# ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

## как сигналы для управления ПРОЛИФЕРАЦИЕЙ, ДИФФЕРЕНЦИРОВКОЙ, ПОДВИЖНОСТЬЮ И ТАКСИСОМ КЛЕТОК

*Под редакцией*
*И.А. Кириловой*

МОСКВА
ФИЗМАТЛИТ®
2021

УДК 611.018.1
ББК 28.05
Ф 49

*Издание осуществлено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований по проекту 21-115-00003, не подлежит продаже*

**Физико-химические и механические свойства внеклеточного матрикса как сигналы для управления пролиферацией, дифференцировкой, подвижностью и таксисом клеток** / Под ред. И. А. Кириловой. — М.: ФИЗМАТЛИТ, 2021. — 248 с. — ISBN 978-5-9221-1918-4.

Монография представляет собой результаты фундаментальных исследований, выполненных при финансовой поддержке по «Конкурсу междисциплинарных ориентированных фундаментальных исследований». В книге приведены данные по проблеме замещения дефектов костной ткани в травматологии, ортопедии, челюстно-лицевой хирургии и онкологии опорно-двигательного аппарата, а также сравнительные характеристики материалов, используемых для костной пластики. Представлены результаты изучения физико-химических свойств и механических характеристик костного матрикса в зависимости от способа его заготовки и влияния этих характеристик на свойства живых культуральных клеток *in vitro*, а также данные об использовании определенных видов костного матрикса в качестве потенциального скаффолда для разработки тканеинженерных конструкций. Вопросы разработки разных вариантов костного матрикса как основы тканеинженерных конструкций связаны с освещенными в данной монографии вопросами организации донорства костной ткани в условиях федерального медицинского учреждения.

В качестве примера исследований *in vitro* свойств костных матриц для тканевой инженерии представлены результаты их совместного культивирования с хондроцитами и остеобластами тканей человека и млекопитающих. Необходимое условие для реализации адекватной интеграции имплантата — высокая активность заселения имплантата клетками при сохранении максимально продолжительного времени их жизнеспособности и формирование достаточной плотности слоя жизнеспособных клеток. Приведены результаты измерения подвижности клеток и траектории их миграции. В качестве перспективного метода управления заселением клетками разных видов костных матриксов представлен гальванотаксис.

Результаты комплексного и многометодного исследования ориентированы на получение новых фундаментальных и прикладных знаний в области нормальной анатомии, патоморфологии и патофизиологии, травматологии и ортопедии, хирургической стоматологии, трансплантологии, экспериментальной медицины, клеточной биологии и других областях медицины, связанных с созданием эффективных тканеинженерных конструкций.

ISBN 978-5-9221-1918-4

© ФИЗМАТЛИТ, 2021
© Коллектив авторов, 2021

# ОГЛАВЛЕНИЕ

Авторский коллектив . . . . . 5

Введение . . . . . 7

**1. Использование ауто- и аллотрансплантатов для замещения костных дефектов при резекциях опухолей костей (обзор литературы)**
*Е.А. Анастасиева, М.А. Садовой, А.А. Воропаева, И.А. Кирилова* 13

**2. Сравнительная характеристика материалов для костной пластики: состав и свойства**
*И.А. Кирилова, В.Т. Подорожная* . . . . . 27

**3. Организация прижизненного донорства костной ткани в условиях федерального учреждения**
*И.А. Кирилова, В.Т. Подорожная, В.М. Прохоренко, И.Ю. Бедорева, В.В. Павлов* . . . . . 55

**4. Изучение морфологии срединных распилов головки бедренной кости**
*И.А. Кирилова, Ю.П. Шаркеев, В.Т. Подорожная, К.С. Попова, П.В. Уваркин, Н.Г. Фомичев* . . . . . 65

**5. Изучение структурно-функциональных характеристик срединных распилов головок бедренных костей**
*В.Т. Подорожная, И.А. Кирилова, Ю.П. Шаркеев, К.С. Попова, П.В. Уваркин, Н.Г. Фомичев* . . . . . 72

**6. Свойства деминерализованного костного матрикса для биоинженерии тканей**
*И.А. Кирилова, В.Т. Подорожная, Ю.П. Шаркеев, С.В. Николаев, А.В Пененко, П.В. Уваркин, А.С. Ратушняк, В.В. Чебодаева, Е.А. Анастасиева, С.К. Голушко, А.В. Корель* . . . . . 78

**7. Численные алгоритмы идентификации коэффициента диффузии в задачах тканевой инженерии**
*А.В. Пененко, С.В. Николаев, С.К. Голушко, А.В. Ромащенко, И.А. Кирилова* . . . . . 97

**8. Культивирование и характеристика мезенхимальных стромальных клеток из костного мозга пациентов с ортопедической патологией**
*Н.М. Астахова, А.В. Корель, К.Е. Орищенко, Я.Р. Ефремов, Г.А. Кудров, С.В. Николаев, И.А. Кирилова* . . . . . 120

**9. Изучение базовых характеристик клеток остеогенного и хондрогенного рядов, значимых для тканевой инженерии имплантов**
*Н.М. Астахова, А.В. Корель, Е.И. Щелкунова, К.Е. Орищенко, С.В. Николаев, У.С. Зубаирова, И.А. Кирилова* . . . . . 135

**10. Заселение деминерализованного костного матрикса клетками хондрогенного ряда**
*Е.И. Щелкунова, А.А. Воропаева, А.В. Корель, Д.А. Майер, В.Т. Подорожная, И.А. Кирилова* . . . . . 149

**11. Оценка *in vitro* влияния аллогенной костной матрицы на характеристики мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани при создании комбинированных тканеинженерных конструкций**
*Л.А. Черданцева, Е.А. Анастасиева, Д.Я. Алейник, М.Н. Егорихина, И.А. Кирилова* . . . . . 163

**12. Аллогенные костные материалы: структура, свойства, применение**
*В.Т. Подорожная, И.А. Кирилова, Ю.П. Шаркеев, Е.В. Легостаева* 186

**13. Двухэтапное реэндопротезирование тазобедренного сустава при обширном дефекте костной ткани вертлужной впадины**
*В.В. Павлов, И.А. Кирилова, М.В. Ефименко, В.А. Базлов, Т.З. Мамуладзе* . . . . . 198

**14. Хирургическое лечение остеоид-остеом у детей и подростков (клинические наблюдения)**
*Е.В. Губина, Д.В. Рыжиков, В.Т. Подорожная, И.А. Кирилова, А.В. Андреев, М.А. Садовой, Н.Г. Фомичев, А.В. Бондаренко, Л.М. Афанасьев, А.С. Ревкович, Е.В. Сенченко* . . . . . 213

**15. Опыт хирургического лечения активных кист пяточной кости на фоне сформированного скелета с применением материала «костная аллосоломка»**
*И.Л. Пахомов, М.Л. Садовой, В.М. Прохоренко, И.А. Кирилова* . . 229

Content . . . . . 242

## Авторский коллектив

Алейник Диана Яковлевна
Анастасиева Евгения Андреевна
Андреев Антон Вадимович
Астахова Наталья Михайловна
Афанасьев Леонид Михайлович
Базлов Вячеслав Александрович
Бедорева Ирина Юрьевна
Бондаренко Анатолий Васильевич
Воропаева Анастасия Александровна
Голушко Сергей Кузьмич
Губина Елена Владимировна
Егорихина Марфа Николаевна
Ефименко Максим Викторович
Ефремов Ярослав Рейнгольдович
Зубаирова Ульяна Сергеевна
Кирилова Ирина Анатольевна
Корель Анастасия Викторовна
Кудров Глеб Александрович
Легостаева Елена Викторовна
Майер Денис Александрович
Мамуладзе Тариел Зурабович
Николаев Сергей Васильевич
Орищенко Константин Евгеньевич
Павлов Виталий Викторович
Пахомов Игорь Анатольевич
Пененко Алексей Владимирович
Подорожная Валентина Тимофеевна
Попова Ксения Сергеевна
Прохоренко Валерий Михайлович

Ратушняк Александр Савельевич
Ревкович Алексей Сергеевич
Рыжиков Дмитрий Владимирович
Садовой Михаил Анатольевич
Сенченко Елена Владиславовна
Уваркин Павел Викторович
Фомичев Николай Гаврилович
Чебодаева Валентина Вадимовна
Черданцева Лилия Александровна
Шаркеев Юрий Петрович
Щелкунова Елена Игоревна

# Введение

Одной из главных проблем травматологии, ортопедии, челюстно-лицевой хирургии и онкологии опорно-двигательного аппарата остается замещение дефектов костной и хрящевой тканей (Кирилова, 2019). В настоящее время широкое распространение получили методы клеточной терапии, основанные на применении остеогенных клеток, полученных из различных тканевых источников: костного мозга, жировой ткани, пульпы зуба, периферической крови и т. д. Одни из требований к пластическому материалу при ортопедической и любой другой патологии — тканеспецифичность, отсутствие токсичности, высокий регенераторный потенциал и формирование органоспецифической ткани в зоне трансплантации. Лечение обширных дефектов длинных трубчатых костей нижних конечностей является трудной и до настоящего времени окончательно не решенной проблемой современной ортопедии. Основные проблемы в лечении обширных дефектов — длительные сроки созревания регенерата и образование ложного сустава в зоне стыковки костных фрагментов после замещения дефекта.

Чтобы обеспечить запросы практической хирургии, необходимы биоинженерные конструкции, пригодные для замещения значительных по площади костных дефектов, характеризующиеся следующими свойствами: сохранение физических и анатомических особенностей донорской кости, высокая прочность, быстрая фиксация в зоне имплантации и репарация тканью реципиента, отсутствие реакции отторжения имплантата, а этим требованиям может удовлетворять только жесткая/упругая матрица, содержащая костные клетки реципиента, способные делиться, дифференцироваться и синтезировать межклеточный матрикс, поддерживающий жизнеспособность клеток.

Целью данного проекта являлось изучение влияния физико-химических и механических свойств органического и неорганического внеклеточного костного матрикса на клетки остеогенного и хондрогенного рядов для управления процессами их пролиферации, дифференцировки и таксиса при заселении матриксов, на формирование и функционирование тканевых имплантатов для задач реконструктивной медицины; разработка протоколов биоинженерии имплантатов.

Создание имплантатов для замещения дефектов тканей включает несколько этапов: выбор и/или создание матрикса с определенными физико-химическими свойствами, получение резидентных клеток,

создание условий для заселения матрикса клетками. При заселении матрикса клетками обязательным условием нормального функционирования и интеграции имплантата с тканью является успешность заселения матрикса клетками. При этом необходимо обеспечить высокую скорость заселения имплантата при оптимальной для ткани плотности клеток. Известно, что, наряду с молекулярно-генетическими сигналами (например, транскрипционные факторы, факторы роста), физико-химические, и в том числе механические свойства матрикса, оказывают существенное влияние на рост, таксис и дифференцировку клеток, поэтому матрикс должен обладать свойствами, обеспечивающими жизнедеятельность клеток и препятствующими их дедифференцировке. Кроме того, необходимо создать возможности для нормального метаболизма клеток в имплантате, включая условия для формирования сосудов, или обеспечить другие способы доставки и отведения метаболитов, как в случае с тканью гиалинового хряща, где сосуды отсутствуют.

Одной из главных проблем культивирования клеток на матриксах и подложках различной природы является низкая эффективность заселения матриц-носителей клетками и их неравномерное распределение по структуре матриц (Pallante A.L., 2012).

В настоящее время идет разработка и тестирование материалов, которые бы могли заполнить дефекты костной ткани, образовавшиеся в результате патологического процесса, однако остеоиндуктивные и остеокондуктивные свойства этих материалов недостаточны для замещения дефектов объемом более 1 $см^3$ (Кирилова И., 2012; Tevlin R., 2014; Комлев В.С., 2015; Smith B.D., 2015). Это связано с несколькими факторами. Костная и хрящевая ткань несут механическую нагрузку и обладают сбалансированными упруго-прочностными характеристиками. Показано, что при излишней жесткости имплантата из твердых материалов, таких как металлокерамика, может травмироваться ткань, его окружающая (Прохоренко В., 2007; Nakase T., 2009). Еще одной нерешенной проблемой являются неподходящие физико-химические свойства поверхности материалов, предлагаемых клеткам в качестве межклеточного матрикса (Martinetti R., 2005; Figueiredo A., 2013).

По мере накопления и анализа данных, касающихся клеточной инженерии, формируется новое направление: разработка различных материалов, по своим биологическим свойствам приближающимся к нативной костной и хрящевой ткани. Проблему недостаточно быстрого заселения матрицы клетками *in vivo* в настоящее время пытаются решить с помощью веществ или субстанций, инициирующих формирование костных структур (Кирилова И., 2019; Bissell, 2014).

Тем не менее необходимо понимать, что с увеличением глубины миграции клеток внутри матрицы при больших дефектах и соответ-

ствующих размерах матриц нарушается микроциркуляция, что ведет к недостаточному обеспечению клеток питанием, низкой скорости передачи гуморальных сигналов и ответа клеток на них, отвода метаболитов, производимых клетками, т. е. к замедлению метаболизма клеток в тканеинженерной конструкции. Последние исследования в этой области свидетельствуют о необходимости механических и электрических стимулов для нормального функционирования клеток костной (Thompson W., 2012; Maeda A., 2015; Kawase T., 2014; Iolascon G., 2014) и хрящевой тканей (Okada M., 2013; Johnson Z.I., 2014; Huang L., 2015; Cao X., 2015), однако при конструировании матриц и имплантатов это пока учитывается недостаточно. Нет четких протоколов заселения, не создано специальное оборудование, обеспечивающее процесс.

В настоящее время усилия разработчиков тканеинженерных конструкций для восстановления костного дефекта направлены на оптимизацию условий культивирования и управляемой дифференцировки клеток, полученных из разных источников. Поэтому в системе *in vitro* исследуются влияния на клетки остеогенного ряда различных стимулирующих эффекторов (факторов роста — ТФР-, ИФР-, костных морфогенетических белков, протеогликанов и их производных и т. д.) с целью установить их терапевтическую значимость для клинического применения (Boon M.R., 2011; Sarahrudi K., 2012; Salbach J. 2012; Kaiser G., 2012; Lowery J.W., 2012; Okada M., 2013; Bertrand J., 2013; Bissell L., 2014; Berendsen A.D., 2014; Poniatowski L.A., 2015).

Таким образом, существующие проблемы в возможности регенерации костной ткани остаются нерешенными, несмотря на многочисленность подходов, которые могли бы способствовать решению этих проблем. Несомненно, что для их решения требуется комплексный системный подход, позволяющий учесть многие факторы. В качестве оптимального заместителя дефектов костной ткани представляется использование имплантата, состоящего из костного матрикса, обладающего необходимыми физико-химическими и механическими характеристиками, заселенного аутологичными клетками.

Предлагаемые нами методы воздействия на матриксы обладают перед всеми вышеописанными следующим преимуществом: впервые апробирован способ воздействия на клетки физическими методами через воздействие на матриксы (деформация матриксов, электромагнитные поля и др.). В данной работе были объединены усилия медиков, биологов, математиков и физиков по созданию тканеинженерных конструкций, обладающих заданными механическими свойствами и способностью активировать остеогенез.

## Список литературы к Введению


1. *Кирилова И.А.*, *Фомичев Н.Г.*, *Подорожная В.Т.*, *Трубников В.И.* Новые виды материалов для костной пластики в свете современных представлений о костных трансплантатах // Хирургия позвоночника. 2007. № 2. С. 66–70.
2. *Pallante A.L.*, *Gortz S.*, *Chen A.C. et al.* Treatment of articular cartilage defects in the goat with frozen versus fresh osteochondral allografts: effects on cartilage stiffness, zonal composition, and structure at six months // J. Bone Joint Surg Am. 2012. V. 94(21). P. 1984–1995. doi:10.2106/JBJS.K.00439
3. *Кирилова И.А.*, *Садовой М.А.*, *Подорожная В.Т.* Сравнительная характеристика материалов для костной пластики: Состав и свойства // Хирургия позвоночника. 2012. № 3. С. 72–83.
4. *Гурин А.Н.*, *Комлев В.С.*, *Федотов А.Ю. и др.* Сравнительная характеристика материалов на основе хитозана, альгината и фибрина в комплексе с В-трикальцийфосфатом для остеопластики (экспериментально-морфологическое исследование) // Стоматология. 2014. № 1. С. 4–10.
5. *Smith B.D.*, *Grande D.A.* The current state of scaffolds for musculoskeletal regenerative applications // Nat. Rev. Rheumatol. 2015. V. 11(4). P. 213–222.
6. *Tevlin R.*, *McArdle A.*, *Atashroo D. et al.* Biomaterials for craniofacial bone engineering // J. Dent. Res. 2014.
7. *Прохоренко В.М.* Первичное и ревизионно эндопротезирование тазобедренного сустава. Новосибирск, 2007.
8. *Nakase T.*, *Fujii M.*, *Myoui A. et al.* Use of hydroxyapatite ceramics for treatment of nonunited osseous defect after open fracture of lower limbs // Arch. Orthop. Trauma Surg. 2009. V. 129(11). P. 1539–1547.
9. *Кирилова И.А.*, *Фомичев Н.Г.*, *Подорожная В.Т.*, *Этитейн Ю.В.* Сочетанное использование остеопластики и обогащенной тромбоцитами плазмы в травматологии и ортопедии // Травматология и ортопедия России. 2008. № 3. С. 63–67.
10. *Bissell L.*, *Tibrewal S.*, *Sahni V.*, *Khan W.S.* Growth factors and platelet rich plasma in anterior cruciate ligament reconstruction // Curr. Stem. Cell. Res. Ther. 2014. V. 10(1). P. 19–25.
11. *Martinetti R.*, *Dolcini L.*, *Mangano C.* Physical and chemical aspects of a new porous hydroxyapatite // Anal. Bioanal. Chem. 2005. V. 381(3). P. 634–638.
12. *Figueiredo A.*, *Coimbra P.*, *Cabrita A. et al.* Comparison of a xenogeneic and an alloplastic material used in dental implants in terms of physicochemical characteristics and *in vivo* inflammatory response // Mater Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. 2013. V. 33(6). P. 3506–3513.

