

© Коллектив авторов, 2012

ВЛИЯНИЕ КОСТНОГО МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОГО БЕЛКА 2 В СОСТАВЕ БИОКОМПОЗИЦИОННОГО МАТЕРИАЛА НА КОСТЕОБРАЗОВАНИЕ И МИНЕРАЛИЗАЦИЮ КОСТИ

С.П. Миронов, С.С. Родионова, А.Н. Торгашин, Л.А. Семенова

ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова»
Минздравсоцразвития России, ФГБУ «Научно-исследовательский институт ревматологии РАМН», Москва

В эксперименте на 40 крысах изучали влияние костного морфогенетического белка (КМБ-2) при его локальном применении совместно с деминерализованным лиофилизированным костным имплантатом (ДЛКИ) на процесс костеобразования и минеральную плотность кости в зоне хирургического вмешательства (дефект кости) и во всем сегменте (большеберцовая кость). Животных разделили на 2 группы: у крыс опытной группы зону дефекта заполняли ДЛКИ и КМБ-2, контрольной — только ДЛКИ. При балльной оценке морфологических изменений статистически достоверных различий между группами на сроках 7 и 12 нед не выявлено. Однако в опытной группе в отличие от контроля на сроке 12 нед преобладали случаи выраженного костеобразования с полной перестройкой костного имплантата. Отмечено, что использование КМБ-2 в комбинации с ДЛКИ достоверно повышает минеральную плотность кости как в зоне хирургического вмешательства, так и во всем сегменте. Данный факт расценен как свидетельство позитивного влияния КМБ-2 на механическую прочность формирующегося регенерата.

Ключевые слова: костный морфогенетический белок, костнопластические материалы, биокomпозиционный материал, перестройка костного имплантата, костеобразование, минеральная плотность костной ткани, ремоделирование кости.

Influence of Bone Morphogenetic Protein in Composition of Biocomposite Material upon Osteogenesis and Bone Mineralization

S.P. Mironov, S.S. Rodionova, A.N. Torgashin, L.A. Semenova

Influence of bone morphogenetic protein (BMP-2) in its local application in combination with demineralized lyophilized bone implant (DLBI) upon the process of osteogenesis and bone mineral density in the zone of surgical intervention and the whole segment (tibia) was studied in experiment (40 rats). The animals were divided into 2 groups. In animals from the study group the defect zone was filled with both DLBI and BMP-2 while in control group only with DLBI. In evaluation of morphologic changes by points at terms 7 and 12 weeks no reliable differences between the groups were noted. However at 12 weeks in study group cases of marked osteogenesis with full remodeling of bone implant were observed. It was shown that use of BMP-2 in combination with DLBI reliably increased bone mineral density both in the zone of surgical intervention and in the segment as a whole. That fact was regarded as the evidence of BMP-2 positive effect upon the mechanical strength of the forming regenerate.

Key words: bone morphogenetic protein, bone plastic materials, biocomposite material, remodeling of bone implant, osteogenesis, bone mineral density, bone remodeling.

Возросший в последние годы интерес к применению костнопластических и биокomпозиционных материалов, способных активизировать регенерацию кости в области дефекта, связан прежде всего с ростом заболеваемости болезнями опорно-двигательного аппарата и высокой частотой неудовлетворительных результатов оперативно-го лечения [3]. Для замещения дефектов костные импланты стали применять совместно с локальными факторами роста костной ткани, такими как

инсулиноподобные ростовые факторы (ИРФ-1, ИРФ-2), ростовой фактор фибробластов, трансформирующий фактор роста Р, ростовой фактор тромбоцитарного происхождения, остеокластактивирующий фактор [13]. Развитие генной инженерии и технологий микробиологического синтеза с возможностью производства определенных пептидов повысило интерес к применению костного морфогенетического белка (КМБ) как одного из факторов роста костной ткани [4].

