

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

© Коллектив авторов, 2002

### СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ОПТИМИЗАЦИИ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

Н.П. Омельяненко<sup>1</sup>, С.П. Миронов<sup>1</sup>, Ю.И. Денисов-Никольский<sup>2</sup>,  
И.В. Матвейчук<sup>2</sup>, А.И. Дорохин<sup>1</sup>, И.Н. Карпов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Центральный институт травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова

<sup>2</sup>Научно-исследовательский центр биомедицинских технологий, Москва



Репаративная регенерация костной ткани характеризуется многоэтапностью течения. От момента повреждения кости до завершения репарации, т.е. до образования морфологически зрелой костной ткани, заполняющей костный дефект, и полноценного восстановления функции кости, проходит достаточно много времени. При этом четко прослеживаются общие закономерности развития репаративного процесса, а специфические особенности зависят от условий, в которых он протекает, и от потенциалов остеогенных клеточных элементов.

При точной репозиции и хорошей фиксации костных отломков, сохранности кровоснабжения зоны повреждения кости у молодых пациентов с неотягощенным анамнезом репаративный процесс имеет благоприятное течение и исход. Пожилой возраст, обширные костные дефекты, нарушение кровоснабжения зоны перелома, наследственные заболевания соединительной ткани, ослабление организма, связанное с перенесенными заболеваниями, и т.п. снижают способность организма к остеогенезу. Восстановление поврежденных костей в этих случаях может оказаться неполноценным или замедленным.

Поиск путей влияния на репаративный остеогенез рассматривается как одна из актуальных проблем биологии и медицины. Решение ее возможно посредством оптимизации внутритканевой среды в зоне регенерации, а также активации остеогенеза с выходом за пределы генетического алгоритма остеогенных клеток и их предшественников, характерного для естественного течения репаративной регенерации. При этом необходимо учитывать, что основным механизмом как физиологической, так и репаративной костной регенерации является пролиферация и дифференцировка предшественников остеогенных клеток, находящихся в перистеме и эндосте.

В настоящее время известно несколько способов стимуляции репаративной регенерации [14]:

1) трансплантация детерминированных остеогенных продромальных клеток (ДОПК), обладающих собственной потенцией костеобразования, — *остеобластический остеогенез* [15];

2) воздействие специфическими субстанциями, к которым принадлежит костный морфогенетический белок (BMP — bone morphogenetic protein),

точнее, семейство морфогенетических белков, индуцирующих фенотипическое преобразование полипотентных стволовых соединительнотканых клеток, или индуцибельных остеопродромальных клеток [15], в остеобласты — *остеоиндуктивный остеогенез*, или *остеоиндукция* [46];

3) воздействие факторами, стимулирующими новообразование кости (TGF- $\beta$ , IGF-I, IGF-II, PDGF, bFGF, aFGF, BMPs), — *стимулированный остеогенез*. Эти факторы постоянно присутствуют в нативной костной ткани и являются медиаторами клеточной пролиферации и дифференцировки, ангиогенеза и минерализации как при физиологической, так и при репаративной регенерации костной ткани [41];

4) пассивная стимуляция ДОПК с помощью аллогенных костных трансплантатов, синтетических либо полусинтетических заменителей кости — *остеоиндуктивный остеогенез*, или *остеоиндукция* [28]. Имплантаты искусственного или биологического происхождения в этом случае являются остовом (кондуктором) для прорастания кровеносных сосудов, после чего происходит вращение клеток (остеобластов) из костного ложа.

Способ воздействия на репаративную регенерацию путем трансплантации ДОПК, обладающих собственной потенцией к остеогенезу [15], авторы обозначили как *остеобластический остеогенез*. Однако это название слишком общо. В организме нет другого остеогенеза кроме остеобластического. Правильнее было бы определить данный способ как *трансплантационный остеогенез*. Рождение его связано с совершенствованием метода выращивания клеточных культур и появлением возможности выделять из костного мозга стволовые полипотентные соединительнотканые клетки, культивировать их и наращивать их количество до необходимой для «реэкспорта» в костный дефект клеточной массы [15]. Однако из-за сложности и высокой стоимости культивирования предшественников остеобластов, короткого срока жизни клеток вне питательной среды этот способ пока не получил широкого применения.

В основе остеоиндуктивного и стимулированного остеогенеза лежит активирование морфогенетическими белками и/или факторами роста коммитированных клеток-предшественников остео-

бластов в периосте и эндосте либо полипотентных стволовых соединительнотканых клеток в костном мозге.