13. *Okada M., Kim J.H., Hutton W.C., Yoon S.T.* Upregulation of intervertebral disc-cell matrix synthesis by pulsed electromagnetic field is mediated by bone morphogenetic proteins // J. Spinal. Disord. Tech. 2013. V. 26(3). P. 167–173.
14. *Huang L., Cai X., Li H., Xie Q., Zhang M., Yang C.* The effects of static pressure on chondrogenic and osteogenic differentiation in condylarchondrocytes from temporomandibular joint //Arch. Oral. Biol. 2015. V. 60(4). P. 622–630.
15. *Cao X., Xia H., Li N., Xiong K., Wang Z., Wu S.* A mechanical refractory period of chondrocytes after dynamic hydrostatic pressure //Connect Tissue Res. 2015. V. 14. P. 1–7.
16. *Johnson Z.I., Shapiro I.M., Risbud M.V.* Extracellular osmolarity regulates matrix homeostasis in the intervertebral disc and articular cartilage: evolving role of TonEBP // Matrix Biol. 2014. V. 40. P. 10–16.
17. *Maeda A., Bandow K., Kusuyama J. et al.* Induction of CXCL2 and CCL2 by pressure force requires IL-1?-MyD88 axis in osteoblasts // Bone. 2015. V. 74. P. 76–82.
18. *Kawase T., Tanaka T., Minbu H. et al.* An atmospheric-pressure plasma-treated titanium surface potentially supports initial cell adhesion, growth, and differentiation of cultured human prenatal-derived osteoblastic cells // J. Biomed. Mater Res. B. Appl. Biomater. 2014. V. 102(6). P. 1289–1296.
19. *Iolascon G., Resmini G., Tarantino U.* Mechanobiology of bone // Aging. Clin. Exp. Res. 2013. V. 25. Suppl. 1. P. S3–7.
20. *Thompson W.R., Rubin C.T., Rubin J.* Mechanical regulation of signaling pathways in bone // Gene. 2012. V. 503(1). P. 179–193.
21. *Poniatowski L.A., Wojdasiewicz P., Gasik R., Szukiewicz D.* Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation offracture healing biology and potential clinical applications // Mediators Inflamm. 2015. V. 2015. P. 137823.
22. *Bissell L., Tibrewal S., Sahni V., Khan W.S.* Growth factors and platelet rich plasma in anterior cruciate ligament reconstruction // Curr. Stem. Cell. Res. Ther. 2014. V. 10(1). P. 19–25.
23. *Okada M., Kim J.H., Yoon S.T., Hutton W.C.* Pulsed Electromagnetic Field (PEMF) plus BMP-2 upregulates intervertebral disc-cell matrix synthesis more than either BMP-2 alone or PEMF alone // J. Spinal. Disord. Tech. 2013. V. 26(6). P. E221–226.
24. *Kaiser G., Thomas A., Kottstorfer J. et al.* Is the expression of Transforming Growth Factor-Beta1 after fracture of long bones solely influenced by the healing process? // Int. Orthop. 2012. V. 36(10). P. 2173–2179.
25. *Lowery J.W., Pazin D., Intini G.* The role of BMP2 signaling in the skeleton // Crit. Rev Eukaryo.t Gene Expr. 2011. V. 21(2). P. 177–185.

26. *Boon M.R.*, *van der Horst G.*, *van der Pluijm G.* Bone morphogenetic protein 7: a broad-spectrum growth factor with multiple target therapeutic potency // Cytokine Growth Factor Rev. 2011. V. 22(4). P. 221–229.

27. *Bertrand J.*, *Stange R.*, *Hidding H.* Syndecan 4 supports bone fracture repair, but not fetal skeletal development, in mice // Arthritis Rheum. 2013. V. 65(3). P. 743–752.

28. *Berendsen A.D.*, *Pinnow E.L.*, *Maeda A.* Biglycan modulates angiogenesis and bone formation during fracture healing // Matrix. Biol. 2014. V. 35. P. 223–231.

29. *Salbach J.*, *Kliemt S.*, *Rauner M.* The effect of the degree of sulfation of glycosaminoglycans on osteoclast function and signaling pathways // Biomaterials. 2012. V. 33(33). P. 8418–8429.

30. *Sarahrudi K.*, *Kaiser G.*, *Thomas A.* The influence of low molecular weight heparin on the expression of osteogenic growth factors in human fracture healing // Int. Orthop. 2012. V. 36(5). P. 1095–1098.

# 1. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АУТО- И АЛЛОТРАНСПЛАНТАТОВ ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ ПРИ РЕЗЕКЦИЯХ ОПУХОЛЕЙ КОСТЕЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

*Е.А. Анастасиева, М.А. Садовой, А.А. Воропаева, И.А. Кирилова*

Травматология и ортопедия России. 2017. Т. 23, № 3. С. 148–155

Проблема замещения крупных костных дефектов, образующихся после сегментарных резекций костей по поводу новообразований, остается актуальной в современной ортопедии. Трудность представляет замещение сегментарных дефектов, особенно при нарушении нормальной биомеханики, так как пластика костного дефекта аутологичной костью не всегда представляется возможной. Это обусловлено размером дефекта, который может быть настолько большим, что выполнение забора необходимого объема аутокости не представляется возможным. Поэтому в качестве альтернативы аутотрансплантату используют аллотрансплантаты на основе аллокости после различных видов обработки, сочетающие оптимальные свойства для остеорегенерации. Для ряда композиционных материалов возможно программирование свойств трансплантата путем изменения его состава. Анализ литературы показал, что эффективность аллотрансплантата в комбинации с дополнительными компонентами сопоставима по результативности с применением аутокости. В качестве дополнительного компонента материала для стимуляции остеорегенерации могут быть использованы мезенхимальные стволовые клетки как костного мозга, так и жировой ткани. Несмотря на получение удовлетворительных результатов лечения дефектов кости с реконструкцией аллотрансплантатом, некоторые авторы все же отдают предпочтение традиционной методике аппаратного вытяжения. Это связано с ее доказанной эффективностью, стабильностью конструкции и регулируемостью процесса регенерации кости на любом этапе.

На основании анализа данных литературы авторами предложен алгоритм выбора трансплантата при замещении обширных дефектов после сегментарной резекции кости, который создает основу для дифференцированного подхода к лечению.

# 1. THE USE OF AUTO- AND ALLOGRAFTS TO REPLACE BONE DEFECTS IN THE RESECTIONS OF BONE TUMORS (A REVIEW OF THE LITERATURE)

*E.A. Anastasieva, M.A. Sadovoi, A.A. Voropaeva, I.A. Kirilova*

The problem of replacement of large bone defects, which was formed after segmental bone resections in patients with bone tumor still actual in modern orthopedics. The main difficulty is the replacement of segmental defects, especially in cases of disturbance of normal biomechanics, because «gold standard» — reconstruction by the autologous bone is not always possible. This is due to the size of the defect that can be so large that it is impossible to take the necessary amount of autograft. Therefore, allografts based on demineralized bone combining desirable properties for osteoregeneration are used as an alternative for autograft. And for a number of composite materials, it is possible to program the properties of future transplant by changing its contents. It was revealed that the effectiveness of the allograft in combination with additional components is comparable in effectiveness of using autograft. As an additional component for better osteoregeneration, mesenchymal stem cells of both bone marrow and adipose tissue can be used. It is noteworthy that the analyzed studies did not reveal the influence of stem cells on the tumor recurrence. Nevertheless, the authors talk about the need of further researches in this direction to confirm collected results.

Some authors still prefer the traditional method of hardware extension of the bone despite obtaining their own satisfactory results of treating bone defects with allograft reconstruction. This opinion is based on proven effectiveness of method, structural stability of construction during the treatment and ability to regulate the process of bone regeneration at any stage.

Our goal was to analyze publications over the recent 5 years with the results of experiments and studies on the replacement of large bone tissue defects using auto- and allomaterials after resection of the bone tumor.

According to the literature, we proposed a general algorithm for graft selection in the replacement of large bone defects. Suggested algorithm for graft choosing for such bone reconstruction creates the basis for a differentiated approach to treatment. This algorithm justifies the expediency of applying a particular graft due to a variety of criteria.

Замещение обширных костных дефектов, образующихся после сегментарных резекций костей по поводу новообразований, остается актуальной проблемой современной онкоортопедии. Известно, что аутотрансплантат — наиболее приемлемый материал для замещения костной ткани, однако в связи с небольшим объемом и физическими свойствами его использование ограничено [1]. Под предпочитаемыми физическими свойствами трансплантата подразумевается бóльшая

устойчивость к нагрузкам, нежели у аутокости, которая смоделирована под заполняемый дефект. Основную проблему представляет замещение сегментарных дефектов, когда нормальная биомеханика нарушена и структурная стабильность кости как органа может быть поставлена под угрозу [2, 3]. При замещении таких дефектов кости предпочитают использовать аллотрансплантат, несмотря на то, что при этом задействуется меньше механизмов регенерации по сравнению с аутотрансплантатом.

Одной из важных проблем также является необходимость васкуляризации всего трансплантата, поскольку из-за отсутствия соответствующей микроциркуляции не происходит восстановления кости. Таким образом, размер имплантата и его васкуляризация имеют решающее значение для жизнеспособности тканей, функции сухожилий и нервов [2, 4, 5]. Симпатическая нервная система радикальным образом влияет на регенерацию костной ткани, обусловливая плотность костной ткани, скорость репаративных процессов, активность остеобластов и остеокластов [4]. Частично такой эффект объясняется гипотезой о наличии у клеток костной ткани $\beta$2-адренорецепторов [4].

Помимо обозначенных выше проблем, важную роль играет стабильность трансплантата, поскольку она влияет на частоту возникновения инфекционных осложнений и скорость репаративных процессов. В случае нестабильности конструкции возникает раздражение окружающих тканей, вызывающее воспалительный процесс, болевой синдром и другие клинические симптомокомплексы [6].

При замещении костных дефектов учитываются следующие онкологические аспекты [5–21].

1. Доброкачественным или злокачественным является удаленное образование. Этот аспект обусловливает хирургическую тактику резекции пораженного участка (соблюдение норм абластичности) и дальнейшее медицинское сопровождение в постоперационном периоде [7–19].
2. Возраст пациента. У детей регенеративный потенциал костной ткани намного выше, чем у взрослых, вследствие чего становится возможным максимально физиологичное в конкретной ситуации восстановление кости. Дети требуют более деликатного подхода, так как оперативное вмешательство должно обеспечить сохранение функции и стабильности пораженного сегмента в динамике роста [20–24].
3. Локализация процесса и его характер (первичный или метастатический). Этот аспект влияет на объем резецированного участка и степень радикальности операции по удалению пораженного

сегмента. Индивидуально определяется химиотерапевтическое сопровождение в постоперационном периоде [25–29].

4. У пациентов пожилого и старческого возраста с метастазированием операция зачастую является паллиативной мерой, соответственно корректируется и хирургическая тактика [30–33].
5. При повторных оперативных вмешательствах на том же сегменте, помимо принципов абластичности, определяющих объем резецированного участка, критически важным становится сохранение стабильности выбранной конструкции для регенерации удаленного фрагмента кости [32, 34].

Актуальность нашего обзора литературы обусловлена сложной перестройкой трансплантатов, поскольку при дефекте объемом более 4 $см^3$ реконструкция микроциркуляторного русла и, как следствие, регенерация костной ткани затруднены [35].

Дефекты костной ткани можно разделить на две группы:

— дефекты костной полости, не влияющие на биомеханику конечности, но препятствующие остеосинтезу или артропластике;
— сегментарные дефекты, отражающиеся на нормальной биомеханике и структурной стабильности кости как органа.

Такое разделение дефектов позволяет составить основу алгоритма выбора трансплантата при заданной патологии.

В качестве альтернативы аутотрансплантатам перспективным материалом для замещения костных дефектов могут быть аллотрансплантаты на основе деминерализованной кости, которые обладают необходимыми остеоиндуктивными свойствами [35, 36]. Для некоторых композиционных материалов свойственны дополнительные эффекты за счет добавления в состав костнозамещающей композиции пластификаторов, придающих упруго-эластические свойства, различных лекарственных средств, стволовых клеток. Эффективность аллотрансплантата в комбинации с дополнительными компонентами сопоставима по результативности с применением аутокости, в том числе в отдаленном периоде [37, 38].

M. Gharedaghi в своих исследованиях показал, что применение аллотрансплантатов для замещения массивных костных дефектов после резекции как доброкачественной, так и злокачественной опухолей кости, практически не отличается от применения аутокости [37]. К схожим выводам пришли и другие авторы [33, 39–48]. По данным разных авторов, 5-летняя выживаемость пациентов составляет от 73 % и выше, рецидивирование опухоли возникало менее чем в 13 %, при этом авторы не связывают эти случаи с применением аллотрансплантата [39, 43, 48]. Они, скорее, обусловлены погрешностями в технике выполне-

ния операционного вмешательства. Сообщается об удовлетворительных результатах применения аллокости в ортопедической онкологии у пациентов детского возраста, при этом описывается случай массивной резорбции всего трансплантата [41, 45, 49].

В случае замещения нагружаемого участка кости аллотрансплантат показал себя недостаточно прочным, а его выживаемость в диапазоне от 5 до 10 лет составила 75–83 % [39].

В случае же тяжелого поражения кости с включением в процесс сустава вместе с его тотальной резекцией показано выполнение эндопротезирования [6, 50–57]. D.A. Müller с соавторами в таких случаях предлагает дополнительно использовать аллокость, которая восполняет утраченный объем костной ткани [53]. Имеются данные, подтверждающие эффективность методики D.A. Müller с соавторами, приведены положительные результаты такого лечения. Так, K. Nakamura описывает применение комбинированной с аллокостью техники эндопротезирования с успешным восстановлением пациентов после операции [58].

Некоторые авторы пишут о преимуществах комбинированного использования ауто- и аллотрансплантата, объясняя положительные результаты исследования тем, что аутотрансплантат уже имел в своей структуре остеогенные и МСК клетки, обеспечивающие эффект стимуляции остеорегенерации, что особенно важно при заполнении больших дефектов [47, 59, 60].

R. Gouron в своем исследовании показал, что особенно деликатного подхода требуют пациенты детского возраста, в этих случаях четко должны быть определены показания для использования трансплантата того или иного типа [49]. А при лечении крупных дефектов кости, особенно при поражении области, подверженной высокой нагрузке, важным является применение методики с использованием поддерживающей и отграничивающей структуры по типу мембраны. Такой подход позволяет моделировать форму будущего регенерата. Анализируя результаты другого исследования, R. Gouron с соавторами отметили осложнения в качестве несращения дефекта у 35 % больных, которые в дальнейшем были корригированы [41]. Среди пациентов детского возраста авторы описали единичный случай тотальной резорбции аллотрансплантата.

О возможностях использования аллогенного материала после резекции опухоли позвоночника единым блоком сообщают R.A. Glennie с соавторами [61]. При реконструкции дефекта более чем на одном уровне авторы рекомендует использование аллотрансплантата или его комбинацию с кейджем — полой каркасной вставкой между телами позвонков, относящейся к металлоконструкциям.

Перспективным является комбинирование пластичного, способного заполнить дефект различной формы интраоперационно, аллогенного материала с необходимыми химиопрепаратами с контролируемой десорбцией для поддержания эффективной концентрации на определенный период времени.

Об использовании стволовых клеток в качестве дополнительного компонента для улучшения остеорегенерации сообщают P. Avril с соавторами [59]. Результаты их исследования показали, что после применения МСК не возникает рецидивирования костной опухоли, однако уже имеющиеся метастазы в легких могут прогрессировать. При применении стволовых клеток жировой ткани также не наблюдалось рецидивов. *In vivo* не выявлено воздействия МСК на опухолевые клетки. Тем не менее авторы говорят о необходимости дальнейших исследований для подтверждения полученных результатов.

При невозможности использования алло- и аутотрансплантатов некоторые авторы предпочитают аппаратное вытяжение конечности. Основными положительными факторами такого метода являются его доказанная временем эффективность, стабильность и регулируемость процесса регенерации кости [62, 63]. Остеосинтезу с металлоконструкцией отдают предпочтение M.P. Bus с соавторами, несмотря на собственные удовлетворительные результаты использования аллокости, объясняя это тем, что при использовании аллографтов для замещения дефекта более 15 $см^3$ возрастает частота осложнений [64].

В связи со все более широким использованием аллокости стали говорить о необходимости создания виртуального 3D-банка аллотрансплантатов. Это позволило бы осуществлять более точный подбор материала с учетом имеющихся результатов исследований, таких как КТ и МРТ, для замещения крупных дефектов костной ткани в ортопедической онкологии [65, 66]. Также имеется тенденция к заполнению таких дефектов материалами, изготовленными с помощью 3D-печати и имеющими в составе комбинацию костнозамещающего вещества и аллостружки [67].