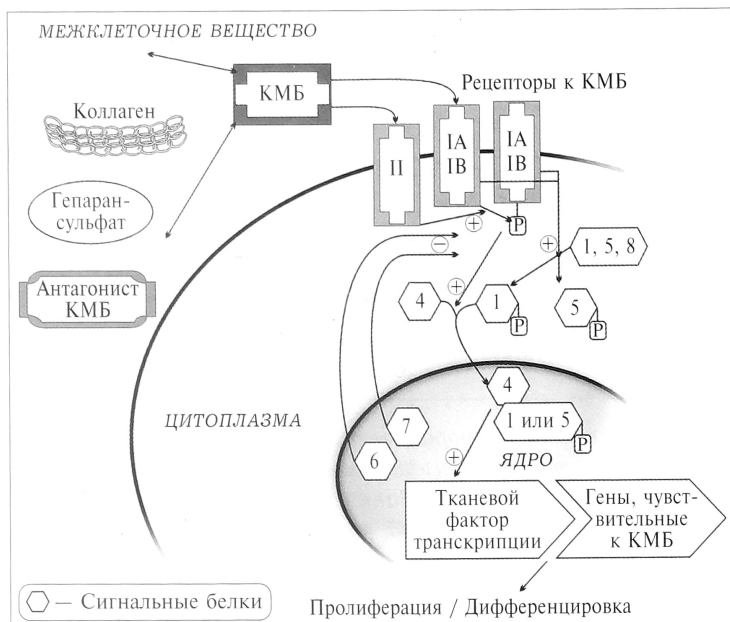


Рис. 1. Механизм действия КМБ [11].

В межклеточном веществе имеются молекулы, такие как коллаген и гепарансульфат, связывающие КМБ и определяющие его биодоступность для рецепторов. Также есть специфические антагонисты КМБ (Noggin, Chordin, Gremlin, DAN), которые связывают КМБ подобно тому, как это делает рецептор к КМБ на клетках. Морфогенетические белки связываются с рецепторами I и II, после чего активизируется каскад реакций фосфорилирования сигнальных белков 1, 5 и 8. Далее фосфорилированные сигнальные белки 1 и 5 связываются с сигнальным белком 4, и все они проникают в ядро, активируя механизм транскрипции и тем самым влияя на пролиферацию и дифференцировку клеток. Сигнальные белки 6 и 7 находятся внутри ядра и, выходя из него, препятствуют фосфорилированию сигнальных белков 1, 5 и 8.

КМБ (димерная молекула, содержащая цепи из 120 и 140 аминокислот соответственно, соединенные тремя дисульфидными связями) [7], воздействуя на рецепторы клеточных мембран, влияет на процессы роста, дифференцировки и апоптоз различных типов клеток [14], включая остеобласты и хондробласты (рис. 1).

Проводимые с начала 1990-х годов эксперименты с применением КМБ [5, 20], в том числе в комбинации с костными имплантатами [17], показали, что их стимулирующая активность зависит от многих факторов: величины дефекта, травматичности операции и плотности аллотрансплантата [16]. Было установлено, что при обширном дефекте костной ткани КМБ оказывают большее воздействие на костную ткань, нежели при малотравматичном вмешательстве [6]. Наиболее оптимальным считается применение КМБ совместно с деминерализованным костным матриксом, так как его коллаген обладает естественной способностью соединяться с белком [21]. Однако не все исследователи [15] смогли подтвердить в экспериментах увеличение интенсивности регенерации кости под влиянием КМБ. Так, при совместном применении КМБ и костных трансплантатов [19] было отмечено замедление вставания костной ткани в структуру аллотрансплантата. Неоднозначное действие КМБ и появление КМБ отечественного производства заставляют продолжать экспериментальные исследования в этой области.

Целью исследования была оценка влияния КМБ-2 на костеобразование и минеральную плотность костной ткани в зоне вмешательства.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовался костно-пластический материал в виде кусочков деминерализованного лиофилизированного костного имплантата (ДЛКИ), соединенного с КМБ-2. Костный имплантат изго-

тавливали в костном банке ЦИТО. Синтез рекомбинантного КМБ и его соединение с ДЛКИ проводились в ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи по методике [18]. Количество белка в аллотрансплантате составляло 0,6–0,8 мг/см³. Стерилизация биокомпозиционного материала осуществлялась потоком быстрых электронов в дозе 20 кГр в Московском физико-техническом институте.

В эксперименте использовано 40 белых нелинейных крыс-самок массой тела 130–150 г. Животные были разделены на 2 группы по 20 крыс в каждой. В большеберцовой кости животных при помощи бора формировали дефект длиной 5 мм, шириной 2 мм, глубиной 1–2 мм [1]. У животных опытной группы дефект заполняли ДЛКИ, содержащим КМБ-2, контрольной группы — ДЛКИ без КМБ-2. По 10 животных из опытной и контрольной групп были выведены из эксперимента на 7-й неделе, остальные — на 12-й неделе путем передозировки снотворного средства с соблюдением требований международной конвенции об использовании животных в эксперименте.

