

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭВОЛЮЦИИ ПЕРЕМЕЩАЕМЫХ КОНСЕРВИРОВАННЫХ ТРАНСПЛАНТАТОВ В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ (НА ПРИМЕРЕ КОСТНОЙ ТКАНИ) В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

Карпова А.Д., Карпов А.С.

¹ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет Минздрава России», Ставрополь, e-mail: stgma@br.ru

Статья посвящена изучению эволюции перемещаемых консервированных трансплантатов в живых организмах (на примере костной ткани) в лабораторных условиях. Исследования направлены на поиск компонентов консервирующих растворов, наиболее оптимальных для консервирования биотрансплантатов. Проведена сравнительная оценка некоторых способов химической стерилизации деминерализованного костного матрикса. В настоящем исследовании были изучены остеоиндуктивные свойства ДМК, стерилизованного различными химическими веществами (хлоргексидин, катамин-АБ, антисептический комплекс, надмуравьиная кислота) с целью выбора оптимального способа его стерилизации. Эксперименты проводились на половозрелых крысах в возрасте 3-4 месяцев. После забоя у животных извлекались бедренные кости, которые очищались от мягких тканей, стерилизовались и декальцинировались. Полученный ДМК освобождали от костного мозга и промывали проточной водой 2–2,5 часа до pH 7,2, а затем стерилизовали различными химическими агентами. Имплантация стерилизованного ДМК производилась крысам–реципиентам 3–4 месячного возраста внутримышечно со стороны передней поверхности бедра. Результаты исследований показали, что аллогенный нестерилизованный ДМК крыс обладает остеоиндуктивными свойствами. Проникающие в имплантат в процессе резорбции соединительнотканые элементы дифференцируются в сторону остеогенеза. В стерилизованном надмуравьиной кислотой ДМК сохраняются остеоиндуктивные свойства, но проявляются они не в полной мере. Любая операция с применением консервированных гомологичных тканей таит в себе опасность серьезных осложнений, поэтому необходимо изыскание новых, более совершенных методов консервирования биотрансплантатов.

Ключевые слова: консервирование, хранение, заготовка, пересадка органов и тканей, биотрансплантат.

THE STUDY OF THE EVOLUTION OF ROAMING PRESERVED GRAFTS IN LIVING ORGANISMS (FOR EXAMPLE, BONE TISSUE) IN THE LABORATORY

Karпова A.D, Karpov A.S.

¹Stavropol State Medical University, Stavropol, e-mail: stgma@br.ru

The article is devoted to the evolution of roaming preserved grafts in living organisms (for example, bone tissue) in the laboratory. The study aimed at finding the components of preservative solutions optimal for conservation biotransplantations. Comparative estimation of some methods of chemical sterilization of demineralized bone matrix. In the present study were studied osteoinductive properties of the DMK, various chemical substances (chlorhexidine, katamin-AB, antiseptic complex, nagarajuna acid) to select the optimal method of sterilization. Experiments were conducted on mature rats aged 3-4 months. After slaughter of the animals was removed from the femur, which was cleaned from soft tissue, sterilized and decalzinirute. Obtained DMK released from the bone marrow, and washed in running water 2 – 2.5 hours to pH 7.2, and then sterilized by various chemical agents. Implantation of sterilized DMK produced rats – recipients 3 to 4 months of age intramuscularly at the front of the thigh. The results showed that allogeneic unsterilized DMK of rats has osteoinductive properties. Penetrating into the implant in the process of resorption of connective-tissue elements differenciate in the direction of osteogenesis. In a sterilized naturalyou acid DMK remain osteoinductive properties, but they occur not fully. Any operation with the use of preserved homologous tissues carries the risk of serious complications, so you need to find new, improved methods of preserving grafts.

Keywords: conservation, storage, harvesting, transplantation of organs and tissues, biotransplant.