На основании анализа данных литературы мы разработали алгоритм выбора трансплантата для замещения обширных дефектов после сегментарной резекции кости, который может служить основой для дифференцированного подхода к лечению. Он также может быть полезен при лечении пациентов с онкопатологией, однако с дополнительным проведением соответствующих противоопухолевых мероприятий. Мы предлагаем разделить все поражения по принципу возможности использования аутологичной кости при замещении дефекта. Следующим критерием выбора трансплантата является тип дефекта, его влияние на биомеханику и структурную стабильность кости как органа.

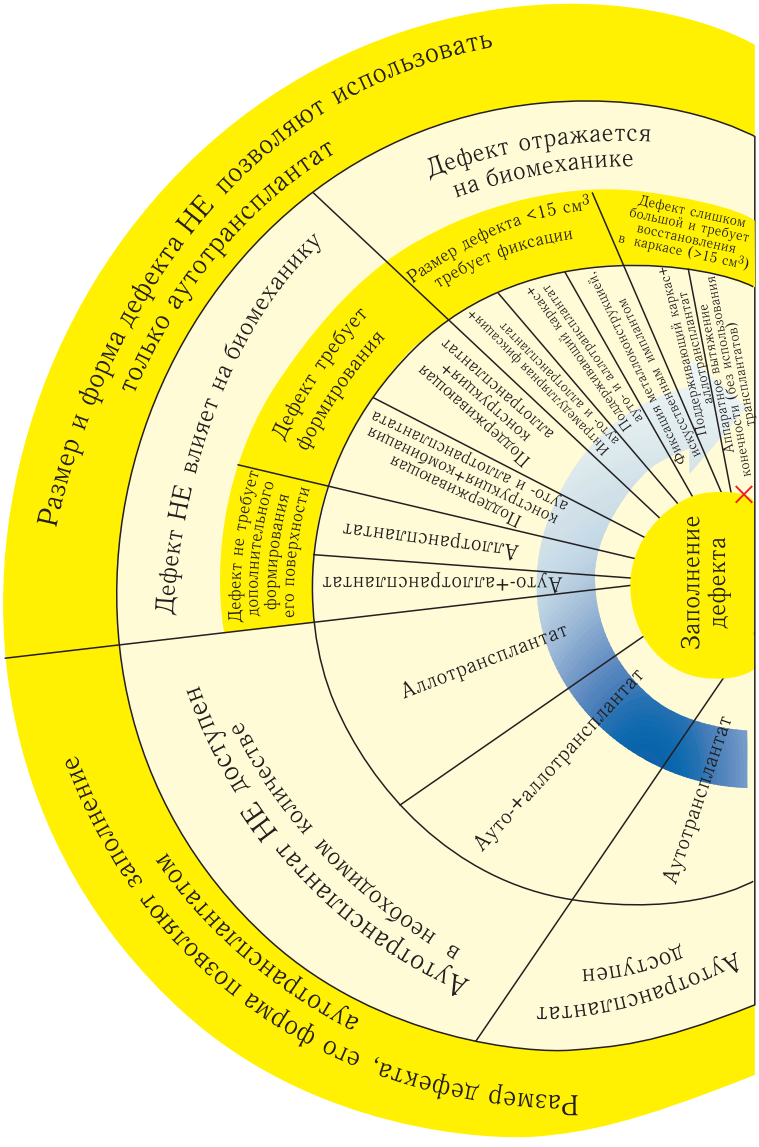


Рис. 1.1. Алгоритм выбора трансплантата при замещении крупных костных дефектов. *Примечание:* синяя стрелочка указывает направление от наиболее к наименее предпочитаемому варианту лечения; красный крестик — на то, что заполнение дефекта каким-либо материалом не проводят

Мы попытались учесть и возможную необходимость дефекта в дополнительной фиксации — так называемого «каркаса». В случае невозможности заполнения костного дефекта большого размера использованы данные о применении альтернативных методик: установка конструкции из никелида титана в качестве имплантата, реконструкция такого повреждения методом аппаратного вытяжения Г.А. Илизарова. При этом вопрос дополнительной внешней фиксации любого дефекта (вне предложенной тактики) решается хирургом в индивидуальном порядке в зависимости от стабильности повреждения. Также для каждого пациента в индивидуальном порядке должен решаться вопрос о химиотерапевтическом сопровождении.

Диаграмма построена слева направо: от наиболее предпочитаемого к наименее предпочитаемому варианту лечения (рис. 1.1).

В ходе выбора тактики лечения мы предлагаем сначала определить, позволяют ли размер дефекта и его форма использовать аутотрансплантат. Самым предпочитаемым вариантом является использование собственных тканей для заполнения костного дефекта. При отсутствии аутологичного материала в необходимом количестве допускается его комбинация с аллотрансплантатом либо использование аллотрансплантатов в различной комбинации. Если на этапе определения размера и формы дефекта становится понятным, что использовать только аутологичный материал невозможно, определяется влияние поражения на биомеханику. В случае биомеханически незначимого дефекта решается вопрос о необходимости его дополнительного формирования. Его формирование подразумевает восстановление ткани в поддерживающем «каркасе» с последующим заполнением либо комбинацией ауто- и аллотрансплантата, либо аллотрансплантатом соответственно существующим методикам лечения.

При определении биомеханически значимого дефекта предполагается, что повреждение требует дополнительной фиксации. Выбор способа реконструкции зависит от размера дефекта. Замещение дефекта объемом менее 15 $см^3$ может выполняться различными методами: интрамедуллярная фиксация с комбинацией ауто- и аллотрансплантата; восстановление на поддерживающем каркасе с комбинацией ауто- и аллотрансплантата; фиксация дефекта с помощью искусственного имплантата (например, из никелида титана). Однако при дефекте более 15 $см^3$ предпочтительнее выполнять аппаратное вытяжение пораженного сегмента без использования каких-либо имплантатов.

## Список литературы


1. *Qu H., Guo W., Yang R., Li D., Tang S., Yang Y. et al.* Reconstruction of segmental bone defect of long bones after tumor resection by devitalized tumor-bearing bone // World J. Surgical Oncology. 2015. V. 13. P. 282.
2. *Guerado E., Caso E.* Challenges of bone tissue engineering in orthopaedic patients // World J. Orthopedics. 2017. V. 8, No 2. P. 87–98.
3. *Glatt V., Evans C.H., Tetsworth K.* A Concert between Biology and Biomechanics: The Influence of the Mechanical Environment on Bone Healing // Frontiers in Physiology. 2016. V. 7. P. 678.
4. *Elefteriou F., Campbell P., Ma Y.* Control of Bone Remodeling by the Peripheral Sympathetic Nervous System // Calcified tissue international. 2014. V. 94, No 1. P. 140–151.
5. *Muramatsu K., Ihara K., Miyoshi T., Yoshida K., Iwanaga R., Hashimoto T. et al.* Stimulation of neo-angiogenesis by combined use of irradiated and vascularized living bone graft for oncological reconstruction // Surg. Oncol. 2012. V. 21, No 3. P. 223–229.
6. *Казарезов М.В., Прохоренко В.М., Королева А.М.* Ортопедия и восстановительная хирургия: Руководство по ортопедии. Новосибирск: ННИИТО, НПО «БРИЗ», 2008.
7. *Балберкин А.В., Шавырин Д.А.* Клиника, диагностика и хирургическое лечение опухолей костей области коленного сустава (обзор литературы) // Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. 2013. Т. 1. С. 15–23.
8. *Терсков А.Ю., Иванов В.В., Николаенко А.Н.* Наша тактика в диагностике и лечении больных с гигантоклеточными опухолями костей // Гений ортопедии. 2013. Т. 2. С. 67–71.
9. *Dittrich C., Kosty M., Jezdic S. et al.* ESMO / ASCO Recommendations for a Global Curriculum in Medical Oncology Edition 2016 // ESMO Open. 2016. V. 1(5). P. e000097.
10. *Fritzsche H., Schaser K.D., Hofbauer C.* [Benign tumours and tumour-like lesions of the bone: General treatment principles] // Orthopade. 2017. V. 46(6). P. 484–497 (in German).
11. *Hillmann A., Gösling T.* [Benign bone tumors. General principles] // Unfallchirurg. 2014. V. 117, No 10. P. 873–882 (in German).
12. *Leavey P.J.* Important principles in Ewing sarcoma treatment // Pediatr Blood Cancer. 2014. V. 61, No 12. P. 2149–2150.
13. *Mavrogenis A.F., Angelini A., Vottis C., Palmerini E., Rimondi E., Rossi G., Papagelopoulos P.J., Ruggieri P.* State-of-the-art approach for bone sarcomas // Eur J. Orthop. Surg. Traumatol. 2015. V. 25, No 1. P. 5–15.

14. *Panagopoulos G.N.*, *Mavrogenis A.F.*, *Mauffrey C.*, *Lesenský J.*, *Angelini A.*, *Megaloikonomos P.D.*, *Igoumenou V.G.*, *Papanastassiou J.*, *Savvidou O.*, *Ruggieri P.*, *Papagelopoulos P.J.* Intercalary reconstructions after bone tumor resections: a review of treatments // Eur J. Orthop. Surg. Traumatol. 2017.

15. *Borzunov D.Y.*, *Balaev P.I.*, *Subramanyam K.N.* Reconstruction by bone transport after resection of benign tumors of tibia: A retrospective study of 38 patients // Indian J. Orthopaedics. 2015. V. 49, No 5. P. 516–522.

16. *Puri A.*, *Gulia A.*, *Byregowda S.*, *Ramanujan V.* Reconstruction of the elbow and forearm for Ewing sarcoma of ulna: A new biological technique // Intern. J. Shoulder Surgery. 2016. V. 10, No 2. P. 85–88.

17. *Puri A.* Limb salvage in musculoskeletal oncology: Recent advances. Indian Journal of Plastic Surgery?: Official Publication of the Association of Plastic Surgeons of India. 2014. V. 47, No 2. P. 175–184. doi:10.4103/0970-0358.138937

18. *Puri A.*, *Gulia A.* Management of extremity soft tissue sarcomas // Indian J. Orthop. 2011. V. 45. P. 301–306.

19. *Тихилов Р.М.*, *Пташников Д.А.*, *Микайлов И.М.*, *Засульский Ф.Ю.*, *Григорьев П.В.* Оперативное лечение больных с гигантоклеточной опухолью костей // Онкология. Ж. им. П.А. Герцена. 2017. Т. 6, № 1. С. 5–11.

20. *Ramphal R.*, *Aubin S.*, *Czaykowski P. et al.* Adolescent and young adult cancer: principles of care // Current Oncology. 2016. V. 23, No 3. P. 204–209.

21. *Садовой М.А.*, *Мацук С.А.*, *Сагдеев Д.О.*, *Подорожная В.Т.*, *Кирилова И.А.*, *Мацук К.С.* Хирургическое лечение костных опухолей у детей // Травматология жанэ ортопедия. 2007. Т. 2. С. 134–137.

22. *Нисиченко Д.В.*, *Хестанов Д.Б.*, *Михайлова Е.В.*, *Харбедия В.Х.*, *Илюшина О.В.*, *Малахова А.А.*, *Дзампаев А.З.*, *Алиев М.Д.* Субтотальная резекция большеберцовой кости в НИИ детской онкологии и гематологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России // Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. 2017. Т. 1. С. 52–58.

23. *Nieminen J.*, *Pakarinen T.K.*, *Laitinen M.* Orthopaedic reconstruction of complex pelvic bone defects. Evaluation of various treatment methods // Scand J. Surg. 2013. V. 102, No 1. P. 36–41.

24. *Ryzhikov D.V.*, *Gubina E.V.*, *Podorozhnaya V.T.*, *Senchenko E.V.*, *Sadovoy M.A.* Repair of defects and osteosynthesis of long bones in children with osteoclastoma // AIP Conf. Proc. 2016. T. 020059.

25. *Иванова М.В.*, *Карпенко В.Ю.*, *Бухаров А.В.*, *Державин В.А.* Эндопротезирование плечевого сустава при метастатическом поражении проксимального отдела плечевой кости на фоне иммуносупрессивной терапии // Исследования и практика в медицине. 2017. Т. 4, № 1. Р. 58–62.

26. *Khan Z.*, *Hussain S.*, *Carter S.R.* Tumours of the foot and ankle // Foot (Edinb). 2015. V. 25, No 3. P. 164–172.

27. *Gupta S.K.*, *Alassaf N.*, *Harrop A.R.*, *Kiefer G.N.* Principles of rotationplasty // J. Am Acad. Orthop. Surg. 2012. V. 20, No 10. P. 657–667.

28. *Malviya A.*, *Gerrand C.* Evidence for orthopaedic surgery in the treatment of metastatic bone disease of the extremities: a review article // Palliat Med. 2012. V. 26, No 6. P. 788–796.

29. *Piccioli A.*, *Maccauro G.*, *Spinelli M.S.*, *Biagini R.*, *Rossi B.* Bone metastases of unknown origin: epidemiology and principles of management // J. Orthopaedics and Traumatology?: Official J. Italian Society of Orthopaedics and Traumatology. 2015. V. 16, No 2. P. 81–86.

30. *Cheng D.*, *Yang J.*, *Hu T.*, *Yang Q.* Efficacy of limb salvage with primary tumor resection simultaneously for solitary bone metastasis in limbs // World J. Surgical Oncology. 2015. V. 14. P. 31.

31. *Gösling T.*, *Becker-Schiebe M.* [Surgical treatment of skeletal metastases] // Unfallchirurg. 2015. V. 118(4). P. 347–363 (in German).

32. *Scolaro J.A.*, *Lackman R.D.* Surgical management of metastatic long bone fractures: principles and techniques // J. Am. Acad. Orthop. Surg. 2014. V. 22, No 2. P. 90–100.

33. *Wessling M.*, *Pflugmacher R.*, *Mьller M.C.*, *Kabir K.*, *Pennekamp P.H.* [Basic principles of surgical treatment of bone metastases] // Z. Orthop. Unfall. 2013. V. 1513. P. 303–314; quiz 315.

34. *Aponte-Tinao L.A.*, *Ritacco L.E.*, *Albergo J.I.*, *Ayerza M.A.*, *Muscolo D.L.*, *Farfalli G.L.* The principles and applications of fresh frozen allografts to bone and joint reconstruction // Orthop Clin North Am. 2014. V. 45, No 2. P. 257–269.

35. *Кирилова И.А.*, *Садовой М.А.*, *Подорожная В.Т.* Сравнительная характеристика материалов для костной пластики: состав и свойства // Хирургия позвоночника. 2012. Т. 3. С. 72–83.

36. *Подорожная В.Т.*, *Садовой М.А.*, *Кирилова И.А.*, *Шаркеев Ю.П.*, *Легостаева Е.В.* Аллогенные костные материалы: структура, свойства, применение // Известия высших учебных заведений. Физика. 2013. Т. 56, № 12–3. С. 14–20.

37. *Gharedaghi M.*, *Peivandi M.T.*, *Mazloomi M.*, *Shoorin H.R.*, *Hasani M.*, *Seyf P. et al.* Evaluation of Clinical Results and Complications of Structural Allograft Reconstruction after Bone Tumor Surgery // Archives of Bone and Joint Surgery. 2016. V. 4, No 3. P. 236–242.

38. *Zamiri B.*, *Shahidi S.*, *Eslaminejad M.B.*, *Khoshzaban A.*, *Gholami M.*, *Bahramnejad E. et al.* Reconstruction of human mandibular continuity defects with allogenic scaffold and autologous marrow mesenchymal stem cells // J. Craniofac. Surg. 2013. V. 24, No 4. P. 1292–1297.

39. *Ayerza M.A.*, *Piuzzi N.S.*, *Aponte-Tinao L.A.*, *Farfalli G.L.*, *Muscolo D.L.* Structural allograft reconstruction of the foot and ankle after tumor resections // Musculoskelet Surg. 2016. V. 100, No 2. P. 149–156.

40. *Chen W.M.*, *Wu P.K.*, *Chen C.F.*, *Chung L.H.*, *Liu C.L.*, *Chen T.H.* High-grade osteosarcoma treated with hemicortical resection and biological reconstruction // J. Surg. Oncol. 2012. V. 105, No 8. P. 825–829.

41. *Gouron R.*, *Deroussen F.*, *Plancq M.C.*, *Collet L.M.* Bone defect reconstruction in children using the induced membrane technique: a series of 14 cases // Orthop. Traumatol. Surg. Res. 2013. V. 99, No 7. P. 837–843.

42. *Halim A.S.*, *Chai S.C.*, *Wan Ismail W.F.*, *Wan Azman W.S.*, *Mat Saad A.Z.*, *Wan Z.* Long-term outcome of free fibula osteocutaneous flap and massive allograft in the reconstruction of long bone defect // J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg. 2015. V. 68, No 12. P. 1755–1762.

43. *Han G.*, *Wang Y.*, *Bi W.*, *Jia J.*, *Wang W.*, *Xu M. et al.* Reconstruction using massive allografts after resection of extremity osteosarcomas the study design: A retrospective cohort study // Intern. J. Surg. 2015. V. 21. P. 108–111.

44. *Houdek M.T.*, *Wagner E.R.*, *Stans A.A.*, *Shin A.Y.*, *Bishop A.T.*, *Sim F.H. et al.* What Is the Outcome of Allograft and Intramedullary Free Fibula (Capanna Technique) in Pediatric and Adolescent Patients With Bone Tumors? // Clinical Orthopaedics and Related Research. 2016. V. 474, No 3. P. 660–668.

45. *Li J.*, *Shi L.*, *Chen G.J.* Image navigation assisted joint-saving surgery for treatment of bone sarcoma around knee in skeletally immature patients // Surg. Oncol. 2014. V. 23, No 3. P. 132–139.