Влияние КМБ-2 на перестройку костного имплантата и остеогенез оценивали морфологически (световой микроскоп Zeiss Axioskop 40). Исследовали серийные срезы толщиной 6–8 мкм декальцированной кости, залитой в парафин, — как из зоны хирургического вмешательства, так и из прилегающей области. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином. Одно животное из группы контроля умерло до вывода из эксперимента.

Интенсивность костеобразования и характер изменений в области костного имплантата оценивали в баллах: 1 балл — слабое костеобразование (область костного дефекта заполнена рыхлой волокнистой тканью и фрагментами костного имплантата, представленными безостеоцитными костными балками) (рис. 2); 2 балла — умеренное

костеобразование (в проекции дефекта имеются очаги новообразованной зрелой костной ткани вокруг костного имплантата или краевое костеобразование на основе хрящевой ткани с остатками костного имплантата) (рис. 3); 3 балла — выраженное костеобразование (область дефекта заполнена новообразованной зрелой костной тканью без остатков костного имплантата) (рис. 4).

Кроме морфологической оценки в эксперименте проводилось исследование минеральной плотности кости (МПК) в зоне вмешательства и во всем сегменте с помощью рентгеновской денситометрии. Для этого ампутировали конечность животного на уровне нижней трети бедра. Массу костной ткани (в граммах на 1 см²) определяли на денситометре Hologic с помощью компьютерной программы для мелких животных. Зоны исследования выделяли в ручном режиме по методике, описанной ранее [2].

При сравнении костеобразования в группе контроля и опытной группе на 7-й и 12-й неделе использован U-критерий Манна — Уитни. Так как выборки показателей денситометрии соответствовали нормальному распределению (по тесту Колмогорова — Смирнова), для дальнейшего анализа был применен независимый t-критерий. Статистические расчеты выполняли с помощью программы SPSS с уровнем значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Статистически достоверных различий в морфологической оценке костеобразования в группах сравнения на обоих сроках наблюдения выявлено не было (табл. 1).

Однако детальное изучение качества образованной костной ткани в зоне дефекта (соотношение числа случаев слабого, умеренного и выраженного костеобразования) показало, что на сроке 12 нед в опытной группе в отличие от контрольной преобладали случаи выраженного костеобразования с наличием зрелой костной ткани: соответственно 7 из 10 против 4 из 10 (рис. 5).

Одним из количественных критериев оценки процесса регенерации костной ткани является показатель МПК. В нашем исследовании МПК оценивали как в зоне хирургического вмешательства, так и во всем сегменте (большеберцовая кость) (табл. 2).

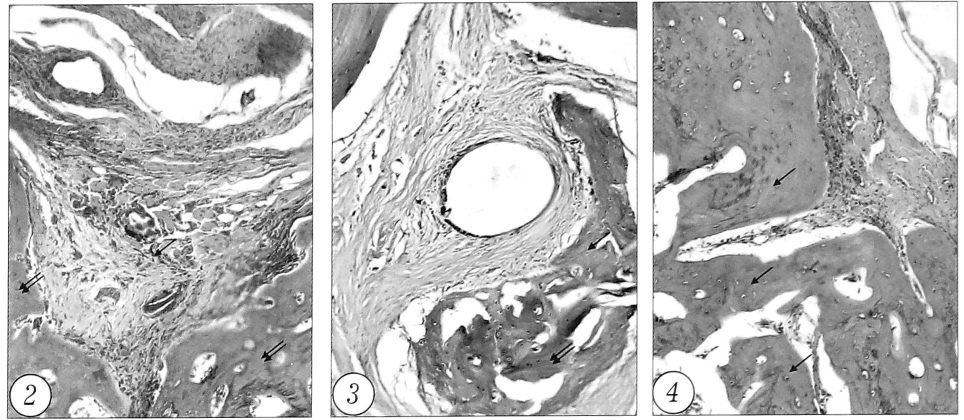


Рис. 2. Фрагмент большеберцовой кости, область дефекта кости.

Волокнистая соединительная ткань (стрелка) — слабое костеобразование (1 балл); кортикальная часть диафиза большеберцовой кости (двойные стрелки). Гистологический препарат. Окраска гематоксилином и эозином, ув. 50.

Рис. 3. Фрагмент большеберцовой кости, область дефекта кости.

Новообразованная зрелая пластинчатая костная ткань (стрелка) с остатками костного лиофилизированного деминерализованного имплантата (двойная стрелка) — умеренное костеобразование (2 балла). Гистологический препарат. Окраска гематоксилином и эозином, ув. 200.