За 60 лет ЦИТО вклад научных сотрудников в разработку проблемы консервации и трансплантации тканей и органов весьма значителен. Хотя пересадки тканей издавна используются в травматологии и ортопедии, роль их при ликвидации различных дефектов

особенно возросла в связи с ростом разрушительной силы огнестрельного оружия. Широкое внедрение костно-пластических операций в клиническую практику ставит задачу получения таких трансплантатов, которые обладали бы постоянным эффектом остеогенеза и проявляли бы его в относительно короткие сроки. Возникает острая потребность в разработке лучших методов консервации других различных тканей для пересадок, особенно имеющих опорно-двигательную или механически каркасную структуру. Поиски индуктивного начала привели исследователей к органической основе кости - костному матриксу [1; 2]. Многолетние исследования успешно завершились открытием индуцирующего остеогенез-фактора, обнаруженного в декальцинированном костном матриксе (ДМК) – костного морфогенетического протеина. Еще задолго до его открытия было известно, что этот фактор термолабилен, разрушается при деминерализации кости азотной, трихлоруксусной, хромовой, осмиевой кислотами и при воздействии щелочи, УФО-лучей, гамма-облучения. Высокая остеоиндуктивная активность деминерализованного матрикса была подтверждена и другими исследователями. В иммунном отношении ДМК оказался более инертным субстратом, чем аллокость [3]. Экспериментальные пересадки ДМК при замещении костного дефекта показали его практическую равноценность аутооттрансплантатам [4]. Применение ДМК в клинике для замещения дефектов черепа и челюстно-лицевого скелета, а также при повреждениях и различных заболеваниях опорно-двигательного аппарата позволило рекомендовать ДМК для внедрения в практику. Однако вопросы массовой заготовки ДМК еще не получили окончательного завершения. Особенно это касается разработки способов стерилизации деминерализованной кости. Применение физических методов стерилизации ДМК исключается, т.к. они разрушают остеоиндуцирующий фактор, поэтому возможна только химическая стерилизация. Но способы ее подлежат тщательной проверке, поскольку при воздействии отдельных химических веществ остеоиндуктивная активность ДМК также может быть разрушена [5].

Выбор способа химической стерилизации ДМК, сохраняющего его ценные свойства, является трудной задачей. При использовании 0,5% формалина для стерилизации и консервации ДМК ряд авторов установили, что в формализированном матриксе остеогенез несколько замедлен [6]. Другие авторы предложили стерилизовать ДМК антисептическим комплексом, в состав которого входят канамицин, сульфосалициловая кислота, мед, формалин [7]. Авторы приводят клинические результаты применения ДМК, стерилизованного антисептическим комплексом, но не сообщают о его влиянии на остеоиндуктивные свойства [8; 9]. Значительный экспериментальный материал показал, что нестерильный ДМК, обработанный солями серебра в концентрации 10^{-4} М, становится

стерильным и антисептичным и длительно сохраняет эти качества без снижения остеоиндуктивных свойств.

Цель исследования – провести сравнительную оценку некоторых способов химической стерилизации деминерализованного костного матрикса.

Материал и методы исследования. В настоящем исследовании были изучены остеоиндуктивные свойства ДМК, стерилизованного различными химическими веществами (хлоргексидин, катамин-АБ, антисептический комплекс, надмуравьиная кислота) с целью выбора оптимального способа его стерилизации. Эксперименты проводились на половозрелых крысах в возрасте 3-4 месяцев. После забоя у животных извлекались бедренные кости, которые очищались от мягких тканей и помещались для декальцинации в 2,4н раствор соляной кислоты. Колба с раствором и трансплантатами ставилась на мешалку, установленную в холодильнике (время стерилизации 24 часа, затем промывание в стерильном физиологическом растворе 30 минут). Декальцинация проходила в течение 45 минут при +2, +4 °С. Контроль за декальцинацией осуществляется с помощью рентгенографии и гистохимической реакции на кальций по Косса. Полученный ДМК освобождали от костного мозга и промывали проточной водой 2–2,5 часа до рН 7,2, а затем стерилизовали различными химическими агентами:

- 0,75% раствором хлоргексидина-биглюконата;
- 0,5% раствором катамина АБ на физиологическом растворе (время стерилизации 24 часа, затем промывание в стерильном физиологическом растворе 30 минут);
- антисептическим комплексом (АСК), содержащим на 100 мл физиологического раствора 200 тыс. ЕД полимиксина, 0,05г фуразолидона и 0,2 г сорбиновой кислоты (экспозиция – 24 часа);
- надмуравьиной кислотой (время стерилизации – 30 минут).

Во всех случаях стерилизация осуществлялась при температуре +2 - +4 °С.

Имплантация стерилизованного ДМК производилась крысам–реципиентам 3–4-месячного возраста внутримышечно со стороны передней поверхности бедра.