46. *Farfalli G.L.*, *Aponte-Tinao L.*, *Lopez-Millan L.*, *Ayerza M.A.*, *Muscolo D.L.* Clinical and functional outcomes of tibial intercalary allografts after tumor resection // Orthopedics. 2012. V. 35, No 3. P. e391–6.

47. *Nogueira Drumond J.M.* Benign bone tumors and tumor-like bone lesions: treatment update and new trends // Rev. Bras. Ortop. 2015. V. 44, No 5. P. 386–390.

48. *Wang W.*, *Wang Y.*, *Bi W.*, *Yang J.*, *Han G*, *Ia J. et al.* Allogeneic bone transplantation for pelvic reconstruction of large skeletal defects after tumor resection // Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi. 2014. V. 28, No 3. P. 331–334. (Article in Chinese).

49. *Gouron R.* Surgical technique and indications of the induced membrane procedure in children // Orthop. Traumatol. Surg. Res. 2016. V. 102, No 1. P. 133–139.

50. *King J.J.*, *Nystrom L.M.*, *Reimer N.B.*, *Gibbs C.P. Jr*, *Scarborough M.T.*, *Wright T.W.* Allograft-prosthetic composite reverse total shoulder arthroplasty for reconstruction of proximal humerus tumor resections // J. Shoulder Elbow Surg. 2016. V. 25, No 1. P. 45–54.

51. *Микайлов И.М.*, *Григорьев П.В.*, *Пташников Д.А.*, *Майков С.В.* Результаты эндопротезирования плечевого сустава у больных с новообразованиями проксимального отдела плечевой кости. Травматология и ортопедия России. 2014. Т. 4, № 74. С. 27–35.

52. *Тихилов Р.М.*, *Пташников Д.А.*, *Засульский Ф.Ю.*, *Микайлов И.М.*, *Григорьев П.В.*, *Плиев Д.Г.* Ближайшие и среднесрочные результаты эндопротезирования тазобедренного сустава при опухолях проксимального отдела бедренной кости // Травматология и ортопедия России. 2014. V. 2, № 72. С. 14–21.

53. *Müller D.A.*, *Beltrami G.*, *Scoccianti G.*, *Cuomo P.*, *Capanna R.* Allograft-prosthetic composite versus megaprosthesis in the proximal tibia-What works best? // Injury. 2016. V. 47, No 4. P. 124–130.

54. *Al Gheshyan F.*, *Eltoukhy M.*, *Zakaria K.*, *Temple H.T.*, *Asfour S.* Comparison of gait parameters in distal femoral replacement using a metallic endoprosthesis versus allograft reconstruction // J. Orthopaedics. 2015. V. 12, No 1. P. 25–30.

55. *Kotela A.*, *Wilk-Frańczuk M.*, *Żbikowski P.*, *Łęgosz P.*, *Ambroziak P.*, *Kotela I.* Revision knee arthroplasty in patients with inherited bleeding disorders: a single-center experience // Medical Sci. Monitor: Intern. Medical J. Experim. and Clinical Res. 2017. V. 23. P. 129–137.

56. *Rudert M.*, *Holzapfel B.M.*, *von Rottkay E.*, *Holzapfel D.E.*, *Noeth U.* Impaction bone grafting for the reconstruction of large bone defects in revision knee arthroplasty // Oper. Orthop. Traumatol. 2015. V. 27, No 1. P. 35–46.

57. *Sakellariou V.I.*, *Babis G.C.* Management bone loss of the proximal femur in revision hip arthroplasty: Update on reconstructive options // World J. Orthop. 2014. V. 5, No 5. P. 614–622.

58. *Nakamura K.*, *Ohishi M.*, *Matsunobu T.*, *Nakashima Y.*, *Sakamoto A.*, *Maekawa A.* Tumor-induced osteomalacia caused by a massive phosphaturic mesenchymal tumor of the acetabulum: A case report // Rheumatol. 2016. V. 4. P. 1–5.

59. *Avril P.*, *Le Nail L.-R.*, *Brennan M.Á.* Mesenchymal stem cells increase proliferation but do not change quiescent state of osteosarcoma cells: Potential implications according to the tumor resection status // J. Bone Oncology. 2016. V. 5, No 1. P. 5–14.

60. *Kong Y.*, *Wang Y.T.*, *Hu Y.*, *Han W.*, *Chang Y.J.*, *Zhang X.H. et al.* The bone marrow microenvironment is similarly impaired in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation patients with early and late poor graft function // Bone Marrow Transplant. 2016. V. 51, No 1. P. 249–255.

61. *Glennie R.A.*, *Rampersaud Y.R.*, *Boriani S.*, *Reynolds J.J.*, *Williams R.*, *Gokaslan Z.L. et al.* A systematic review with consensus expert opinion of best reconstructive techniques after osseous en bloc spinal column tumor resection // Spine (Phila Pa 1976). 2016. V. 41, No 20. P. 205–211.

62. *Балаев П.И.*, *Борзунов Д.Ю.* Возможности костной пластики по Г.А. Иллизарову в восстановительном лечении пациентов с первичными опухолями костей голени. Сибирский онкологический журнал. 2013. Т. 1, № 55. P. 59–64.

63. *Khira Y.M.*, *Badawy H.A.* Pedicled vascularized fibular graft with Ilizarov external fixator for reconstructing a large bone defect of the tibia after tumor resection // J. Orthopaedics and Traumatology: Official J. Italian Society of Orthopaedics and Traumatology. 2013. V. 14, No 2. P. 91–100.

64. *Bus M.P.*, *Dijkstra P.D.*, *van de Sande M.A.*, *Taminiau A.H.*, *Schreuder H.W.*, *Jutte P.C. et al.* Intercalary allograft reconstructions following resection of primary bone tumors: a nationwide multicenter study // J. Bone Joint Surg. Am. 2014. V. 96, No 4. P. e26.

65. *Wu Z.*, *Fu J.*, *Wang Z.*, *Li X.*, *Li J.*, *Pei Y.* Three-dimensional virtual bone bank system for selecting massive bone allograft in orthopaedic oncology // Intern. Orthop. 2015. V. 39, No 6. P. 1151–1158.

66. *Kwakwa K.A.*, *Vanderburgh J.P.*, *Guelcher S.A.*, *Sterling J.A.* Engineering 3D Models of Tumors and Bone to Understand Tumor-Induced Bone Disease and Improve Treatments // Curr Osteoporos Rep. 2017. V. 15, No 4. P. 247–254.

67. *Горбатов Р.О.*, *Нифтуллаев Р.М.*, *Новиков А.Е.* Прецизионные персонифицированные имплантаты для замещения костных дефектов при лечении пациентов с остеоонкологией // Современные проблемы науки и образования. 2016. Т. 6. С. 247.

# 2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ КОСТНОЙ ПЛАСТИКИ: СОСТАВ И СВОЙСТВА

*И.А. Кирилова, В.Т. Подорожная*

Хирургия позвоночника. 2012. № 3. С. 72–83

Представлена сравнительная оценка существующих материалов для костной пластики. Известные костно-пластические материалы обладают ограниченным набором свойств, преимущественно являясь остеокондуктивными матрицами. Материалы на основе деминерализованной кости сочетают остеокондуктивные и остеоиндуктивные свойства, ряду материалов присущ антибактериальный эффект за счет лекарственных средств, введенных в их состав. Данный обзор может помочь хирургам в осуществлении осмысленного выбора материала, исходя из необходимых в определенной клинической ситуации свойств.

## 2. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF MATERIALS FOR BONE GRAFTING: COMPOSITION AND PROPERTIES

*I.A. Kirilova, V.T. Podorozhnaya*

Comparative characteristics of existing materials for bone plastics are presented. Known osteo-plastic materials have a limited set of properties mainly being osteoconductive matrices. Materials based on demineralized bone combine both osteoconguctive and osteoinductive properties. Some of these materials have inherent antibacterial effect due to drugs introduced into their composition. This survey can help surgeons in the implementation of intelligent selection of material with properties needed in particular clinical situation.

Разнообразие представленных на территории России материалов для костной пластики отечественного и зарубежного производства ставит перед хирургами вопрос выбора материала, оптимального для определенной клинической ситуации. Существует большое количество публикаций с характеристиками отдельных материалов, но часто они подготовлены сотрудниками фирм-производителей и носят рекламный характер. Статьи с результатами морфологического сравнения костных материалов стали появляться в отечественной литературе только в последние 2–3 года [6, 7, 32]. При этом следует заметить, что материал

для костной пластики, то есть для реконструктивно-восстановительных операций на костной ткани в травматологии и ортопедии, челюстно-лицевой хирургии, костной онкологии, может отличаться по происхождению [6, 7, 18, 40].

Существуют биологические материалы (ауто- и алломатериалы, ксеноматериалы, брефоматериалы, биологически активные молекулы белковой и небелковой природы, обладающие свойствами факторов роста), искусственные (синтетические) на основе $\beta$-трикальций фосфата, гидроксиапатита, различных типов керамики, сульфата кальция и др., композиционные (композиты), то есть смесь (композиция) нескольких синтетических и/или биологических материалов для придания им синергичных свойств.

Биологические материалы для восстановления костной ткани по происхождению делятся на аутогенные (донором является сам пациент), аллогенные (донором является другой человек), ксеногенные (донором является животное), биологически активные молекулы белковой и небелковой природы, обладающие свойствами факторов роста [6].

Рассмотрим более подробно состав и свойства материалов и имплантатов, предварительно сгруппированных по происхождению.

**Биологические костно-пластические материалы.**

*Аутотрансплантаты.* Аутогенная кость является лучшим трансплантатом и основным типом костных трансплантатов, широко используемых в виде маленьких фрагментов и кусочков. Прогресс в области микрохирургии позволил пересаживать костные аутотрансплантаты на сосудистой ножке, включая сегмент малоберцовой кости, ребра, подвздошной или лучевой кости, часто в сочетании с сопутствующими мягкими тканями [1–4, 6, 17, 21, 35, 36, 38, 40]. Аутотрансплантаты отличаются по строению и свойствам (табл. 2.1).

Аутогенная губчатая кость из-за отсутствия иммуногенности обладает непосредственно остеогенными и остеоиндуктивными свойствами и имеет идеальную структуру для остеокондукции, является идеальным пластическим материалом с биологических позиций, хотя ограничена в объеме и в механической прочности [6, 17, 21, 35, 36, 38, 40]. Именно на аутогенную губчатую кость как на эталон анатомо-функциональных свойств ориентируются производители искусственных костьзамещающих материалов. Кортикальная аутокость имеет высокие прочностные характеристики, но уступает губчатой по остеоиндуктивным и остеокондуктивным свойствам, а в случае изолированного использования не содержит остеопрогениираторных клеток. Однако забор васкуляризированного и неваскуляризированного аутотрансплантатов влечет

Таблица 2.1. Аутологичные костные трансплантаты

| Свойства | Губчатая аутокость | Неваскуляризированная кортикальная аутокость | Васкуляризированная кортикальная аутокость |
|---|---|---|---|
| Остеокондукция | ++++ | + | + |
| Остеоиндукция | ++ | +/− | +/− |
| Остеопрогенираторные клетки | +++ | − | ++ |
| Прочность сразу после операции | − | +++ | +++ |
| Прочность через 6 мес | ++ | ++/+++ | +++ |
| Прочность через 12 мес | +++ | +++ | +++ |

за собой дополнительный разрез, увеличение болезненности и дефицит кости в области донорского места [5, 6].

Кроме того, забор аутологичной кости связан с достаточно высоким уровнем осложнений — от 8,6 до 20,6 % [5]. Проблематично использование аутокости в случаях массивной потери фрагментов кости. Выбор донорских мест и количество кости, которое может быть забрано, ограничено [5, 6].

Попытка обойти это ограничение приводит к использованию аллоили ксенокости и к изучению альтернативных пересадок [17, 21, 35, 36, 38].

*Аллоимплантаты.* Костные аллоимплантаты все чаще используются из-за своей доступности [1–4, 6, 17, 19, 21–23, 25, 27, 35, 36, 38, 40]. Их применяют в виде малых фрагментов, целых подпорок, сегментарных, костно-хрящевых трансплантатов и композиционных материалов на их основе, которые могут быть получены от живых или умерших доноров. От живых доноров могут быть забраны головки бедра во время артропластики тазобедренного сустава, которые в последующем могут использоваться как аутоимплантаты у пациента при ревизионном вмешательстве или для приготовления аллоимплантатов для ревизиооного эндопротезирования [34, 42, 45]. От умерших доноров обычно забирают большие сегменты кости или целые костно-хрящевых комплексы для последующего изготовления различных типов аллоимплантатов.

Большинство исследователей, занимающихся костной аллопластикой, придерживаются мнения, что регенерация костной ткани и замещение имплантата осуществляются за счет костного ложа реципиента и метаплазии соединительной ткани, окружающей пересаженную

аллогенную кость и плотно прилегающей к ней по ходу врастающих в ложе сосудов. Синхронная перестройка костных аллоимплантатов осуществляется при одинаковом участии как костного ложа реципиента, так и окружающих тканей и врастающих сосудов [21, 25, 35, 36, 38, 40]. Следует отметить, что репаративный остеогенез — многокомпонентный процесс, основными составляющими которого являются дифференцирование клеток, их пролиферация, резорбция погибшей кости и новообразуемой кости при ее ремоделировании, формирование органического внеклеточного матрикса, его минерализация. Все эти процессы реализуются одновременно, но на разных этапах репаративного остеогенеза один из них может быть преобладающим [21].

После пересадки консервированные аллогенные аллоимплантаты подвергаются перестройке по тем же законам, что и при аутопластике, однако скорость этих процессов ниже [21, 35, 36, 38, 40].

В зависимости от способа предварительной химической обработки костной ткани аллоимплантаты бывают трех видов [18]:

- нативный, с сохраненной костной структурой и соотношением органического и минерального компонентов;
- деминерализованный, лишенный минерального компонента органический матрикс кости;
- депротеинизированный, лишенный органического компонента минеральный компонент или кристаллическая решетка гидроксиапатита, биологического происхождения.

Кроме химической обработки, фрагменты аллокости отличаются по размерам и форме, которые придаются материалу в ходе моделирования. В зависимости от способа предварительной химической обработки костной ткани и способов стерилизации и консервации изменяются физико-химические, остеокондуктивные и остеоиндуктивные свойства костных аллоимплантатов [18].

Так, фрагменты нативной кости сохраняют не только состав и соотношение минерального и органического компонентов, но и свои прочностные характеристики, характерные для аналогичных сегментов скелета.

Фрагменты депротеинизированной аллокости обладают меньшей иммуногенностью по сравнению с нативными костными фрагментами, поскольку в процессе обработки лишаются органического компонента кости. Кроме того, процесс депротеинизации повышает вирусную и бактериальную безопасность аллокости, на которую постоянно ссылаются производители синтетических костьзамещающих материалов. По сути, полученный подобным образом костный материал представляет собой карбонатгидроксиапатит аллогенного происхождения с сохраненной архитектоникой и микроэлементным составом [18].

Таблица 2.2. Имплантаты на основе органического алломатрикса

| Название | Производитель, страна | Состав | Назначение, свойства | Сроки перестройки |
|---|---|---|---|---|
| ADLK | Американская ассоциация банков тканей, США | Деминерализованная лиофилизированная кортикальная аллокость с размером частиц 300–700 нм | Остеоиндуктивный эффект; для заполнения костных дефектов | 6–12 мес |
| Allograft | CeraMed, США | Деминерализованная аллокость в виде частиц различного размера | Остеоиндуктивный эффект; для заполнения костных дефектов | 6–12 мес |
| AlloGro | AlloSource, США | Деминерализованная аллокость в виде костной крошки с доказанной остеоиндуктивной активностью | Остеоиндуктивный эффект; для заполнения костных дефектов | Костная мозоль образуется на 10–14-й день |
| DynaGraft | GenSci Regeneration Sciences, США | Деминерализованный костный матрикс | Остеоиндуктивный эффект; для заполнения костных дефектов | 6–12 мес |
| Ламбон® | Pacific Coast Tissue Bank, США | Деминерализованная лиофилизированная аллокость, изготовленная в виде тонкой пластины | Разграничительная функция в течение 4–5 мес; остеоиндуктивный эффект | Рассасывается через 6–8 мес |
| Перфрост | Костный банк ЦИТО им. Н.Н. Приорова, Россия | Деминерализованная лиофилизированная кортикальная аллокость | Остеоиндуктивный эффект; для заполнения костных дефектов | 0,5–3,0 мес в зависимости от величины дефекта |

Деминерализованные костные аллоимплантаты за счет освобождения от минерального компонента не обладают прочностными свойствами [24, 30, 31]. Целая группа факторов роста, содержащихся в деминерализованной костной ткани, стимулирует как пролиферацию и дифференцировку родоначальников остеодифферона, так и ангиогенез [17, 30, 31, 35, 36, 38, 40]. Уникальные свойства деминерализованной кости позволяют создавать на ее основе костно-пластические материалы с остеоиндуктивными свойствами (табл. 2.2).

Брефотрансплантаты (костная ткань плода и мертворожденных детей) используются при замещении костного дефекта и стимуляции репаративной остеорегенерации [22, 29]. Однако использование брефотканей по этическим соображениям запрещено во многих странах мира, предполагается введение подобного запрета и в Российской Федерации [28].

Материалы с различными свойствами и характеристиками можно использовать только в тех условиях, в которых эти характеристики являются самыми востребованными (табл. 2.3).