Рис. 4. Фрагмент большеберцовой кости, область дефекта кости.

Новообразованная зрелая пластинчатая костная ткань (стрелки) без остатков костного лиофилизированного деминерализованного имплантата — выраженное костеобразование (3 балла). Гистологический препарат, окраска гематоксилином и эозином, ув. 200.

Табл. 1. Оценка процесса костеобразования в группах сравнения ($M \pm m$)

Срок наблюдения		Оценка процесса костеобразования, баллы	p
7-я неделя	основная группа	$1,9 \pm 0,233$	0,1
	контрольная группа	$2,4 \pm 0,163$	
12-я неделя	основная группа	$2,5 \pm 0,268$	0,4
	контрольная группа	$2,0 \pm 0,333$	

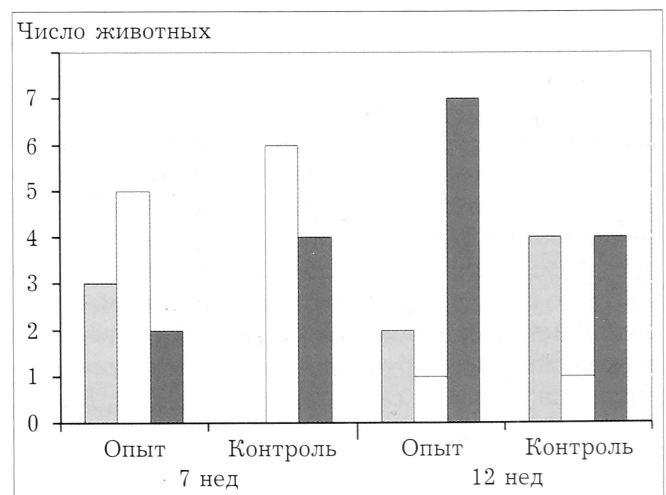


Рис. 5. Распределение животных в соответствии с выраженностью процесса костеобразования в разные сроки наблюдения.

Костеобразование:

■ — слабое, □ — умеренное, ■ — выраженное.

Табл. 2. Показатели МПК в зоне дефекта и во всем сегменте (большеберцовая кость) в группах сравнения

Срок наблюдения		МПК, г/см ²	
		зона дефекта	весь сегмент (большеберцовая кость)
7-я неделя	основная группа	0,226 (0,179–0,231)	0,242 (0,222–0,262)
	контрольная группа	0,205 (0,189–0,223)	0,214 (0,202–0,226)
12-я неделя	основная группа	0,284 (0,257–0,311)	0,268 (0,250–0,286)
	контрольная группа	0,235 (0,209–0,261)	0,233 (0,218–0,248)

Примечание. Данные представлены как среднее. В скобках указан 95% доверительный интервал выборочного среднего — две стандартные ошибки.

Выявлено, что к 7-й неделе минеральная плотность большеберцовой кости у животных контрольной группы оказалась достоверно ниже, чем в опытной — соответственно $0,214 \pm 0,012$ г/см² против $0,242 \pm 0,02$ г/см² ($p=0,027$). В зоне дефекта к этому сроку существенных различий значений МПК в группах не отмечено.

Достоверно более низкой оставалась минеральная плотность большеберцовой кости в контрольной группе и спустя 12 нед после начала эксперимента — соответственно $0,233 \pm 0,015$ г/см² против $0,268 \pm 0,018$ г/см² в опытной группе ($p=0,009$).

Кроме того, к этому сроку выявились достоверные различия МПК между группами и в зоне хирургического вмешательства: МПК в контрольной группе была ниже, чем в опытной и составила соответственно $0,235 \pm 0,025$ г/см² против $0,284 \pm 0,027$ г/см² ($p=0,02$).

Раздельный по группам анализ динамики МПК в исследуемые сроки выявил, что в опытной группе в отличие от контроля МПК в зоне хирургического вмешательства достоверно увеличивалась ($p=0,007$). МПК всего сегмента в опытной группе также имела выраженную тенденцию к увеличению (см. табл. 2).