В настоящее время из костной ткани выделено и идентифицировано 15 типов BMP, действующих на разных этапах фенотипирования индуцибельных остеопродромальных клеток в остеобласты. Каждый тип костного морфогенетического белка состоит из 4–5 субъединиц. Морфогенетическими свойствами обладает только одна его часть, являющаяся гидрофобным гликопротеидом [45]. Биологическую активность в максимальной степени проявляет кислоторастворимая форма BMP. Поэтому чем больше в кости кислоторастворимой формы BMP, тем выше ее остеоиндуктивная активность. Значимое проявление остеоиндуктивности имеют белковые субъединицы BMP-2, 3, 4, 6, 7 [39, 41]. Более всего в этом плане изучены в эксперименте на животных два морфогенетических белка — BMP-2 и BMP-7 [27,40].

Доказательством остеоиндуктивности BMP служит появление после эктопической имплантации этих субстанций энхондральной оссификации, чего не наблюдается при имплантации других материалов [12, 45, 46]. Согласно современным представлениям, комплекс BMPs влияет на дифференцировку полипотентных стволовых клеток в хондроциты или остеобласты, ускоряет созревание и кальцификацию костного матрикса [19]. Некоторые морфогенетические протеины — BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-6, BMP-7 определяют путь дифференцировки полипотентных мезенхимальных клеточных линий в остеобластическую линию [16, 17].

Наряду с BMPs костная ткань содержит трансформирующий  $\beta$ -фактор роста (TGF- $\beta$ ), эпидермальный фактор роста (PDGF), инсулиноподобные факторы роста I и II (IGF-I, IGF-II), основной и кислотный факторы роста фибробластов (bFGF и aFGF) [41]. Эти факторы роста комплексируются с цитоплазматическими рецепторами клеток-мишеней, активируют внутриклеточные ферменты, их многоступенчатую (каскадную) систему, конечными продуктами которой могут быть несколько биологически активных соединений, регулирующих многие стороны внутри- и внеклеточного метаболизма [2].

Локальное применение различных факторов роста влияет на пролиферацию и дифференцировку предшественников остеогенных клеток в их культурах с образованием костной ткани [41, 43].

Таким образом, факторы роста и костные морфогенетические белки могут стимулировать синтез костных коллагеновых белков остеобластами и пополнять количество последних за счет воздействия на дифференцировку их предшественников. В настоящее время BMP и факторы роста применяются в некоторых странах в клинической практике. Однако трудность их выделения и очистки, невозможность синтеза методами генной инженерии делают их использование ограничено доступными.

Другой проблемой применения культур аутоклеток и факторов роста для стимуляции репаративного остеогенеза является их доставка в зону дефекта. Введение культуры аутоклеток или факторов роста непосредственно в область обширного

костного дефекта инъекционным путем не обеспечивает их длительного присутствия в зоне повреждения кости и пролонгированной стимуляции остеогенеза [41]. Поэтому факторы роста должны быть доставлены в область дефекта с помощью различных имплантатов, способных адсорбировать их и затем выделять в течение времени, достаточного для завершения регенерации. Так же можно доставить в костный дефект аутоклетки, которыми насыщаются имплантируемые матрицы.

Идеальный материал для этой цели, по мнению некоторых авторов, должен быть способен биодеградировать, замещаясь костью, в течение 6 нед [47]. Имплантат из такого материала, несущий факторы роста, должен полностью резорбироваться, не препятствовать костеобразованию, быть инертным по отношению к окружающим тканям [41].

Существующие материалы, в той или иной степени отвечающие указанным требованиям, можно разделить на три группы: 1) *биоорганические* — инактивированный деминерализованный костный матрикс, коллаген, фибриновый клей, фибрин-коллагеновая паста; 2) *керамические* —  $\beta$ -трикальций-фосфатная керамика, парижский пластырь (сульфит кальция), коралл; 3) *синтетические полимеры* — полимолочная кислота, полиактид-полигликолид сополимер, полиангидрид и полиортоэстер.

Большинство этих материалов не отвечает в полной мере критериям идеальной системы доставки факторов роста в область регенерации. Так,  $\beta$ -трикальцийфосфатная керамика [46], полиактид-полигликолид сополимер [39], полимолочная кислота [33] обнаруживаются в костном дефекте дольше 6 мес. Фибрин-коллагеновая паста и фибриновый клей индуцируют развитие хронического воспалительного процесса и угнетают гетеротопический остеогенез [35, 43]. Перспективным, по данным проведенных исследований [41–44], является синтетический материал полиортоэстер. Имплантаты из него вызывают минимальную воспалительную реакцию, не угнетают остеогенез, резорбируются в течение 4 нед после помещения в костный дефект. Однако отдаленные результаты применения этого материала пока неизвестны.