Всего выполнено 4 серии опытов. Осуществлялась подсадка ДМК, стерилизованного хлоргексидином, катамином АБ, антисептическим комплексом и надмуравьиной кислотой. В контрольной серии имплантировался ДМК, заготовленный в стерильных условиях (К). В каждой серии оперировано по 20 животных. Через 30, 60, 90 и 120 суток после операции из каждой серии забивали по 4–5 крыс. В эти сроки производили рентгенографию и гистологическими методами (окраска гематоксилин–эозином и по Ван Гизону) изучали процессы остеоиндукции. Результаты исследования показали, что после стерилизации изучаемыми в работе методами ДМК оказался стерильным в 100% случаев. В контрольной

серии на гистологических препаратах через 30 суток видны участки рассасывания ДМК. По краю образовавшихся полостей прослеживаются цепочки остеобластов и новообразованная кость, в полостях определяется преимущественно миелоидный костный мозг. Через 60 суток увеличиваются очаги рассасывания и объем индуцированной кости. В костно–мозговых полостях имеется миелоидный и жировой костный мозг. К 3-месячному сроку процесс резорбции ДМК продолжает нарастать, а очаги новообразованной костной ткани кальцифицируются. Через 120 суток ДМК почти полностью рассасывается и замещается новообразованной костью. На рентгенограммах через 30 суток слабая тень трансплантата с четкими контурами. К 60 суткам интенсивность тени увеличивается, структура ее неоднородна. Через 90–120 суток отмечается тень трансплантата однородной структуры с четкими контурами, однако интенсивность тени слабее, чем нормальной кости реципиентов.

В I и II сериях эксперимента получены одинаковые морфологические и рентгенологические данные. Новообразования костной ткани не было отмечено ни в одном случае во все сроки наблюдения. На рентгенограммах тень ДМК также отсутствовала в течение всего постимплантационного периода. В III серии на гистологических препаратах через 30 суток определяется безостеоцитный ДМК с участками рассасывания и кальцификации. К 60 суткам процессы резорбции и кальцификации ДМК нарастают. Остеогенез наблюдается не во всех случаях и в небольшом объеме. Через 90–120 суток рассасывание ДМК продолжает нарастать, увеличивается также объем кальцификатов. Малочисленные участки остеогенеза отмечаются на препаратах 3-месячного срока наблюдения; через 120 суток очагов новообразования кости отмечено не было, а количество кальцификатов было значительным. В этой серии эксперимента на рентгенограммах тень трансплантата с нечеткими контурами появляется через 60 суток, интенсивность ее увеличивается к 120 суткам после операции. В IV серии эксперимента через 30 суток в имплантатах ДМК появляются очаги рассасывания. По гаверсовым каналам и линиям склеивания отмечается активизация клеточных элементов типа фибробластов и остеобластов, среди которых в отдельных участках вырастают сосуды. Встречаются отдельные участки индуцированной костной ткани. К 60 суткам рассасывание ДМК нарастает, по краю образовавшихся полостей появляются полосы новообразованной кости, кальцификаты, а в формирующихся полостях миелоидный костный мозг. Через 90 суток рассасывание ДМК более выражено, процессы индукции костной ткани соответствуют степени выраженности 2-месячного срока наблюдения.

Подсадка ДМК, стерилизованного хлоргексидином, катамином АБ, антисептическим комплексом и надмуравьиной кислотой