Что касается динамики МПК в группе контроля, то к 12-й неделе отмечена только тенденция к росту МПК как в зоне хирургического вмешательства ($p=0,07$), так и во всем сегменте ($p=0,068$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Процесс регенерации костной ткани в ряде случаев нарушается, как, например, при вращении новой кости в структуру аллотрансплантатов, используемых при ортопедических операциях, в том числе по поводу псевдоартрозов. Причиной нарушений метаболизма костной ткани могут стать как дооперационные нарушения, так и изменения, возникшие в процессе самого вмешательства. В этой связи остается актуальным поиск методов и средств, способных оказывать влияние на механизмы ремоделирования костной ткани и тем самым на достижение желаемого клинического эффекта [8]. Одним из направлений коррекции такого рода нарушений является использование КМБ, которые активируют остеобласты. Однако было отмечено, что наряду с усилением под их влиянием вращающейся костной ткани в структуру костного

имплантата происходит перестройка последнего, сопровождающаяся снижением механической прочности и, как следствие, ухудшением клинического эффекта. Эти данные касались как экспериментальных исследований [22], так и клинических наблюдений при лечении переломов и ложных суставов [14]. Возможность подобного осложнения объясняют тем, что КМБ оказывает влияние на морфогенез не только остеобластов, но и остеокластов [10]. В этой ситуации усиливаются процессы и костеобразования, и резорбции, т.е. ремоделирование переходит на другой, более высокий по сравнению с физиологическим уровень. Последнее, как известно [9], может приводить к снижению механической прочности кости и развитию ряда осложнений. Ранее [12] было продемонстрировано рассасывание фрагментов компрессированного тела позвонка после введения в него КМБ-7. В более поздней работе [9] описано преждевременное рассасывание костных трансплантатов вокруг эндопротеза при их применении совместно с КМБ.

Описанные осложнения все чаще связываются с использованием завышенных концентраций КМБ. По мнению некоторых исследователей [10], в этих случаях активация остеокластов сопровождается ускоренным переходом остеобластов в состояние остеоцитов, что в свою очередь может препятствовать образованию новой полноценной костной ткани [16].

В нашем исследовании использовался КМБ-2 в концентрации $0,6–0,8$ мг/см³. Сравнительный анализ процесса костеобразования не выявил достоверных различий между группами. Однако в группе животных, где использовались ДЛКИ, соединенные с рекомбинантным КМБ-2, в отличие от контроля преобладали случаи выраженного костеобразования, сопровождавшегося формированием зрелой костной ткани, которая, как показала последующая оценка, обладает большей механической прочностью.

Так, уже к 7-й неделе минеральная плотность большеберцовой кости животных опытной группы была достоверно больше, чем в контроле. И хотя к этому сроку достоверных отличий МПК в зоне вмешательства между группами не наблюдалось, можно было косвенно судить о положительном влиянии КМБ на ремоделирование — не происходило характерного для стрессового ремоделирования сни-

жения МПК в участках, прилежащих к зоне хирургического вмешательства. Отмеченный к 12-й неделе в опытной группе достоверный по сравнению с контролем прирост МПК как в целом в сегменте, так и в зоне вмешательства стал убедительным доказательством того, что увеличивается прочность не только сегмента в целом, но и костной ткани в зоне внедрения костного имплантата.