Все разновидности материалов, предлагаемых для помещения в костные дефекты в качестве носителей аутоклеток или факторов роста, могут быть использованы и самостоятельно для остеокондуктивного остеогенеза [23]. Они не оказывают прямого стимулирующего влияния на репаративный остеогенез, но способствуют направленному росту новой кости. Являясь основой для прорастания в область дефекта первичных сосудов, остеокондукторы постепенно утилизируются и замещаются новообразованной костью [41]. K. Denner и соавт. [24] экспериментально определили размер пор трансплантата (не менее 100 мкм), обладающего остеокондуктивными свойствами. Следовательно, трансплантат, используемый в качестве остеокондуктора, должен сочетать в себе такие свойства, как пористость и способность к резорбции до построения на его месте первичного костного регенерата и заполнения им костного дефекта.

Остеокондуктивный имплантат из пористой керамики и гидроксиапатита не отвечает этим требованиям [22, 47]. При помещении такого имплантата в костный дефект формирующийся костный регенерат образует вокруг него футляр. Кроме того, данный материал, обладая высокой пористостью и хорошими прочностными свойствами, не подвергается полной резорбции, вследствие чего не происходит глубокого прорастания костной ткани в имплантат. В результате такое восстановление часто заканчивается переломами в области операции [46, 47].

Материалом, сочетающим в себе остеокондуктивные и остеоиндуктивные свойства, является деминерализованный костный матрикс (ДКМ) [38, 41]. Он имеет значительную пористость [9] и хорошо резорбируется при помещении в костный дефект, так как его волокнистая основа является естественным для организма субстратом. Длительность резорбции имплантируемого ДКМ можно регулировать степенью деминерализации исходной нативной кости [12]. В процессе резорбции ДКМ, состоящий из коллагеновых волокон, служит строительным материалом для образующейся новой кости [20, 36]. Добавление аутологичного костного мозга в место имплантации ДКМ при костных дефектах приближает ДКМ к аутоотрансплантату с сохраненным кровообращением [47].

Для интенсификации репаративной регенерации необходимо создать определенные условия, способствующие быстрому костеобразованию и повторяющиеся те, в которых проходит физиологическая регенерация. С этих позиций имплантат, насыщенный различными стимуляторами, следует рассматривать не только как средство доставки этих веществ в область костного дефекта [41]. Трансплантат, имеющий структуру, подобную структуре костной ткани, и несущий в себе стимуляторы остеогенеза, должен создавать микроокружение, способное оптимизировать регенерацию костной ткани, приближать ее к физиологической, но на более высоком уровне метаболизма и с большей скоростью костеобразования (за счет стимуляторов) [36].

Перечисленным требованиям (стимуляционная активность, резорбируемость, пористость и др.) отвечают некоторые естественные биологические тканевые структуры. Среди них особое внимание привлекает незрелая костная ткань млекопитающих. Аллогенная фетальная костная ткань в измельченном виде применяется при восстановлении поврежденных костей с обширными дефектами, лечении ложных суставов, различных кист, остаточных полостей, для стимуляции замедленно созревающих дистракционных регенератов и т.д. [6, 18, 34, 42]. Использование фетальной костной ткани в качестве стимулятора репаративного остеогенеза имеет определенные теоретические основания. Прежде всего, компоненты этой ткани — незрелый коллаген и аморфный фосфат кальция относительно легко резорбируются [5]. Кроме того, наличие в ее составе нескольких типов костного морфогенетического белка во многом определяет остеоиндуктивные свойства костного матрикса. Целая группа факторов роста, содержащихся в фетальной костной ткани, стимулирует как пролиферацию и диф-

ференцировку родоначальников остеодифферона, так и ангиогенез [41]. Важное значение имеет также низкая антигенная активность нативной незрелой костной ткани [4].

Незрелая костная ткань новорожденных животных, как и фетальная кость, содержит большое количество факторов роста [26] и близка к ней по структуре и биохимическому составу. Имеются сведения о применении в эксперименте костной ткани новорожденных животных в деминерализованной форме для оценки остеоиндуктивности ДКМ [21], а также в нативном виде — в сравнении с фетальной костной тканью [30]. Исследование влияния этих тканей на репаративную костную регенерацию показало их выраженный стимуляционный эффект [26]. При заполнении значительных дефектов длинных костей кролика фрагментированной незрелой (фетальной и «новорожденной») костной тканью животных наблюдалось полноценное структурно-функциональное восстановление поврежденной кости в течение 6 мес. Формирование регенерата происходило многоэтапно, путем заполнения дефекта волокнистой соединительной тканью, замещения ее ретикулофиброзной костной тканью и последующего ремоделирования в пластинчатую компактную костную ткань. Фрагменты незрелой костной ткани, распределенные в костном дефекте, не являлись центрами остеогенеза. Вокруг фрагментов этой ткани образовывалась волокнистая соединительная ткань, создававшая основу для пролиферации и дифференцировки остеогенных клеток периоста и эндоста [10, 26].