Серия эксперимента	Методы	Количество суток			
		30 суток	60 суток	90 суток	120 суток
I серия (хлоргексидин)	Гистология	Новообразования костной ткани не было отмечено	Новообразования костной ткани не было отмечено	Новообразования костной ткани не было отмечено	Новообразования костной ткани не было отмечено
	Остеоиндукция	Не была отмечена	Не была отмечена	Не была отмечена	Не была отмечена
	Рентген	Тень ДМК отсутствует	Тень ДМК отсутствует	Тень ДМК отсутствует	Тень ДМК отсутствует
II серия (катамин АБ)	Гистология	Определяется безостеоцитный ДМК с участками рассасывания и кальцификации	Процессы резорбции и кальцификации ДМК нарастают	Рассасывание ДМК продолжает нарастать, увеличивается объем кальцификатов	Рассасывание ДМК продолжает нарастать, увеличивается также объем кальцификатов
	Остеоиндукция	В небольшом объеме	В небольшом объеме	Малочисленные участки остеогенеза	Новообразования кости отмечено не было, количество кальцификатов было значительным
	Рентген	Тень ДМК отсутствует	Тень трансплантата с нечеткими контурами	Тень трансплантата с нечеткими контурами	Интенсивность тени увеличивается
III серия (антисептический комплекс)	Гистология	Определяется безостеоцитный ДМК с участками рассасывания и кальцификации	Процессы резорбции и кальцификации ДМК нарастают	Рассасывание ДМК продолжает нарастать, увеличивается объем кальцификатов	Рассасывание ДМК продолжает нарастать
	Остеоиндукция	Остеогенез наблюдается не во всех случаях и в небольшом объеме	Остеогенез наблюдается не во всех случаях и в небольшом объеме	Малочисленные участки остеогенеза	Очагов новообразования кости отмечено не было, а количество кальцификатов было значительным
	Рентген	Тень ДМК отсутствует	Тень трансплантата с нечеткими контурами	Тень трансплантата с нечеткими контурами	Интенсивность тени увеличивается
IV серия (надмуравьиная кислота)	Гистология	В имплантатах ДМК появляются очаги рассасывания, по гаверсовым каналам и линиям склеивания, активизация клеточных элементов типа фибробластов и	Рассасывание ДМК нарастает, по краю образовавшихся полостей появляются полоски новообразованной кости, кальцификаты	Рассасывание ДМК более выражено, процессы индукции костной ткани соответствуют степени выраженности 2-месячного срока наблюдения	Отмечается более выраженное рассасывание, по краям образовавшихся полостей – очаговые кальцификаты

		остеобластов, среди которых в отдельных участках вырастают сосуды			
	Остеиндукция	Отдельные участки индуцированной костной ткани	В формирующихся полостях миелоидный костный мозг	В образовавшихся полостях прослеживается миелоидный и жировой костный мозг	В отдельных участках прослеживается индуцированная остеогенная ткань
	Рентген	Трансплантат не определяется	Слабая тень трансплантата с нечеткими контурами и неоднородной структурой	Интенсивность тени увеличивается, контуры трансплантата четкие, но не достигают интенсивности тени кости реципиента	Интенсивность тени увеличивается, контуры трансплантата четкие, но не достигают интенсивности тени кости реципиента

В образовавшихся полостях прослеживается миелоидный и жировой костный мозг. В препаратах 4-месячного срока наблюдения отмечается более выраженное рассасывание, по краям образовавшихся полостей – очаговые кальцификаты. В отдельных участках прослеживается индуцированная остеогенная ткань. На рентгенограммах месячного срока трансплантат не определяется. К 60 суткам появляется слабая тень трансплантата с нечеткими контурами и неоднородной структурой. Через 90–120 суток интенсивность тени увеличивается, контуры трансплантата четкие, но не достигают интенсивности тени кости реципиента (таблица).

Обсуждая полученные результаты, прежде всего необходимо отметить, что нестерилизованный ДМК, как показала контрольная серия опытов, после эктопической имплантации в мышцу подвергается интенсивной резорбции и создает остеиндуцирующий эффект. Иначе протекает постимплантационный период в матриксе, стерилизованном изученными в настоящей работе химическими веществами. Так, стерилизованный хлоргексидином и катамином АБ ДМК не создает остеиндуцирующего эффекта. По-видимому, эти вещества полностью инактивируют костный морфогенетический протеин, осуществляющий индукцию костной ткани. В ДМК, стерилизованном антисептическим комплексом, процесс резорбции протекает активно. Однако остеогенез наблюдается с 2-месячного срока не во всех случаях и в небольшом объеме. Кальцификация же интенсивно нарастает в процессе всего периода наблюдения. В имплантатах ДМК, стерилизованных надмуравьиной кислотой, индукция костной ткани отмечается в месячный срок наблюдения. К 60 суткам в полостях новообразованной кости прослеживается миелоидный костный мозг.

Через 90 суток отмечено появление жирового костного мозга. Объем индуцированной ткани больше, чем в предыдущей серии эксперимента, но меньше, чем в контрольной. Кальцификаты также определяются во все сроки наблюдения.