Таким образом, результат комплексной оценки процесса перестройки ДЛКИ показал, что его соединение с КМБ-2 в концентрации 0,6–0,8 мг/см³ способствует образованию достаточного количества костной ткани, обладающей большей механической плотностью, чем регенерат, формирующийся при использовании только ДЛКИ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Родионова С.С., Торгашин А.Н., Подурец К.М. и др. Рефракционная интроскопия и двухэнергетическая рентгеновская абсорбциометрия в оценке костеобразования // Вестн. травматол. ортопед. — 2010. — № 3. — С. 34–42.
2. Родионова С.С., Торгашин А.Н., Лекишвили М.В. и др. Влияние бисфосфонатов в составе биокомпозиционного материала на костеобразование и минерализацию кости // Вестн. травматол. ортопед. — 2011. — № 2. — С. 59–66.
3. Склянчук Е.Д., Зоря В.И., Гурьев В.В., Просвирун А.А. Транскортикальная комбинированная пластика ложных суставов костей конечностей // Вестн. травматол. ортопед. — 2009. — № 3. — С. 80–85.
4. Burkus J.K., Sanghu H.S., Gornet M.F., Longley M.C. Use of rhBMP-2 in combination with structural cortical allografts: clinical and radiographic outcomes in anterior lumbar spinal surgery // J. Bone Jt Surg. — 2005. — Vol. 87A, N 6. — P. 1205–1212.
5. Cook S.D., Baffes G.C., Wolfe M.W. et al. The effect of Recombinant Human Osteogenic Protein-1 on healing of large segmental bone defects // J. Bone Jt Surg. (Am). — 1994. — Vol. 76, N 6. — P. 827–838.
6. Govender S., Csimma C., Genant H.K. et al. Evaluation in surgery for tibial trauma (BESTT) Study Group: recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients // J. Bone Jt Surg. (Am). — 2002. — Vol. 84. — P. 2123–2134.
7. Griffith D.L., Keck P.C., Sampath T.K. et al. Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1; Structural paradigm for transforming growth factor . superfamily // Proc. Natl. Acad. Sci. — 1996. — Vol. 93. — P. 878–883.
8. Hooten J.P., Engh C.A., Heekin R.D. et al. Structural bulk allografts in acetabular reconstruction // J. Bone Jt Surg. (Br). — 1996. — Vol. 78. — P. 270–275.
9. Hostner J., Karrholm J., Hultmark P. Early failures after femoral revisions using milled allograft bone mixed with OP-1. Poster presentation 2000; SOF 2000: 205–206.
10. Kaneko H., Arakawa T., Mano H. et al. Direct stimulation of osteoclastic bone resorption by Bone Morphogenetic Protein (BMP-2) and expression of BMP receptors in mature osteoclasts // Bone. — 2000. — Vol. 27, N 4. — P. 479–486.
11. Kirker-Head C.A. Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins // Adv. Drug. Deliv. Rev. — 2000. — Vol. 43, N 1. — P. 65–92.
12. Laursen M., Hoy K., Hansen E.S. et al. Recombinant bone morphogenetic protein-7 as an intracorporeal bone growth stimulator in thoracolumbar burst fractures in humans; preliminary results // Eur. Spine J. — 1999. — Vol. 8. — P. 485–490.
13. Peidro L., Segur J. M., Poggio D. et al. Use of freeze-dried bone allograft with platelet-derived growth factor for revision of a glenoid component // J. Bone Jt Surg. (Br). — 2006. — Vol. 88. — P. 1228–1231.
14. Reddi A.H. Bone Morphogenetic Proteins: From basic science to clinical applications // J. Bone Jt Surg. (Am). — 2001. — Vol. 83, Suppl 1 (Pt 1). — P. 1–6.
15. Sciadini M., Dawson J., Berman L. et al. Dose response characteristics of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in a canine segmental defect model (abstract) // Trans. Orthop. Res. Society. — 1995. — Vol. 20. — P. 594.
16. Tagil M., Aspenberg P. Impaction of cancellous bone grafts impairs osteoconduction in titanium chambers // Clin. Orthop. — 1998. — Vol. 352. — P. 231–238.
17. Tagil M., Jeppsson C., Aspenberg P. Bone graft incorporation: effects of osteogenic protein-1 and impaction // Clin. Orthop. — 2000. — Vol. 371. — P. 240–245.
18. Tuin A., Kluijtmans S.G., Bouwstra J.B. et al. Recombinant gelatin microspheres: novel formulations for tissue repair? // Tissue Eng Part A. — 2010. — Vol. 16, N 6. — P. 1811–1821.
19. Vaidya R., Weir R., Sethi A. et al. Interbody fusion with allograft and rhBMP-2 leads to consistent fusion but early Subsidence // J. Bone Jt Surg. (Br). — 2007. — Vol. 89. — P. 342–345.
20. Wang E.A., Rosen V., Alessandro J.S. et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation // Proc. Natl. Acad. Sci. — 1990. — Vol. 87. — P. 2220–2224.
21. Winn S.R., Uludag H., Hollinger J.O. Sustained release emphasizing recombinant human bone morphogenetic protein-2 // Adv. Drug. Deliv. Rev. — 1998. — Vol. 31, N 3. — P. 303–318.
22. Yasko A.W., Lane J.M., Fellingner E.J. et al. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2): a radiographic, histological, and biomechanical study in rats // J. Bone Jt Surg. (Am). — 1992. — Vol. 74. — P. 659–670.

Сведения об авторах: Миронов С.П. — академик РАН и РАМН, доктор мед. наук, директор ЦИТО; Родионова С.С. — профессор, доктор мед. наук, руководитель научно-клинического центра остеопороза ЦИТО; Торгашин А.Н. — науч. сотр. научно-клинического центра остеопороза ЦИТО; Семенова Л.А. — канд. мед. наук, старший науч. сотр. лаборатории морфогенеза НИИ ревматологии.

Для контактов: Родионова Светлана Семеновна. 127299, Москва ул. Приорова, дом 10, ЦИТО, научно-клинический центр остеопороза. Тел.: 8 (495) 601-44-07. E-mail: S-S-Rodionova@yandex.ru