Таблица 2.3. Свойства аллоимплантатов

| Аллоимплантаты | Механические свойства | Остеокондуктивность | Остеоиндуктивность |
|---|---|---|---|
| Губчатый | +/− | ++ | + |
| Кортикальный | +++ | ++ | +/− |
| Деминерализованный | − | + | +++ |

Наиболее частой причиной использования костно-пластических материалов являются опухоли и опухолеподобные заболевания [1–4, 8, 19, 23, 26, 30, 31].

Однако и при лечении, казалось бы, одной нозологии виды и способы использования костных материалов различны. И связано это не только с величиной очага поражения, но и с расположением в сегментах скелета и с учетом биомеханической нагрузки, которую испытывает тот или иной сегмент опорно-двигательного аппарата.

Пересадка тканей может стать одним из инструментов регенеративной хирургии как биологический метод стимуляции репаративной регенерации [25]. Однако пересадка тканей традиционно рассматривается хирургами прежде всего как способ замещения дефектов, образующихся вследствие иссечения патологически измененных тканей. Поэтому различные аспекты трансплантации тканей разрабатываются в основном специалистами в области пластической и реконструктивной хирургии.

*Ксеноимплантаты.* Проблемы этического и юридического характеров в некоторых странах при получении и обработке аллоимплантатов от человека, а также широкая доступность тканей животных стимулировали использование ксенокости как альтернативы ауто- и аллокости, поскольку потребность в костно-пластическом материале стремительно увеличивается. Первым исследованиям препятствовала высокая иммуногенность тканей животных [30, 31]. Однако новые шаги в обработке ксенокости, например частичная депротеинизация, выделение составляющих со сниженной антигенностью и механическими свойствами подобными человеческой кости, расширили возможности ее использования. Иммунногенность ксенокости может быть снижена разнообразными процедурами приготовления, включая замораживание, лиофилизацию, гамма-излучение и обработку химическими средствами [30, 31]. Полученные трансплантаты, хотя низкоиммуногенны, имеют минимальный остеогенный потенциал или совсем его не имеют. Они действуют в основном как микропористый остов или каркас, на основе которого хорошо формируется новая кость (остеокондукция) путем аппозиционного роста.

Ксеногенные имплантаты представляют собой ткани, взятые от различных животных. Для клинической практики интерес представляют два их источника — бычья кость и природный коралл [7, 12, 16, 37, 39, 41]. Преимущественно на их основе изготавливают различные ксеноимплантаты для клинического использования как в травматологии и ортопедии, так и в стоматологии и костной онкологии (табл. 2.4).

Ксеноимплантаты являются остеокондуктивными и не передают заболеваний реципиентам. Трансплантаты из бычьей кости получают из натуральной кости путем удаления из нее органических веществ. Основным преимуществом этого материала, по сравнению с подобными синтетическими тканями, является структура, схожая с человеческой костью. Неорганическая бычья кость — это скелетный гидроксиапатит, содержащий микро- и макропоры кортикальной и губчатой костей, остающийся после химического или термического удаления органических веществ. Наличие естественной пористой структуры очень важно для прорастания новой костной ткани [30, 31, 33, 35, 36, 38, 40].

**Синтетические костно-пластические материалы.**

Использование для пластики дефектов кости искусственных материалов, идентичных минеральному компоненту костного вещества, привлекает пристальное внимание исследователей. Особое место среди биоактивных керамик занимают трикальцийфосфат и гидроксиапатит, обладающие не только высоким сродством с костной тканью, но и способностью к биодеградации [1, 8, 11, 13–15, 20, 30, 31, 33, 35, 38, 46].

Таблица 2.4. Ксеноимплантаты

| Название | Производитель, страна | Состав | Назначение, свойства | Сроки перестройки |
|---|---|---|---|---|
| Algipore | Friadent, Германия | Природные кораллы, пористый | Позволяет полностью восстановить утраченный объем костной ткани | 1–2 г. |
| APATOS | Alpha-bio, Израиль | Кортикальная и губчатая свиная кость, коллаген отсутствует; форма выпуска: гранулы гидроксиапатита, рентгеноконтрастные; размер гранул — стандарт 600–1000 мкм | Для заполнения костных дефектов; остеокондуктивные свойства | Время рассасывания: *Apatos Spongiosa* (губчатая кость) — около 3 мес; *Apatos Cortical* (кортикальная кость) — 6 мес; *Apatos Mix* (смесь кортикальной и губчатой кости) — 4 мес |
| Био-Гайд® | Geistlich Biomaterials, Швейцапия | Свиной коллаген I и III типов, резорбируемая двухслойная мембрана для направленной костной регенерации | Сохраняет мембранные функции на протяжении 4–5 мес, для направленной регенерации кости в зонах истончения в сочетании с наполнителем | 6 мес |
| Биокрил | Коралловый кальция карбонат, Франция | Натуральный коралл рода *Porites*; состоит из арогонита (больше 98% карбоната кальция); размер пор от 100 до 200 мкм | Рассасывается, не требует трансформации поверхности в карбонатную фазу | Более быстрое формирование кости |

*Продолжение табл. 2.4*

| Название | Производитель, страна | Состав | Назначение, свойства | Сроки перестройки |
|---|---|---|---|---|
| Биоматрикс | КОНЕКТБИОФАРМ, Россия | Костный ксеноколлаген и костные ксеносульфатированные гликозаминогликаны | Для восстановления обладает выраженным действием на процессы регенерации костной ткани без явлений воспаления и фиброза в зоне имплантации костных дефектов | Время ремоделирования материала и формирования новой кости: нижняя челюсть — 3–5 мес, верхняя челюсть — 6–8 мес |
| Биоматрикс-имплант | КОНЕКТБИОФАРМ, Россия | Естественный ксеногидроксиапатит | Для восстановления костных дефектов | 1–2 г. |
| Био-Менд® | Sulzer Calcitek, США | Коллагеновые мембраны, ксеноколлаген I типа | Сохраняет свою мембранную функцию на протяжении 4–5 недель | Полностью резорбируется в течение 6 недель |
| Био-Осс | Geistlich Pharma AG, Швейцария | Губчатые и кортикальные гранулы, губчатые блоки, неорганический костный матрикс, полученный дериватацией из бычьей кости путем удаления всех органических компонентов | Поддерживающая структура для новой кости и/или соединительной ткани, характеризуется полной биологической совместимостью | 1–3 г. |
| Endobon® | Zimmer Biomet, США | Блоки бычьей губчатой кости | Восстанавливает объем костной ткани | 1–2 г. |

*Окончание табл. 2.4*

| Название | Производитель, страна | Состав | Назначение, свойства | Сроки перестройки |
|---|---|---|---|---|
| Остео-пласт-М | НПК ВИТАФОРМ, входящая в группу компаний «КСЕНТЕК», Россия | Деминерализованный костный ксеноколлаген и костные сульфатированные гликозаминогликаны | Для заполнения костных дефектов; остеокондуктивные свойства | Время резорбции материала 2–4 мес |
| Pro Osteon | Interpore Cross, Франция | Гранулы и блоки коралового гидроксиапатита | Восстанавливает объем костной ткани | 1–2 г. |
| Хонсурид | Самсон-Мед, Россия | Полисахарид животного происхождения в виде стерильного лиофилизированного порошка из гиалиновых хрящей трахеи крупного рогатого скота, стерильного рогатого скота | Мгновенная растворимость, стимулятор регенерации | Мгновенная растворимость, для наружного местного использования (для заживления ран) |

Таблица 2.5. Гидроксиапатиты и трикальцийфосфаты

| Название | Производитель, страна | Состав | Назначение, свойства | Сроки перестройки |
|---|---|---|---|---|
| Cerasorb | Curasan, Германия | Синтезированные гранулы трикальцийфосфата | Для заполнения или восстановления многостеночных (артифициальных или дегенеративных) костных дефектов, преимущественно в имплантологии и челюстно-лицевой хирургии, для улучшения регенеративных процессов | 1–2 г.; ставить рекомендуется только спустя 4–6 мес, при синуслифте — спустя 9–12 мес |
| Биальгин | ЗАО «БИОМЕД», Россия | Гранулы на основе аморфного, нанодисперсного (5–10 нм), полностью резорбируемого гидроксиапатита кальция, включенного в полисахаридную матрицу альгината натрия | Для заполнения и восстановления костных дефектов в качестве остеопластического материала, оптимизирующего регенерацию костной ткани | 10 сут |
| Гидроксиапол | Полистом, Россия | Высокотемпературная нерезорбируемая керамика, порошки, грануляты и блоковые керамики | Химически стабилен, практически нерастворим в воде | Полностью не резорбируется, инкапсуляция материала соединительной тканью |

*Продолжение табл. 2.5*

| Название | Производитель, страна | Состав | Назначение, свойства | Сроки перестройки |
|---|---|---|---|---|
| Дурапатит | Interpor, США | Непористый гидроксиапатит | Нерассасывающийся | Инкапсуляция материала соединительной тканью |
| Интерпор | Interpor, США | Непористый гидроксиапатит | Нерассасывающийся | Инкапсуляция материала соединительной тканью |
| Остим | Остим-100, Россия | Гидроксиапатит ультравысокой дисперсности, неотожженный (резорбируемый) мелкодисперсный гидроксиапатит, порошки | Низкая кристалличность, высокая сорбционная способность, относительно высокая резорбируемость в биологической среде | 1–2 г. |
| Остеограф/LD | DENTSPLY Friadent, Германия | Пористый гидроксиапатит | Нерассасывающийся | Инкапсуляция материала соединительной тканью |
| Остеограф/D | DENTSPLY Friadent, Германия | Непористый гидроксиапатит | Нерассасывающийся | Инкапсуляция материала соединительной тканью |
| Osteoset | Wright Medical Technology, США | Гранулы кальция сульфата | Функция мембраны при изолированном использовании | 0,5–2 г. |
| SRC | Norian, США | Кальцийфосфат, впрыскиваемый цемент | Нерассасывающийся | Инкапсуляция материала соединительной тканью |

*Окончание табл. 2.5*

| Название | Производитель, страна | Состав | Назначение, свойства | Сроки перестройки |
|---|---|---|---|---|
| Vitoss | Orthovita, США | Ультрапористый бета-трикальцийфосфат | Нерассасывающийся | 1–2 г. |
| Коллапан | Интермедапатит, Россия | Ультрадисперсный порошок гидроксиапатита, матрица из коллагена II типа, антибиотик | Для заполнения костных дефектов | 1–2 г. |
| Гидроксиапатит | ООО «Промтехрезерв», Украина | 100% синтетический гидроксиапатит; выпускается в виде порошка с размером частиц 50–150 мкм (упаковка по 1, 2 и 5 г), гранул с размером частиц 150–300 мкм (1, 2 и 5 г), 300–500 мкм (1, 2, 5, 10, 20 г), 500–1500 мкм (1, 2, 5, 10, 20 г), 1000–2000 мкм (1, 2, 5, 10, 20 г) | | |

Препараты синтетического гидроксиапатита для медицинского применения известны с конца 1960-х гг., а исследования в области технологии и синтеза не прекращаются до настоящего времени.

*На основе гидроксиапатита.* Гидроксиапатит — полный химический и кристаллохимический аналог минерального вещества кости млекопитающих, что обусловливает его уникальные биологические свойства: абсолютную иммунную совместимость и биоактивность — способность стимулировать остеогенез, сращиваться с костью, служить строительным материалом для синтеза кости и входить в состав костной ткани, замещающей имплантат из гидроксиапатита [8, 11, 14, 15, 33].

Гидроксиапатит — биологически совместимое минеральное вещество, усредненный состав его обычно изображается как $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$.

Свойства гидроксиапатита как заменителя кости позволяют создавать на его основе кость-замещающие материалы (табл. 2.5).

Материалы на основе гидроксиапатита широко используются в клинической практике для замещения костных дефектов [1–4, 6, 10, 13, 15, 20, 27, 35, 38, 44].

*Биостекла и стеклокерамика.* К современным материалам последнего поколения следует отнести биоактивные стеклокристаллические материалы, состоящие из стекловидной матрицы и микрокристаллов размером около 4 мкм, разработка которых велась биоматериаловедами.

Результатом российской научно-технической программы «Биоситалл» явились разработка и промышленный выпуск отечественных биоситаллов. Например, микрогранулированный пористый стоматологический рентгеноконтрастный материал «Биосит-СР» на основе биоситалла М-31, который разработан в Санкт-Петербургском государственном технологическом университете, отличается тем, что в качестве кристаллической фазы, которая составляет до 3% объема, содержит аналог биоминерала кости даллит (карбоксигидроксиапатитата). Он создан в системе оксидов кремния, фосфора, алюминия, кальция, магния, цинка. Препарат «Биосит-СР» применяют для заполнения костных полостей во время операций от 2/3 до полного костного дефекта, для заполнения костных карманов при пародонтите, для устранения костных дефектов после удаления дентальных имплантатов, а также при периимплантитах и альвеолитах [9].

Биостекла и стеклокерамика (биоситаллы) при имплантации в костный дефект не капсулируются, а находятся в прямом контакте с костной тканью. Основным условием для связывания стеклокерамики

Таблица 2.6. Биоактивные стеклокристаллические материалы

| Название | Производитель, страна | Состав | Назначение, свойства | Сроки перестройки |
|---|---|---|---|---|
| Biogran® | Biomet, США | Биостекло; CaO, $Na_2O$, $SiO_2$, $P_2O_5$, мелкозернистый материал 300–355 мкм, равномерная форма и одинаковый размер частичек | Выраженные гемостатические и остеокондуктивные свойства | Резорбируемый (срок — 6 мес); биодеградация клеточная — остеокласты; возможна задержка резорбции определенных частиц на 1–2 г. |
| Биосит Ср-Элкор | ЭЛКОР, Россия | Микрогранулированный пористый стоматологический рентгеноконтрастный материал на основе биоситалла М-31, состоящий из стекловидной матрицы и микрокристаллов размером около 4 мкм, кристаллическая фаза составляет до 3 % объема, содержит аналог биоминерала кости карбоксигидроксиапатитата | Остеопротектор и остеокондуктор; для заполнения костных полостей во время операций от 2/3 до полного костного дефекта, для заполнения костных карманов при пародонтите, для устранения костных дефектов после удаления дентальных имплантатов, а также при периимплантитах и альвеолитах | Сроки резорбции и остеозамещения в зависимости от объема дефекта составляют 8–12 мес, что соответствует нормальным срокам протекания всех фаз остеогенетического процесса |
| Nova Bone | USBiomaterials, США | Биоактивное стекло | Выраженные гемостатические и остеокондуктивные свойства | 1–3 г. |
| Perio Glas | Block Drug Company, США | CaO, $Na_2O$, $SiO_2$, $P_2O_5$, размеры частиц от 90 до 710 мкм | Выраженные гемостатические и остеокондуктивные свойства, является барьером для роста эпителия | Частично резорбируемый, биодеградация жидкостная (растворение, выщелачивание) |

Таблица 2.7. Композиционные костно-пластические материалы

| Название | Производитель, страна | Состав | Назначение, свойства | Сроки перестройки |
|---|---|---|---|---|
| Allomatrix | Wright Medical Technology, США | Деминерализованный костный матрикс в среде Osteoset | Остеоиндуктивный эффект, барьерная функция | 1–2 г. |
| Алломатрикс-имплант | КОНЕКТБИОФАРМ, Россия | Галоколлаген и костные аллосульфатированные гликозаминогликаны | Для восстановления костных дефектов, хорошо удерживает объем и способен заполнить весь костный дефект; низкая растворимость, высокая эластичность и естественная пористость | 6–12 мес |
| БАК-100 | Полистом, Россия | Гидроксиапатит, силикатное стекло | Для заполнения костных дефектов | 6–12 мес |
| Биоимплант | КОНЕКТБИОФАРМ, Россия | Гранулированный остеоиндуктивный и остеокондуктивный материал на основе склерального ксеноколлагена, костного ксеногидроксиапатита и костных ксеноаллосульфатированных гликозаминогликанов | Для восстановления костных дефектов | 8–12 мес |

*Продолжение табл. 2.7*

| Название | Производитель, страна | Состав | Назначение, свойства | Сроки перестройки |
|---|---|---|---|---|
| Био-Осс Коллаген | Geistlich Biomaterials, Швейцария | Комбинация 100 мг губчатых гранул и 10 % коллагеновых волокон | Для заполнения костных дефектов | 8–12 мес |
| Гапкол | Полистом, Россия | Комбинация с кальцийфосфатной керамикой | Для заполнения костных дефектов | 4–12 мес |
| Gen-Os | Alpha-bio, Израиль | Смесь кортикальной (25 %) и губчатой (75 %) кости свиней; наличие коллагена | Высокие остеокондуктивные свойства, идеальные заявленные свойства биосовместимости | Время рассасывания 4–5 мес |
| Gel 40 — Gel 0 | Alpha-bio, Израиль | Смесь кортикальной (25 %) и губчатой (75 %) свиной кости; наличие коллагена; форма выпуска: Gel 40 — смесь размельченной свиной кости (60 %) и коллагена (40 %), Gel 0 — коллаген типа 1 и типа 3 | Размер гранул 120–200 микрон (Gel 40); обладает высокими остеокондуктивными свойствами, идеальные заявленные свойства биосовместимости | Время рассасывания Gel 40 — 3/4 мес, Gel 0 — 15 дней |
| DBX | Synthes, США | Деминерализованный костный матрикс, выпускается в виде замазки, пасты | Остеоиндуктивный и остеокондуктивные эффекты | Замещение костью через 6 мес |