Течение и завершение репаративной регенерации во многом определяется условиями протекания регенераторных процессов, и прежде всего — трофическим обеспечением, которое в свою очередь зависит от степени кровоснабжения зоны регенерации. Факторы, влияющие на кровоснабжение, можно разделить на две группы: первая — стимуляторы ангиогенеза, вторая — стимуляторы кровотока. Как отмечалось выше, стимуляторами ангиогенеза и остеогенеза являются факторы роста. Для усиления развития сосудистого русла в области больших диафизарных дефектов применялись адреналовый экстракт надпочечников [11, 31], антиоксиданты [8, 20]. При этом развитие сосудистого русла способствовало более активному течению регенераторных процессов. Локальную гиперемию в области повреждения кости и интенсификацию микроциркуляции вызывали с помощью индукто-термии [37], УВЧ-терапии [7], ультразвука [1, 25], электростимуляции [13, 32], постоянного и переменного магнитных полей [29], лазерного излучения [3] т.д.

Итак, из представленного аналитического обзора следует, что в настоящее время существует большой арсенал способов воздействия и факторов влияния на разные звенья репаративной костной регенерации:

— непосредственное воздействие (стимуляция) на предшественники остеобластов в периосте и эндосте и полипотентные стволовые соединительно-тканевые клетки костного мозга факторами роста и ВМР;

— трансплантация аутоклеток костного дифферона после культивирования и помещения на соответствующие носители;

— имплантация остеокондуктивных матриц;

— имплантация фрагментированной незрелой костной ткани, выступающей в роли остеокондуктивной матрицы и носителя (источника) факторов роста и BMPs;

— интенсификация ангиогенеза и микроциркуляции в зоне регенерации.