Заключение. Выяснив вопросы, связанные с адаптацией трансплантата к организму реципиента и его жизнеспособностью, мы сочли необходимым изучить остеоиндуктивные свойства ДМК, стерилизованного различными химическими веществами. Результаты наших исследований показали, что аллогенный нестерилизованный ДМК крыс обладает остеоиндуктивными свойствами. Проникающие в имплантат в процессе резорбции соединительнотканые элементы дифференцируются в сторону остеогенеза. В стерилизованном надмуравьиной кислотой ДМК сохраняются остеоиндуктивные свойства, но проявляются они не в полной мере. Еще в меньшей степени индукция костной ткани отмечена в ДМК, стерилизованном антисептическим комплексом. Касаясь вопросов техники выполнения операции, следует отметить необходимость тщательного сопоставления спилов костей донора и реципиента, так как большая площадь соприкосновения и прочность фиксации трансплантата обеспечивают быстрое образование костной мозоли и восстановление кровообращения в трансплантате, а это существенно сказывается на процессе перестройки донорской кости. Следует считать, что деминерализованный костный матрикс, стерилизованный хлоргексидином и катамином АБ, не обладает остеоиндуктивной активностью, поэтому эти вещества в изученных дозировках не могут быть использованы для его заготовки. Антисептический комплекс и надмуравьиная кислота в процессе стерилизации снижают остеоиндуктивные свойства ДМК, причем АСК снижает их в большей степени. Наиболее пригодным химическим веществом для стерилизации ДМК является надмуравьиная кислота.

Любая операция с применением консервированных гомологичных тканей таит в себе опасность серьезных осложнений. Поэтому необходимы как тщательный контроль за заготовкой, стерилизацией консервированных тканей, так и изыскание новых, более совершенных методов консервирования трансплантатов, оперативного вмешательства и решение тактических, технических, биологических и иммунобиологических проблем, связанных с пересадкой гомотрансплантатов. Послеоперационный период должен быть обеспечен постоянным наблюдением, уходом и необходимым лечением со стороны хирурга и других специалистов.

Методы консервации органов и тканей становятся важным разделом трансплантологии и являются вспомогательным мероприятием и этапом трансплантации. Подготовленные трансплантаты более жизнеспособны и при надлежащей фиксации устойчивы к инфекции. Они быстрее и лучше приживаются без заметной перестройки.

Список литературы

1. Карпов И.Н. Использование деминерализованного костного матрикса для восстановления поврежденных длинных трубчатых костей со значительными дефектами: дис. ... канд. мед. наук. – Москва, 2002. – 150 с.
2. Кирилова И.А. Сравнительная характеристика материалов для костной пластики: состав и свойства / И.А. Кирилова, М.А. Садовой, В.Т. Подорожная // Хирургия позвоночника. – 2012. – № 3. – С. 72-83.
3. Ладонин С.В. Экспериментальное обоснование применения деминерализованного костного имплантата в лечении хронического остеомиелита: дис. ... канд. мед. наук. - Самара, 2011. – 85 с.
4. Боджоков А.Р. Пластика костных дефектов стенок околоносовых пазух деминерализованными костными трансплантатами (клинико-экспериментальное исследование): дис. ... д-ра мед. наук. – Санкт-Петербург, 2012. – 229 с.
5. Павлова Л.А. Современное представление об остеоиндуктивных механизмах регенерации костной ткани. Обзор состояния проблемы / Л.А. Павлова, Т.В. Павлова, А.В. Нестеров // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Сер.: Медицина. Фармация. – 2010. – № 10. – С. 5-11.
6. Булатов А.А. Деминерализованные костные трансплантаты и индукционный остеогенез // Травматология и ортопедия России. – 2005. – № 2 (35). – С. 53-59.
7. Способ консервации биологических трансплантатов в гельсодержащей стерилизующей среде: пат. 2370031 Рос. Федерация МПК: А 01 N 1/ 00 / В.И. Савельев, Ю.А. Рыков, А.А. Булатов; заявитель и патентообладатель ФГУ «РНИИТО им. Р.Р. Вредена Росмедтехнологий». - № 2007149032/14; опубл. 21.12.2007.
8. Красношлык П.В. Применение демиелинизированных аллотрансплантатов в реконструктивной хирургии последствий черепно-мозговой травмы: дис. ... канд. мед. наук. – Санкт-Петербург, 2005. – 166 с.
9. Способ консервации биологических трансплантатов в гельсодержащей стерилизующей среде: пат. 2370031 Рос. Федерация МПК: А 01 N 1/ 00 / В.И. Савельев, Ю.А. Рыков, А.А. Булатов; заявитель и патентообладатель ФГУ «РНИИТО им. Р.Р. Вредена Росмедтехнологий». - № 2007149032/14; опубл. 21.12.2007.