*Продолжение табл. 2.7*

| Название | Производитель, страна | Состав | Назначение, свойства | Сроки перестройки |
|---|---|---|---|---|
| Депротекс | Новосибирский НИИТО, Россия | Депротеинизированная костная мука, коллагеновая добавка, антибиотик | Высокие остеокондуктивные и антибактериальные свойства, для заполнения костных дефектов | Замещение органотипической костью через 3–6 мес, в зависимости от величины дефекта |
| Dual-Block | Alpha-bio, Израиль | Кортикальная и губчатая свиная костная ткань, наличие коллагена; форма выпуска — плотный высушенный костный блок; размер гранул — стандарт 600–1000 мк | Для заполнения костных дефектов определенной формы, остеокондуктивные свойства | Время рассасывания — около 8 мес, зависит от размера установленного блока и клинического случая |
| CapSet® | LifeCore, США | Деминерализованная аллокость в композиции с сульфатом кальция имеют порошкообразную консистенцию (размер частиц 40 мкм), при смешивании с жидкостью удерживают форму в результате затвердевания | Остеоиндуктивный эффект, барьерная функция | Биодеградация неклеточная — гидролиз; период рассасывания 4–6 нед, используются с другими материалами |

*Продолжение табл. 2.7*

| Название | Производитель, страна | Состав | Назначение, свойства | Сроки перестройки |
|---|---|---|---|---|
| Кергап | Кергап, Украина | Гидроксиапатит | Для заполнения костных дефектов, на опорных сегментах скелета | 1–2 г. |
| Collagraft | Zimmer, США | Бычий коллаген, гидроксиапатит 60 % и трикальцийфосфат 40 %; в виде гранул и полосок | Восстанавливает объем костной ткани | 1–2 г. |
| Grafton DMB | Osteotech, США | Деминерализованный костный матрикс, выпускается в виде геля, гибкого шнура, замазки | Остеоиндуктивный эффект | Замещение костью через 6 мес |
| КоллапАн | Интермедапатит, Россия | Чистый гидроксиапатит с коллагеном и антибиотиком | Для заполнения костных дефектов | 4–16 мес |
| Коллаост | Полистом, Россия | Комбинация с тканевыми трансплантатами | Для заполнения костных дефектов | 4–12 мес |
| Костма | Новосибирский НИИТО, Россия | Нативная аллогенная костная мука, коллагеновая добавка, антибиотик | Высокие остеокондуктивные и антибактериальные свойства, для заполнения костных дефектов | Замещение органотипической костью через 3–6 мес, в зависимости от величины дефекта |

*Продолжение табл. 2.7*

| Название | Производитель, страна | Состав | Назначение, свойства | Сроки перестройки |
|---|---|---|---|---|
| MP3 | Alpha-bio, Израиль | Смесь кортикальной и губчатой свиной коллагенизированной кости, наличие коллагена около 10 % в виде Gel-0; форма выпуска: гранулы, смешанные с коллагеном; размер гранул 600–1000 мк | Для заполнения костных дефектов, остеокондуктивные свойства | Время рассасывания около 5 мес |
| OrthoBlast | GenSci Regeneration Sciences, США | Деминерализованный костный матрикс и аллотрансплантат губчатой кости | Остеоиндуктивный эффект, для восстановления костных дефектов, хорошо удерживает объем и способен заполнить весь костный дефект | 6–12 мес |
| Osteofil® | Medtronic Sofamor Danek, США | Деминерализованный костный матрикс (24 %) с желатиновым наполнителем (17 %) и водой | Остеоиндуктивный эффект | 6–12 мес |

*Продолжение табл. 2.7*

| Название | Производитель, страна | Состав | Назначение, свойства | Сроки перестройки |
|---|---|---|---|---|
| Opteform® | Exactech, США | Плотная стружка кортикально-губчатой кости в смеси с деминерализованным костным матриксом (24 %) с желатиновым наполнителем (17 %) и водой | Остеоиндуктивные и остеокондуктивные свойства, хорошо удерживает объем и способен заполнить весь костный дефект | 6–12 мес |
| Остеоматрикс | КОНЕКТБИОФАРМ, Россия | Костный аллоколлаген, костные аллосульфатированные гликозаминогликаны, ксеногидроксиапатиты | Для восстановления костных дефектов, костные дефекты на сроке через 3 мес после операции заполняются молодой костной тканью | 1–2 г. |
| ПепГен П-15 | CeraMed, США | Последовательность 15 аминокислот, составляющих пептид; синтетический пептид П-15 имитирует участок молекулы коллагена, привлекающий остеогенные клетки; размер частиц 250–420 мк | Способствует миграции предшественников остеобластов | 1–2 г. |

*Окончание табл. 2.7*

| Название | Производитель, страна | Состав | Назначение, свойства | Сроки перестройки |
|---|---|---|---|---|
| Putty | Alpha-bio, Израиль | Смесь кортикальной (25 %) и губчатой (75 %) свиной кости, наличие коллагена; форма выпуска: костная масса пластичной консистенции, наполненная коллагеном в виде геля, содержит не менее 80 % костного материала, размер гранул 120–200 мкм | Для заполнения костных дефектов, остеокондуктивные свойства | Время рассасывания около 3 мес |
| Биоактивный керамический композит «Синтекость» | ООО «Промтехрезерв», Украина | Гидроксиапатит, трикальцийфосфат, октакальцийфосфат, биоактивные стекла. В состав биокомпозита вводятся компоненты, которые придают материалу биостимулирующие и бактерицидные свойства | Для заполнения костных полостей после удаления кист, костных опухолей, локальном остеопорозе; замещение элементов удаленной либо поврежденной кости при операциях, травмах; замещение элементов позвонков при травмах, остеопорозе | Регулируемая скорость и механизм резорбции 1–2 г. |

с костной тканью является образование апатитового слоя на их поверхности в биологической среде. Апатитовый слой формируется в результате химической реакции стекол и стеклокерамики с окружающей биологической жидкостью, в которой выделяются ионы кальция и образуется гидратированный слой $SiO_2$.

Использование синтетических материалов может привести к осложнениям, при которых возникает необходимость удаления не только материала, но и части кости, а также окружающих тканей. Это связано с технологией получения материала (высокие температуры, спекание, высокое давление). Все эти факторы, увеличивая прочностные характеристики материала, нарушают одно из основных условий — способность к биодеградации в организме человека с последующим замещением органотипической костной тканью [9, 43, 47].

Для использования в качестве заменителя кости выпускают несколько видов биостекол (табл. 2.6).

**Композиционные костно-пластические материалы.**

Композиционные костно-пластические материалы или композиты — это смесь (композиция) нескольких синтетических и/или биологических материалов для придания им синергичных свойств.

Применяются разновидности композиционных материалов в виде гранул, лент, блоков, состоящих, например, из смеси гидроксиапатита (от 30 до 50 %) и связующих биополимеров, в основном коллагена [6, 7, 15, 20, 33].

Примеры различных композиционных материалов, используемых в клинической практике, приведены в табл. 2.7.

В качестве основных компонентов применяются различные субстраты и/или их комбинации.

Основное достоинство таких материалов в удобстве работы с ними — возможности подгонки размеров непосредственно в операционной, пластичности при заполнении дефектов кости и т. д. При этом коллаген частично используется организмом как строительный материал органического компонента кости. Недостатки композиционных препаратов связаны с тем, что количество органического компонента, выбираемое исходя из условий получения удобных физико-химических свойств, обычно намного больше, чем нужно для синтеза кости, а качество коллагена не соответствует оптимальному с точки зрения иммунных реакций организма.

## Заключение

Широкий ассортимент материалов для костной пластики свидетельствует о том, что необходима разработка материалов, позволяющих формироваться регенерату органотипического строения на их основе.

Костно-пластический материал должен при имплантации в костное ложе компактного строения приводить к формированию кости остеонного строения, а при имплантации в губчатую кость — трабекулярного. Таким образом, материал должен обладать следующим набором характеристик:

- идентичность химического состава и архитектоники свойствам кости (зоне предполагаемой имплантации);
- резорбируемость, продленная во времени от 3 до 12 мес;
- замещение органотипической костной тканью;
- моделируемость;
- остеокондуктивность;
- остеоиндуктивность;
- адресная доставка и пролонгированное действие лекарственных средств в зоне дефекта (антибактериальный или анальгетический эффект).

Анализ существующих композиционных костно-пластических материалов на основе наполнителей биологического и синтетического происхождения позволил выявить закономерности свойств материалов в зависимости от их состава. Материалы моносостава могут представлять собой фрагменты различной формы (монолитные или пористые) или крошку (от крупной до мелкодисперсной).

Композиционные материалы в дополнение к вышеперечисленным формам могут быть представлены гелевой формой в виде пасты или замазки, могут затвердевать и сохранять форму.

Ни один из вышеперечисленных материалов не обладает остеогенными свойствами, поскольку не содержат клеточных элементов.

Биологические материалы, изготовленные из алло- или ксенокости, обладают следующим набором характеристик:

- остеокондуктивность;
- резорбируемость остеокластами в сроки от 4 до 12 мес;
- замещаемость органотипической костной тканью (для аллогенных материалов) и формирование грубоволокнистой рубцовой соединительной ткани (для ксеногенных материалов) [3];
- остеоиндуктивность для материалов на основе органического матрикса аллокости — деминерализованного костного трансплантата.

Для синтетических материалов основной характеристикой является остеокондуктивность. Монолитным образцам свойственны стабильность химического состава и геометрической формы, кроме того, они способствуют образованию вокруг себя соединительнотканной капсулы — инкапсулируются. Пористые образцы имеют неконтролируемые сроки рассасывания (путем гидролиза от 5–6 недель до 3 лет), при-

чем рассасывание материала часто не сопровождается формированием кости.

К сожалению, даже сегодня все попытки приготовить искусственный костный материал, пригодный для клинического использования и обладающий хорошей физиологической приживаемостью, биосовместимостью и стабильностью на протяжении длительного времени, имеют лишь относительный успех. Это наглядно демонстрирует превосходство и сложность созданных природой структур [4, 8, 14].

## Список литературы


1. Актуальные вопросы имплантологии в травматологии и ортопедии: Материалы Международной научно-практической конференции. Гродно, 2000.
2. Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии: Материалы III Всероссийского симпозиума с международным участием. М., 2007.
3. Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии: Материалы V Всероссийского симпозиума с международным участием. Уфа, 2012.
4. Актуальные вопросы травматологии и ортопедии третьего тысячелетия: Материалы Межрегиональной научной конференции. Омск, 2000.
5. *Ардашев И.П.*, *Григорук А.А.*, *Плотников Г.А. и др.* Возможные осложнения после взятия аутотрансплантата из крыла подвздошной кости // Современные технологии в травматологии и ортопедии. М., 1999. С. 191–192.
6. *Ардашев И.П.*, *Подорожная В.Т.*, *Кирилова И.А. и др.* Передний спондилодез в эксперименте // Хирургия позвоночника. 2008. № 1. С. 66–73.
7. *Артюшкевич А.С.* Средства и хирургические способы, стимулирующие репаративные процессы в тканях периодонта // http://bone-surgery.ru/view/sredstva_i_hirurgicheskie_sposoby_stimuli-ruyuschie_reparativnye_processy_v_.
8. *Баринов С.М.*, *Комлев В.С.* Биокерамика на основе фосфатов кальция. М., 2005.
9. *Беззубик С.Д.*, *Гречуха А.М.* Экспериментальное обоснование применения биоактивного стеклокристаллического материала Биоситалл-11 для замещения костных дефектов челюстных костей // Стоматология. 2009. № 3. С. 26–28.
10. *Белозеров М.Н.* Оценка остеопластических свойств различных биокомпозиционных материалов для заполнения дефектов челюстей: Дисс. … канд. мед. наук. М., 2004.

11. *Берченко Г.Н.*, *Кесян Г.А.*, *Уразгильдеев Р.З. и др.* Сравнительное экспериментально-морфологическое исследование влияния некоторых используемых в травматолого-ортопедической практике кальцийфосфатных материалов на активизацию репаративного остеогенез // Бюл. Восточно-Сибирского науч. центра СО РАМН. 2006. № 4. С. 327–332.

12. Биоматрикс // http://bioimplantat.ru/biomatrix.html

13. *Григорьянц Л.А.*, *Зуев Д.В.*, *Бадалян В.А. и др.* Хирургическое лечение околокорневых кист челюстей с использованием гидроксиапатита ультравысокой дисперсности без резекции верхушек корней // Клиническая стоматология. 1997. № 3. С. 54–58.

14. *Дорожкин С.В.* Биокерамика на основе ортофосфатов кальция (обзор) // http://bone-surgery.ru/view/biokeramika_na_osnove_ortofosfatov_kalciya_obzor

15. *Дубок В.А.*, *Проценко В.В.*, *Шинкарук А.В. и др.* Новое поколение биоактивных керамик — особенности свойств и клинические результаты // Ортопедия, травматолия и протезирование. 2008. № 3. С. 91–95.

16. Инструкция по использованию «Алло-Гро» // http://www.dental-azbuka.ru/articles/3-3/18-allogro_instr

17. *Кирилова И.А.* Костная ткань как основа остеопластических материалов для восстановления кости // Хирургия позвоночника. 2011. № 1. С. 68–74.

18. *Кирилова И.А.*, *Подорожная В.Т.*, *Легостаева Е.В. и др.* Костно-пластические биоматериалы и их физико-механические свойства // Хирургия позвоночника. 2010. № 1. С. 81–87.

19. Клинические и фундаментальные аспекты клеточных и тканевых биотехнологий: Материалы II Всероссийского симпозиума с международным участием «Клинические и фундаментальные аспекты тканевой терапии» и конференции «Теория и практика клеточных биотехнологий». Самара, 2004.

20. *Корж Н.А.*, *Кладченко Л.А.*, *Малышкина С.В. и др.* Имплантационные материалы и остеогенез. Роль биологической фиксации и остеоинтеграции в реконструкции кости // Ортопедия, травматолия и протезирование. 2005. № 4. С. 118–127.

21. *Корж Н.А.*, *Радченко В.А.*, *Кладченко Л.А. и др.* Имплантационные материалы и остеогенез. Роль индукции и кондукции в остеогенезе // Ортопедия, травматолия и протезирование. 2003. № 2. С. 150–157.

22. *Королев С.Б.*, *Абраменков А.Н.* Новая медицинская технология подготовки костных трансплантатов для костной пластики // Материалы II Московского международного конгресса травматологов и ортопедов. М., 2011.

23. *Корочкин С.Б.*, *Симонович А.Е.*, *Кирилова И.А. и др.* Использование имплантата-фиксатора в эксперименте // Хирургия позвоночника. 2007. № 2. С. 71–76.

24. *Матвейчук И.В.*, *Денисов-Никольский Ю.И.* Влияние процесса деминерализации на механические характеристики образцов компактной кости взрослого человека // Современные проблемы биомеханики. Вып. 4. Рига, 1987. С. 175–183.

25. *Муслимов С.А.* Морфологические основы применения аллогенных биоматериалов в регенеративной хирургии: Дисс. … д-ра мед. наук. Уфа, 2000.

26. *Новаченко М.П.* Оперативное лечение так называемой местной фиброзной остеодистрофии у детей // Научная сессия, посвященная 100-летию со дня рождения Г.И. Турнера: Тез. докл. Л., 1959. С. 335–344.

27. Новое в решении актуальных проблем травматологии и ортопедии: Сборник научных трудов. М., 2000.

28. Проект федерального закона «О биомедицинских клеточных технологиях» // http://www.minzdravsoc.ru/docs/doc_projects/535/vnesenie_Proekta_FZ_O_biomeditcinskih_kletochnyh_tehnologiyah_26-02-2011.doc

29. *Решетников А.Н.* Оптимизация репаративной регенерации костной ткани при лечении ложных суставов с дефектами большеберцовой кости // Казанский медицинский журнал. 2005. № 1. С. 26–28.

30. *Савельев В.И.*, *Корнилов Н.В.*, *Иванкин Д.Е. и др.* Аллотрансплантация формалинизированной костной ткани в травматологии и ортопедии. СПб., 2001.

31. *Савельев В.И.*, *Родюкова Е.Н.* Трансплантация костной ткани. Новосибирск, 1992.

32. *Тер-Асатуров Г.П.*, *Лекишвили М.В.*, *Бигваева А.Т. и др.* Сравнительное экспериментально-морфологическое исследование эффективности биологических остеопластических материалов в замещении костных дефектов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2012. № 1. С. 81–85.

33. *Эппле М.* Биоматериалы и биоминерализация. Томск, 2007.

34. *Cornu O.*, *Manil O.*, *Godts B. et al.* Neck fracture femoral heads for impaction bone grafting // Acta Orthop. Scand. 2004. V. 75. No 3. P. 303–308.

35. *De Long W.G.*, *Einhorn T.A.*, *Koval K. et al.* Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery // J. Bone Joint Surg. Am. 2007. V. 89. P. 649–658.

36. *Delloye C.*, *Cornu O.*, *Druez V. et al.* Bone allografts: what they can offer and what they cannot // J. Bone Joint Surg. Br. 2007. V. 89. P. 574–580.

37. Endobon. http://fr.biomet.be/befr-medical/befr-biomaterials/befr-endobon

38. *Finkemeier C.G.* Current concepts review. Bone-grafting and bone-graft substitutes // J. Bone Joint Surg. Am. 2002. V. 84. P. 454–464.

39. Geistlich Biomaterials Matrix specialist for healthy and beautiful teeth. http://www.geistlich.com/?dom=1005&rub=1074

40. *Hubble M.J.* Bone grafts // Surg Technol Int. 2002. V. 10. P. 261–265.