Указанные способы воздействия на репаративную регенерацию должны применяться комплексно, на основе индивидуального подбора и в сочетании с традиционными методами лечения костных повреждений (репозиция, фиксация отломков и т.д.). При этом следует учитывать особенности поврежденных костей, объем повреждения, возраст больного и другие факторы.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Амелин А.З., Лоцева Е.И. //Ортопед. травматол. — 1980. — N 3. — С. 35–37.
- Балаболкин М.И. Эндокринология. — М., 1998.
- Болтрукевич С.И. //Здравоохр. Белоруссии. — 1989. — N 8. — С. 41–45.
- Жуков-Варежников Н.Н. и др. //Экспер. хирургия. — 1957. — N 2. — С. 55–61.
- Зотов Ю.В., Касумов Р.Д., Савельев В.И., Бухабиб Э.Б., Зотов В.Ю. Хирургия дефектов черепа. — СПб, 1998.
- Клебановская Р.Л. //Ортопед. травматол. — 1965. — N 2. — С. 14–19.
- Лоцева Е.И., Петухова Л.И., Лебедева В.М. //Там же. — 1974. — N 3. — С. 9–11.
- Михайлов С.С., Фактор Э.А., Зинченко Т.А. //Биоантиоксиданты: Тезисы докладов 3-й Всесоюз. конф. — М., 1989. — Т. 2. — С. 31–32.
- Омельяненко Н.П., Бутырин Г.М. //Вестн. травматол. ортопед — 1994. — N 1. — С. 51–54.
- Омельяненко Н.П., Миронов С.П., Троценко В.В., Малахов О.А., Дорохин А.И., Матвейчук И.В., Карпов И.Н. //Биомедицинские технологии: Сб. науч. трудов НИЦ БМТ. — М., 2001. — Вып. 15. — С. 21–25.
- Разумовский А.В. Репаративная регенерация костной ткани под влиянием экстракта надпочечников крыс: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Горький, 1983.
- Савельев В.И. //Деминерализованные костные трансплантаты и их использование в восстановительной хирургии: Сб. трудов РНИИТО им. Р.Р. Вредена. — СПб, 1996. — С. 3–12.
- Сиджанов Ж.М. //Здравоохр. Казахстана. — 1977. — N 7. — С. 13–14.
- Фон Верзен Р. //Деминерализованный костный трансплантат и его применение: Труды РНИИТО им. Р.Р. Вредена. — СПб, 1993. — С. 4–11.
- Фриденштейн А.Я., Лалыкина К.С. Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники. — М., 1973.
- Ahrens M., Ankenbauer T., Schroder D. et al. //DNA Cell Biol. — 1993. — Vol. 12. — P. 871–880.
- Amedee J., Bareille R., Rouais F. et al. //Differentiation. — 1994. — Vol. 58. — P. 157–164.
- Aspenberg P., Wittbjer J. //Clin. Orthop. — 1986. — N 206. — P. 261–269.
- Bostrom M., Lane J., Berberian W. et al. //J. Orthop. Res. — 1995. — Vol. 13. — P. 357–367.
- Bulkley Y.B. //Surgery, 1983. — Vol. 94. — N 3. — P. 407–411.
- Cohn M.J., Izpisua-Belmonte J.C., Abud H. et al. //Cell. — 1995. — Vol. 80. — P. 739–746.
- Cong Z., Jianxin W., Huaizhi F. et al. //J. Biomed. Mater. Res. — 2001. — Vol. 55. N 1. — P. 28–32.
- Cornell C.N., Lane J.M. //Clin. Orthop. — 1998. — N 355, Supp. — P. 267–273.
- Denner K., von Versen R. //Habilitationsschrift Med. Fakultat der Humboldt-Universitat. — Berlin, 1991.
- Dyson M., Suckling J. //Physiotherapy. — 1978. — Vol. 64. — N 4. — P. 105–108.
- Einhorn T. //J. Bone Jt Surg. — 1995. — Vol. 77A. — P. 940–956.
- Gerhart T.N., Kirken-Head C.A., Kriz M.J. et al. //Clin. Orthop. — 1993. — N 293. — P. 317–326.
- Glowacki I., Mulikan I.B. //Clin. Plast. Surg. — 1985. — Vol. 12. — P. 233–241.
- Heckman J.D., Ingram A.J., Lloyd R.D. et al. //Clin. Orthop. — 1981. — N 161. — P. 58–66.
- Iwata M., Nishijima K. //Transplant. Proc. — 1994. — Vol. 26, N 2. — P. 959–962.
- Krompecher S. //Z. Orthop. — 1974. — Bd 112, N 6. — S. 1196–1200.
- Laabs W.A., May E., Richter K.D., Hohling H.J. //Langenbecks Arch. Chir. — 1982. — Bd 356. N 3. — S. 219–229.
- Lovell T.P., Dawson E.G., Nilsson O.S. et al. //Clin. Orthop. — 1989. — N 243. — P. 266–274.
- Omelyanenko N.P., Malakhov O.A., Shaposhnikov Y.U., Sukhikh G., Molnar E., Petrov I. //SIROT World Congress, 7th. — Amsterdam, 1996. — P. 253.
- Pinholt E.M., Solheim E., Bang G. et al. //J. Oral Maxillofac. Surg. — 1992. — Vol. 50. — P. 1300–1304.
- Reddi A.H., Huggins C. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1972. — Vol. 69. — P. 1601–1605.
- Rodenburg J. //Aust. J. Physiother. — 1974. — Vol. 20, N 2. — P. 92–95.
- Russell J.L., Block J.E. //Orthopedics. — 1999. — Vol. 22, N 5. — P. 524–531.
- Schmitz J.P., Hollinger J.O. //Clin. Orthop. — 1988. — N 237. — P. 245–255.
- Sellers R.S., Peluso D., Morris E.A. //J. Bone Jt Surg. — 1997. — Vol. 79A. — P. 1452–1463.
- Solheim E. //Int. Orthop. — 1998. — Vol. 22. — P. 410–416.
- Solheim E., Pinholt E.M., Andersen R., Bang G., Sudmann E. //J. Bone Jt Surg. — 1992. — Vol. 74A. — P. 1456–1463.
- Solheim E., Pinholt E.M., Bang G., Sudmann E. //J. Biomed. Mater. Res. — 1992. — Vol. 26. — P. 791–800.
- Sudmann B., Anfinson O.G. et al. //Acta Orthop. Scand. — 1993. — Vol. 64. — P. 336–339.
- Urist M.R. //Science. — 1965. — Vol. 150. — P. 893–899.
- Urist M.R., Nilsson O., Rasmussen J. et al. //Clin. Orthop. — 1987. — N 214. — P. 295–304.
- Wittbjer J., Palmer B., Rohlin M., Thorngren K.G. //Ibid. — 1983. — N 173. — P. 229–238.