinous antiadhesives. *J. Biomed. Mater. Res B Appl. Biomater.* 2015; 103 (1): 212–8.
2. Doroski D.M., Brink K.S., Temenoff J.S. Techniques for biological characterization of tissue-engineered tendon and ligament. *Biomaterials.* 2007; 28 (2): 187–202.
3. Cooper J.A., Lu H.H., Ko F.K., Freeman J.W., Laurencin C.T. Fiber-based tissue-engineered scaffold for ligament replacement: design considerations and in vitro evaluation. *Biomaterials.* 2005; 26 (13): 1523–32.
4. Jaibaji M. Advances in the biology of zone II flexor tendon healing and adhesion formation. *Ann. Plast. Surg.* 2000; 45: 83–92.
5. Склянчук Е.Д., Ольхов А.А., Акатов В.С., Гурьев В.В., Иорданский А.Л., Филатов Ю.Н. и др. Способ повышения регенерационного потенциала имплантатов для восстановительной хирургии соединительной ткани. Патент на изобретение РФ №2561830 от 10.09.2015. [Sklyanchuk E.D., Ol'khov A.A., Akatov V.S., Gur'ev V.V., Iordanskiy A.L., Filatov Yu.N., et al. Method to increase the regeneration potential of implants for restorative surgery of the connective tissue. Patent RF, N 2561830; 2015 (in Russian)].
6. Ольхов А.А., Склянчук Е.Д., Аббасов Т.А., Акатов В.С., Фадеева И.С., Фадеев Р.С. и др. Регенерационный потенциал нановолоконного сухожильного имплантата из полигидроксибутирата. Технологии живых систем. 2015; 12 (2): 3–11 [Ol'khov A.A., Sklyanchuk E.D., Abbasov T.A., Akatov V.S., Fadeeva I.S., Fadeev R.S., et al. Regeneration potential of a new tendon implant made of polyhydroxybutyrate nanofibers. *Tekhnologii zhivyykh system.* 2015; 12 (2): 3–11 (in Russian)].
7. Ольхов А.А., Староверова О.В., Гурьев В.В., Аббасов Т.А., Орлов Н.А., Ищенко А.А. и др. Матрицы для тканевой инженерии на основе модифицированных нановолокон поли-(3-гидроксибутирата), полученных методом электроформования. Физика волокнистых материалов: структура, свойства, наукоемкие технологии и материалы (SMARTEX). 2016; 1 (1): 57–68 [Ol'khov A.A., Staroverova O.V., Gur'ev V.V., Abbasov T.A., Orlov N.A., Ishchenko A.A., et al. Matrix for tissue engineering based on modified nanofibers of poly (3-hydroxybutyrate), prepared by electrospinning. *Fizika voloknistykh materialov: structura, svoistva, naukoymkie tekhnologii i materialy (SMARTEX).* 2016; 1 (1): 57–68 (in Russian)].
8. Жаркова И.И., Староверова О.В., Воинова В.В., Андреева Н.В., Шушкевич А.М., Склянчук Е.Д. и др. Биосовместимость матриц для тканевой инженерии из поли-3-оксибутирата и его композитов, полученных методом электроформования. Биомедицинская химия. 2014; 60 (5): 553–60 [Zharkova I.I., Staroverova O.V., Voinova V.V., Andreeva N.V., Shushkevich A.M., Sklyanchuk E.D., et al. Biocompatibility of electrospun poly(3-hydroxybutyrate) and its composites scaffolds for tissue engineering. *Biomeditsinskaya khimiya.* 2014; 60 (5): 553–60 (in Russian)].
9. Корнилов Д.Н., Попов И.В., Раевская Л.Ю., Гольдберг О.А., Лепехова С.А. Реконструктивная операция на ахилловом сухожилии крысы: Этапы оперативного вмешательства, топографо-анатомическое обоснование. Сибирский медицинский журнал. 2014; 125 (2): 35–8 [Kornilov D.N., Popov I.V., Raevskaya L.Yu., Gol'dberg O.A., Lepekhova S.A. Reconstructive surgery on rat's achilles tendon: stages of surgical intervention, topographic-anatomical background. *Sibirskiy vtlbitsinskiy zhurnal.* 2014; 125 (2): 35–8 (in Russian)].
10. ГОСТ ISO 10993-1-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка и исследование» [GOST R ISO 10993-1-2011. Medical devices. Biological evaluation of medical devices. Part 1. Evaluation and testing (in Russian)].
11. ГОСТ ISO 10993-6-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследования местного действия после имплантации» [GOST R ISO 10993-6-2011. Medical devices. Biological evaluation of medical devices. Part 6. Tests for local effects after implantation (in Russian)].

Сведения об авторах: Сенотов А.С. — науч. сотр. лаборатории фармакологической регуляции клеточной резистентности ИТЭБ РАН; Ольхов А.А. — канд. техн. наук, старший науч. сотр. лаборатории перспективных материалов и технологий РЭУ им. Г.В. Плеханова, старший науч. сотр. лаборатории диффузионных явлений в полимерных системах ИХФ им. Н.Н. Семенова; Склянчук Е.Д. — доктор мед. наук, профессор каф. травматологии, ортопедии и военно-полевой хирургии МГМСУ им. А.И. Евдокимова, зав. ортопедическим отделением Дорожной клинической больницы им. Н.А. Семашко на станции Люблино ОАО «РЖД»; Фадеева И.С. — канд. биол. наук, старший науч. сотр. лаборатории тканевой инженерии ИТЭБ РАН; Фадеев Р.С. — канд. биол. наук, старший науч. сотр. лаборатории фармакологической регуляции клеточной резистентности ИТЭБ РАН; Фесенко Н.И. — канд. биол. наук, доцент Учебного центра биофизики и биомедицины ПущГЕНИ; Просвирина А.А. — ассистент кафедры травматологии, ортопедии и военно-полевой хирургии МГМСУ им. А.И. Евдокимова; Лекишвили М.В. — доктор мед. наук, зав. лабораторией «Тканевой банк» ЦИТО им. Н.Н. Приорова; Гурьев В.В. — доктор мед. наук, профессор каф. травматологии, ортопедии и военно-полевой хирургии МГМСУ им. А.И. Евдокимова, рук. Центра травматологии и ортопедии Дорожной клинической больницы им. Н.А. Семашко на станции Люблино ОАО «РЖД»; Иорданский А.Л. — доктор хим. наук, профессор, зав. лабораторией диффузионных явлений в полимерных системах ИХФ им. Н.Н. Семенова; Акатов В.С. — доктор физ.-мат. наук, профессор, зав. лабораторией тканевой инженерии ИТЭБ РАН.

Для контактов: Акатов Владимир Семенович. 142290, Пущино, ул. Институтская, д. 3. Тел.: 8 (496) 773-49-52. E-mail: akatov.vladimir@gmail.com.