41. Implants for Life. FRIOS, the autologous way of bone regeneration. http://www.dentsply-friadent.com/ru/3295.htm

42. *King C.B., Ball R.Y., Tucker J.K.* Autobanking of femoral heads for revision total hip replacement, a preliminary report of a new surgical technique // Surgeon. 2004. V. 2, No 1. P. 37–41.

43. *Schmitt J.M., Buck D.C., Joh S.P. et al.* Comparison of porous bone mineral and biologically active glass in critical-sized defects // J. Periodontol. 1997. V. 68. P. 1043–1053.

44. *Shors E.C.* The development of coralline porous ceramic bone graft substitutes // Laurencin C.T., ed. Bone Graft Substitutes. West Conshohocken, PA: ASTM International, 2003. P. 271–88.

45. *Subramanian S., Jain K.D., Sreekumar R. et al.* Early results of whole femoral head allograft with articular cartilage for acetabular impaction grafting in revision hip replacements // Ann. R. Coll. Surg. Engl. 2010. V. 92. P. 27–30.

46. *Vallet-Regi M., Gonzalez-Calbet J.M.* Calcium Phosphates as Substitution of Bone Tissues // Progr. Sol. State Chem. 2004. V. 32. P. 1–31.

47. *Yuan H., de Bruijn J.D., Zhang X. et al.* Bone induction by porous glass ceramic made from Bioglass (45S5) // J. Biomed. Mater. Res. 2001. V. 58. P. 270–276.

# 3. ОРГАНИЗАЦИЯ ПРИЖИЗНЕННОГО ДОНОРСТВА КОСТНОЙ ТКАНИ В УСЛОВИЯХ ФЕДЕРАЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ

*И.А. Кирилова, В.Т. Подорожная, В.М. Прохоренко, И.Ю. Бедорева, В.В. Павлов*

Успехи современного естествознания. 2015. № 9. С. 49–52

В настоящее время ежегодно в Новосибирском институте травматологии и ортопедии увеличивается количество пролеченных больных и количество операций по эндопротезированию тазобедренных суставов. Для снижения зависимости от импортных костно-пластических материалов разработана организационно-функциональная модель заготовки головок бедренных костей от пациентов отделения эндопротезирования. Модель содержит основные этапы процесса, начиная от поступления пациента на первичное эндопротезирование и заканчивая выдачей обработанного материала в клинику. Разработка модели сняла вопросы организационного, юридического, этического и технического характера. Внедрение данного процесса позволит сохранить ценный биопластический материал, необходимый не только для ревизионных вмешательств на крупных суставах, но и для лечения другой патологии, сопряженной с дефицитом костной ткани.

## 3. UNITED DONATION FEMORAL HEADS IN THE NOVOSIBIRSK RITO

*I.A. Kirilova, V.T. Podorozhnaya, V.V. Pavlov, I.Y. Bedoreva*

At present, each year at the Novosibirsk Institute of Traumatology and Orthopedics an increasing number of patients treated and the number of operations for hip replacement. To reduce dependence on imported bone plastic material developed a organizational and functional model of the harvesting e femoral heads from patients department arthroplasty. The model contains the main stages of the process, from receipt of the patient for primary arthroplasty and ending with delivery of the processed material in the clinic. Developing a model took off questions of organizational, legal, ethical and technical nature. A testing of this process will save valuable bioplastic material needed not only for revision surgery on large joints, but also for the treatment of other pathologies involving a deficiency of bone tissue.

Ревизионное эндопротезирование тазобедренного сустава остается одной из наиболее серьезных и трудных проблем травматологии и ортопедии [3–5]. Замена первичных конструкций на ревизионные, помимо применения искусственных аугментов, требует активного применения костной пластики (ауто- или аллотрансплантатов) для восполнения костных дефектов [1, 3–5]. Но к настоящему времени в доступной литературе нами не найдено источников, описывающих полный цикл (протокол) технологии прижизненной заготовки костной ткани при оказании специализированной и высокотехнологичной медицинской помощи на территории РФ.

Применение костной пластики для восстановления дефекта костной ткани приводит к восстановлению биомеханики конечности за счет нормализации центра вращения сустава, что, в свою очередь, позволяет повысить качество ревизионных операций [1]. Доказано, что материалом для костной пластики могут быть фрагменты губчатой аллокости от кадаверных доноров, но наличие известных этических проблем в последующем подтолкнуло исследователей и врачей предложить использование головок бедренных костей (ГБК), резецированных ранее при первичном эндопротезировании [7, 11].

В то же время известно, что структура резецированной у пациентов кости отличается по анатомо-функциональным свойствам от структуры трабекулярной костной ткани в норме [10]. Поэтому одной из самых важных тем, поднимаемых в современной литературе, посвященной описанию костной ткани, является поиск корреляций между механическими и структурными свойствами ткани [6].

Губчатое вещество кости представляет собой трехмерную сеть костных балок различной формы, размеров и ориентации. Термин «губчатая структура костной ткани» означает способ организации основных тканеобразующих элементов. Все исследования, проведенные для описания корреляций между механическими параметрами и плотностью костной ткани, показали, что при сходных значениях минеральной плотности анализируемых образцов их механические параметры могут иметь различные значения [11]. Следовательно, плотность сама по себе недостаточна для описания расхождений в полученных значениях механических параметров. Эти результаты подтверждают, что механические свойства костной ткани зависят не только от плотности ткани, но и от структурных параметров, которые определяют организацию костной ткани в тестируемом образце. Таким образом, свойства рассматриваемой структуры костной ткани в целом зависят от свойств отдельных трабекул кости, а также от способов и числа их взаимосвязей.

Описание структурных свойств основано на целом ряде параметров, определяющих распределение массы в образце костной ткани и ориентации структуры. Постоянно растущее число новых параметров, используемых для описания, указывает на отсутствие адекватных описаний структурных свойств. В то же время представляет определенный интерес изучение структурно-функциональных характеристик костной ткани у населения, проживающего на территориях с ограниченной инсоляцией или с другими географическими особенностями (например, на территории Сибирского федерального округа и др.), поэтому такие исследования могут носить популяционный характер.

Также в настоящее время на территории Российской Федерации не существует отработанного алгоритма действий, их последовательности и методик, используемых для обработки кости, заготовленной от пациентов при резекции ГБК в ходе первичного эндопротезирования. Существуют ссылки на работы зарубежных авторов, однако мы не встретили работ, в которых была бы описана организационная модель всего процесса: от момента поступления пациента в стационар и оформления всех юридических документов до операции и взаимодействия операционного блока с лабораторией консервации тканей, дополнительного обследования пациентов как доноров, и изготовления костных трансплпнтатов. Создание такой организационно-функциональной модели нуждается в свою очередь в автоматизации процесса, а также в разработке и утверждении соответствующих технологий и регламентов ее применения.

Очень большое внимание вопросам заготовки и консервации костной ткани уделяется в технологически высокоразвитых странах: США, Великобритании, Австрии, Швейцарии, Сингапуре и др. [7–9, 12].

Поэтому на медицинском рынке костно-пластических и костьзамещающих материалов основную массу составляют материалы зарубежного производства — более 80 %. В этих условиях организация отечественного производства костных трансплантатов от живых доноров может рассматриваться как организация импортозамещающего производства в секторе костных аллотрансплантатов.

На территории Российской Федерации вопросами заготовки и консервации тканей от доноров занимаются тканевые лаборатории («банки биотканей»), созданные преимущественно при профильных институтах травматологии и ортопедии (Москва, Санкт-Петербург, Новосибирск, Нижний Новгород, Саратов) или медицинских вузах (Астрахань, Самара, Ярославль).

Предпосылками для прижизненной заготовки костной ткани от доноров в условиях ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России явились: увеличение количества операций ревизионного

эндопротезирования тазобедренного сустава (ТБС) и высокая потребность в трансплантатах для восполнения костных дефектов. Кроме того, с 2004 г. в Новосибирском НИИТО внедрена система менеджмента качества медицинской помощи, в рамках которой был разработан стандарт предприятия по обеспечению лечебно-диагностического процесса трансплантатами. Данный документ лег в основу при формировании организационной модели процесса прижизненного донорства [2].

Для лигитимизации процедуры забора необходимо было разработать документальное сопровождение процесса прижизненного донорства. Для этого утверждены формы «Информационного согласия на проведение обследования на ВИЧ-инфекцию», «Информированное добровольное согласие на использование и консервацию биопсийного материала», «Карта донора» и «Журнал учета доноров отделения эндопротезирования». Все это позволило систематизировать поступление и регистрацию данных о пациентах-донорах и снять вопросы этического и юридического характера.

Нами разработана организационно-функциональная модель заготовки головок бедренных костей (ГБК) с выделением основных этапов процесса, начиная от поступления пациента на первичное эндопротезирование и заканчивая выдачей обработанного материала в клинику (рис. 3.1).

Составлены блок-схемы технологического процесса с определением критических точек, которыми являются данные серологического исследования, структура и физические свойства ГБК, определяемые в процессе моделирования или технологической обработки, стерилизации и результаты бактериологического исследования на стерильность (рис. 3.2).

Техническими предпосылками для прижизненной заготовки в условиях федерального учреждения явились: возможность забора крови пациента-донора на обследование в день операции, обеспечение возможности оперативной доставки на диагностическое исследование автотранспортом, проведение инструктажа задействованных сотрудников по порядку взаимодействия между подразделениями, наличие опыта работы по заготовке аллокости и методик обработки костной ткани.

Определены показания и противопоказания для забора ГБК.

**Показанием к забору ГБК являлись:**

- травматический перелом шейки бедра и костей таза,
- идиопатический остеоартроз,
- диспластический остеоартроз.

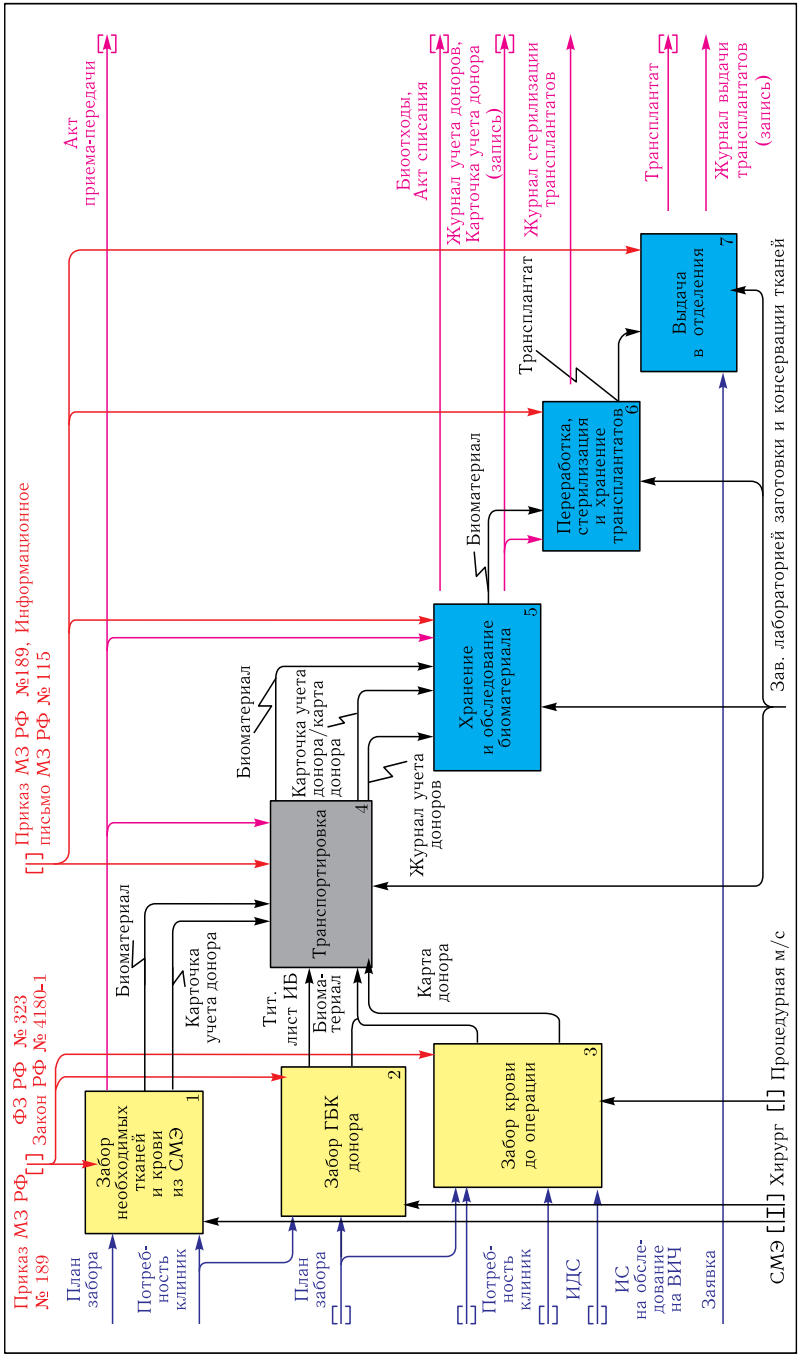


Рис. 3.1. Организационно-функциональная модель заготовки головок бедренных костей (ГБК)

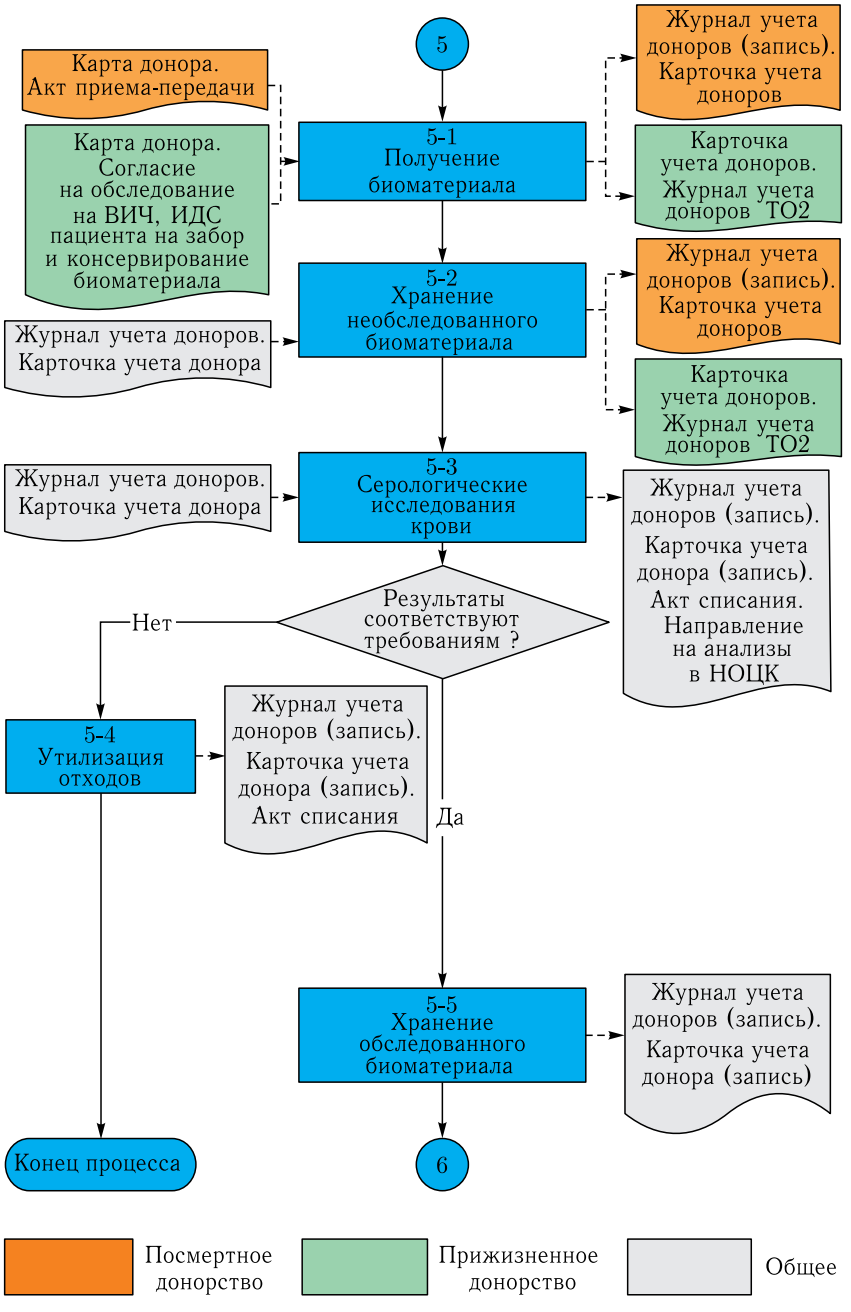


Рис. 3.2. Блок-схема этапа «Хранение и обследование биоматериала»

**Противопоказанием к забору ГБК являлись:**

- инфекционные заболевания (трансмиссивные заболевания, включая бактериальные и вирусные инфекции, гепатиты, венерические заболевания, ВИЧ);
- онкология;

УМ-36-99

**Информированное согласие на проведение обследования на ВИЧ-инфекцию**

Я, _____

(Фамилия, Имя, Отчество)

_____года рождения, настоящим подтверждаю, что на основании предоставленной мне информации, свободно и без принуждения, отдавая отчет о последствиях обследования, принял решение пройти тестирование на антитела к ВИЧ. Для этой цели я соглашаюсь сдать анализ крови объемом около 5 мл. В процессе забора крови, как правило, будет необходим один укол иглой. Эта процедура может быть связана с некоторым дискомфортом, включая возможное проявление кровоподтека на месте укола.

Я подтверждаю, что мне разъяснено, почему важно пройти тестирование на ВИЧ, как проводится тест и какие последствия может иметь тестирование на ВИЧ.

Я проинформирован, что:

- Тестирование на ВИЧ можно пройти в Центре СПИД и других медицинских учреждениях, тестирование по добровольному выбору освидетельствуемого лица может быть добровольным анонимным (когда не нужно сообщать свое имя и персональные данные, а результат только обследуемый может узнать по коду) или конфиденциальным (в этом случае тестирование проводится по документу, удостоверяющему личность, и результат будет известен обследуемому и лечащему врачу). В государственных медицинских учреждениях тестирование на ВИЧ проводится бесплатно.
- Присутствие антител к ВИЧ является доказательством наличия ВИЧ-инфекции. Но существует период “серонегативного окна” (промежуток времени между заражением ВИЧ и появлением антител к ВИЧ, наличие которых можно определить лабораторным способом). В течение этого периода человек уже заражен и может заразить других, но при исследовании крови антитела к ВИЧ не обнаруживаются, этот период обычно составляет 3 месяца.
- В настоящее время в России существует бесплатное лечение для всех нуждающихся инфицированных ВИЧ, для его получения нужно обратиться в территориальный центр СПИД. Лечение существенно продляет жизнь и улучшает качество жизни при ВИЧ-инфекции. ВИЧ-инфицированным беременным женщинам важно вовремя обратиться в центр СПИД и начать принимать специальные лекарства для предотвращения заражения будущего ребенка.
- ВИЧ-инфекция передается только тремя путями:
  - при сексуальных контактах без презерватива;
  - через кровь, при медицинских или немедицинских процедурах. Чаще всего заражение этим путем происходит при использовании нестерильного инструментария для употребления наркотиков;
  - от инфицированной ВИЧ матери к ребенку во время беременности, родов и при грудном вскармливании.

  Заражение ВИЧ в быту при рукопожатиях, пользовании общей посудой, бассейном, туалетом, а также при укусах насекомых не происходит.
- Защитить себя от заражения ВИЧ-инфекцией можно, если не иметь опасных контактов (контакты с кровью или выделениями половых органов, грудным молоком) с инфицированными ВИЧ людьми или людьми с неизвестным ВИЧ-статусом. В течение жизни, в зависимости от личных обстоятельств и убеждений, для того, чтобы избежать заражения СПИДом, человек может использовать разные способы предохранения. Например, всегда пользоваться презервативами или иметь только не инфицированных ВИЧ сексуальных партнеров. Избежать заражения через кровь при нарушении целостности кожных покровов можно, используя только стерильные инструменты.
- Результаты тестирования на ВИЧ по телефону не сообщаются. Их сообщает консультант при послетестовом консультировании.
- С вопросами можно обратиться в территориальный центр СПИД.

_____ _____

(подпись обследуемого на ВИЧ) (дата)

- ревматоидный артрит;
- терапия стероидами в анамнезе;
- остеопороз.

Однако, несмотря на решение этических, юридических и технических проблем по заготовке костной ткани, прижизненное донорство имеет и недостатки: забор материала производится от пациентов с ортопедической патологией и, следовательно, с измененными характеристиками костной ткани; до 10–15 % забранного материала утилизируется по физическим свойствам (нарушение структуры, хрупкость и т. д.);

ВМ-37-25

**Информированное добровольное согласие пациента**
**на использование и консервирование биопсийного материала**

«___»_____20___г. (___час._____мин.)

Я,

_____

_____

(Ф.И.О., год рождения) заполняется собственноручно пациентом или его законным представителем

в соответствии со ст. 20, 21, 22 и 23 ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21 ноября 2011 г. № 323-ФЗ выражаю свое согласие на использование и консервирование для научных и медицинских целей биопсийного материала, в том числе резецированной головки бедренной кости.

Я подтверждаю своей подписью, что прочитал(-а) вышеизложенную информацию, она мне понятна, все интересующие меня вопросы были заданы мной моему лечащему врачу, на них были получены ответы, и я даю добровольное информированное согласие на использование и консервирование для научных и медицинских целей биопсийного материала.

_____

(подпись пациента или его законного представителя)

Подпись и личная печать лечащего врача, проводящего беседу

до 10 % материала утилизируется по результатам серологического обследования пациентов как доноров тканей.

## Заключение

Разработку организационно-функциональной модели заготовки ГБК с составлением блок-схем процесса и обеспечением обязательной документацией считаем актуальной, поскольку это снимает вопросы организационного, этического и технического характеров. А отработка данного процесса позволит сохранить ценный биопластический материал, необходимый не только для ревизионных вмешательств на крупных суставах, но и для другой патологии, сопряженной с дефицитом костной ткани.

## Список литературы

1. *Дианов С.В.*, *Тарасов А.Н.* Аллопластика вертлужной впадины при первичном и ревизионном эндопротезировании тазобедренного сустава // Травматология и ортопедия России. 2009. № 3. С. 130–132.
2. *Кирилова И.А.*, *Подорожная В.Т.*, *Садовой М.А.*, *Бедорева И.Ю.* Система менеджмента качества в обеспечении лечебно-диагностического процесса трансплантатами // Технология живых систем. 2009. Т. 6, № 4. С. 21–29.
3. *Мурылев В.Ю.*, *Петров Н.В.*, *Силин Л.Л.*, *Рукин Я.А.*, *Елизаров П.М.*, *Калашник А.Д.* Ревизионное эндопротезирование вертлужного компонента эндопротеза тазобедренного сустава // Кафедра травматологии и ортопедии. 2012. № 1. С. 20–25.
4. *Прохоренко В.М.* Первичное и ревизионное эндопротезирование тазобедренного сустава. Новосибирск: АНО «Клиника НИИТО», 2007. 348 с.
5. *Рукин Я.А.* Ревизионное эндопротезирование вертлужного компонента тотального эндопротеза тазобедренного сустава при его асептической нестабильности. Автореферат дисс... канд. мед. наук. М., 2008.
6. *Cichanski A.*, *Nowicki K.*, *Mazurkiewicz A.*, *Topolinski T.* Investigation of statistical relationships between quantities describing bone architecture, its fractal dimensions and mechanical properties // Acta of Bioengineering and Biomechanics. 2010. V. 12, No 4. P. 66–77.
7. *Cornu O.*, *Manil O.*, *Godts B. et al.* Neck fracture femoral heads for impaction bone grafting // Acta Orthop. Scand. 2004. V. 75, No 3. P. 303–308.
8. *Hing C.B.*, *Ball R.Y.* Tucker JKAutobanking of femoral heads for revision total hip replacement, a preliminary report of a new surgical technique // Surgeon. 2004. V. 2, No 1. P. 37–41.

9. *Nather A.*, *David V.* Femoral head banking: NUH tissue bank experience // Orthopedics. 2007. V. 30, No 4. P. 308–312.

10. *Nikodem A.* Correlations between structural and mechanical properties of human trabecular femur bone // Acta of Bioengineering and Biomechanics. 2012. V. 14, No 2. P. 37–46.

11. *Tanaka T.*, *Sacurai T.*, *Kashima I.* Structuring of parameters for assessing vertebral bone strength by star volume analysis using a morphological filter // J. Bone and Mineral Metabolism. 2001. V. 19. P. 150–158.

12. *Tomford W.W.*, *Ploetz J.E.*, *Mankin H.J.* Bone allografts of femoral heads: procurement and storage // J. Bone Joint Surg. Am. 1986. V. 68, No 4. P. 534–537.

# 4. ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ СРЕДИННЫХ РАСПИЛОВ ГОЛОВКИ БЕДРЕННОЙ КОСТИ

*И.А. Кирилова, Ю.П. Шаркеев, В.Т. Подорожная, К.С. Попова, П.В. Уваркин, Н.Г. Фомичев*

Успехи современного естествознания. 2015. № 9. С. 126–129

Для определения архитектоники губчатого вещества головки бедренной кости был проведен анализ смежных распилов материала, полученного от одного пациента с коксартрозом при первичном эндопротезировании тазобедренного сустава. Пористость костной ткани оценивалась по макроскопическим изображениям, полученным посредством макрофотосъемки. Общая пористость рассчитывалась как отношение суммарной длины отрезков, попадающих на поры, к общей длине секущих линий.

Результат. Поры, расположенные в верхней части головки бедренной кости, имеют более правильную форму, а в нижней части больше вытянуты вдоль линии распила и занимают больший объем. Средний продольный (0,64 и 0,60 мм) и поперечный (0,40 и 0,44 мм) размеры пор имеют близкие значения для верхней и нижней частей. Нижняя часть головки бедренной кости имеет более высокую пористость (39 и 33 %), чем верхняя часть (34 и 30 %). Общая пористость всего образца при расчете по контурам, нанесенным вдоль нижней части: продольная — 37 %, поперечная — 32 %.

# 4. THE STUDY OF THE MORPHOLOGY OF FEMORAL HEAD MIDLINE SECTION SPECIMENS

*I.A. Kirilova, Yu.P. Sharkeev, V.T. Podorognaya, K.S. Popova, P.V. Uvarkin, N.G. Fomichev*

Adjacent sections of the femoral head obtained from one patient with coxarthrosis during primary hip replacement were analyzed to determine the architectonic of the femoral head spongy substance. The bone porosity was evaluated using macrophotography images. Total porosity was calculated as the ratio of total length of pore segments over the total length of secant lines.

Result. Pores in the upper portion of the femoral head have more regular shape, while those in the lower portion are more stretched along the line of cut and occupy larger volume. The average longitudinal (0.64 and 0.60 mm) and transverse (0.40 and 0.44 mm) sizes of pores are similar in the upper and the lower portions.

The lower portion of the femoral head has a higher porosity (39 and 33 %) than the upper one (34 and 30 %). The total porosity of the entire specimen was calculated using contours plotted along the lower portion: longitudinal — 37 %, and transverse — 32 %.

## Введение

Губчатое вещество кости представляет собой трехмерную сеть костных балок различной формы, размера и ориентации. Термин «губчатая структура костной ткани» означает способ организации основных тканеобразующих элементов.

Все исследования, проведенные для описания корреляций между механическими параметрами и плотностью костной ткани, показали, что при сходных значениях минеральной плотности анализируемых образцов их механические параметры могут иметь различные значения [1–9]. Следовательно, плотность сама по себе недостаточна для описания расхождений в полученных значениях механических параметров. Эти результаты подтверждают, что механические свойства костной ткани зависят не только от плотности ткани, но и от структурных параметров, которые определяют организацию костной ткани в тестируемом образце. Таким образом, свойства рассматриваемой структуры костной ткани в целом зависят от свойств отдельных трабекул кости, а также от способов и числа их взаимосвязей.

В настоящее время костная ткань, забранная у одного пациента, может использоваться у другого пациента, т. е. осуществляется костная аллопластика. Для исключения аллергических реакций и реакций несовместимости у реципиента костная ткань донора предварительно обрабатывается с использованием комплекса физико-химических методик [3]. Перспективными в качестве способа предварительной химической обработки аллогенной костной ткани оказались деминерализация и депротенизация, которые позволяют получить деминерализованную костную ткань, лишенную минерального компонента, и депротеинизированную костную ткань, не содержащую органического компонента [2]. В то же время предварительная химическая обработка может привести к изменению структуры и свойств нативной аллогенной костной ткани, а следовательно, и ее биологического поведения после имплантации в живой организм [2, 3].

Важным фактором в исследовании пригодности используемого костно-пластического материала является сохранение необходимого уровня морфологических особенностей нативной кости.

**Цель работы** — изучение морфологии головки бедренной кости, резецированной при первичном эндопротезировании тазобедренного сустава у пациента с коксартрозом.

## Материалы и методы

Материалом исследования служили образцы срединных смежных распилов головки бедренной кости (ГБК), полученной от одного донора (пациента) с коксартрозом при резекции в ходе первичного эндопротезирования тазобедренного сустава. В соответствии с утвержденным алгоритмом у доноров костного материала осуществлялся забор крови для обследования на инфекционные агенты (сифилис, ВИЧ, гепатиты В и С). При отрицательных результатах обследования материал поступал в обработку. Осуществлялся радиальный распил ГБК с шагом 0,4–0,5 см. Весь костный материал доноров подвергался промывке очищенной проточной водой, обезжириванию спирт-эфиром и химическому очищению 6 %-м раствором $H_2O_2$ в соответствии с утвержденными методиками.

Морфологию костного материала исследовали на металлографическом инвертированном микроскопе «Альтами МЕТ 1МТ» (Россия, Санкт-Петербург) методами светлого и темного полей, а также по методу поляризации. Пористость костной ткани оценивалась по макроскопическим изображениям, полученным посредством макрофотосъемки исследуемых объектов. Общая пористость ($П$) рассчитывалась как отношение суммарной длины отрезков, попадающих на поры, к общей длине секущих линий и выражается следующей формулой:

$$П = \frac{\sum l}{\sum L_1} 100\,\%, \qquad (1)$$

где $L_1$ — общая длина секущих в условных единицах измерительного прибора, $l$ — длина отрезков секущих, попадающих на поры.

## Результаты и обсуждение

Для определения архитектоники губчатого вещества головки бедренной кости был проведен анализ смежных распилов материала, полученного от одного донора (рис. 4.1).

Измерение пористой структуры проводили по четырем направлениям: вдоль и поперек верхней части головки бедра (рис. 4.2, *а*, *б*), вдоль и поперек нижней части головки бедра (рис. 4.2, *в*, *г*).

Пористость нижней части головки бедра немного выше, чем для верхней части. Так при расчете по контурам, нанесенным вдоль нижней части, пористость в продольном сечении составила 39 %, а в поперечном — 33 %. А продольная и поперечная пористость для относительно нанесенных контуров верхней части головки бедра составила 34 и 30 % соответственно.

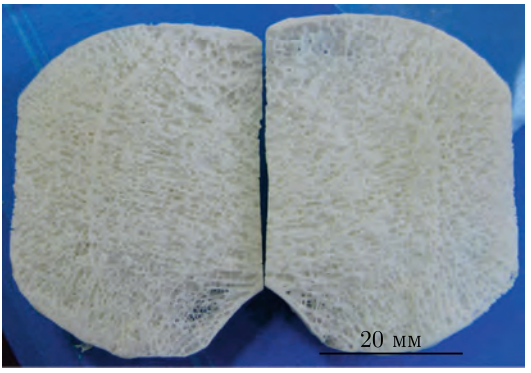


Рис. 4.1. Макрофотография образцов смежных срединных распилов из головки бедренной кости

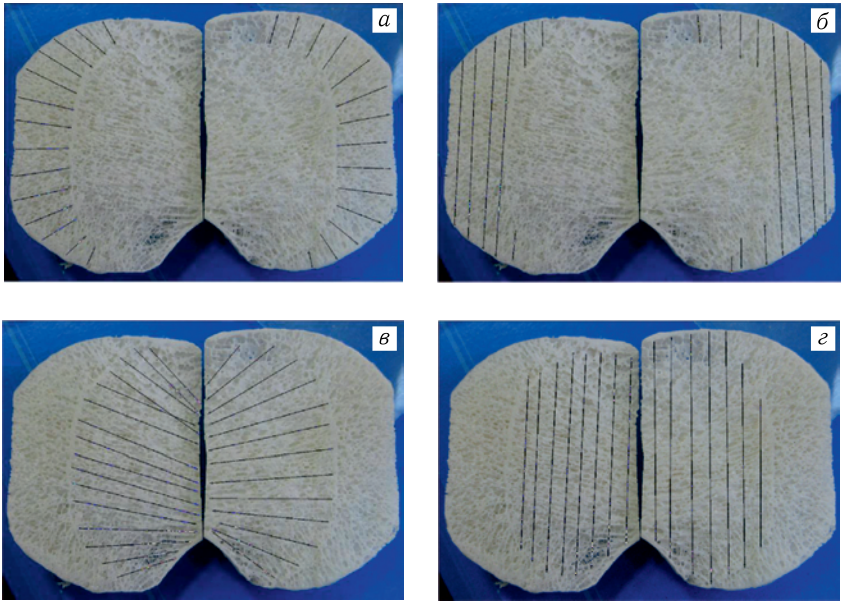


Рис. 4.2. Макрофотографии образцов смежных срединных распилов из головки бедренной кости с нанесенными контурами расчета на область верхней части головки бедра (*а*, *б*) и нижней части головки бедра (*в*, *г*)

В табл. 4.1 приведены результаты расчета размера пор для образцов костного материала, представленных на рис. 4.2. Поры в верхней части материала имеют более правильную форму, в то время как поры в нижней части больше вытянуты вдоль линии разреза и занимают больший

Таблица 4.1. Размеры пор и пористость образцов костного материала

| Сечение | Средний размер пор, мм | Минимальный размер пор, мм | Максимальный размер пор, мм | Пористость, % |
|---|---|---|---|---|
| Нижняя часть | | | | |
| Продольное | 0,64 | 0,16 | 2,48 | 39 |
| Поперечное | 0,40 | 0,10 | 1,36 | 33 |
| Верхняя часть | | | | |
| Продольное | 0,60 | 0,19 | 2,24 | 34 |
| Поперечное | 0,44 | 0,09 | 1,55 | 30 |
| Образец в целом | | | | |
| Продольное | 0,62 | 0,16 | 2,48 | 37 |
| Поперечное | 0,41 | 0,09 | 1,55 | 32 |

объем, о чем говорят и большие значения пористости нижней части костного материала (39 и 33 %).

Для более наглядного представления о распределении размеров пор при наложении контуров расчета вдоль и поперек распилов костного материала построены гистограммы распределения пор по размерам (рис. 4.3).

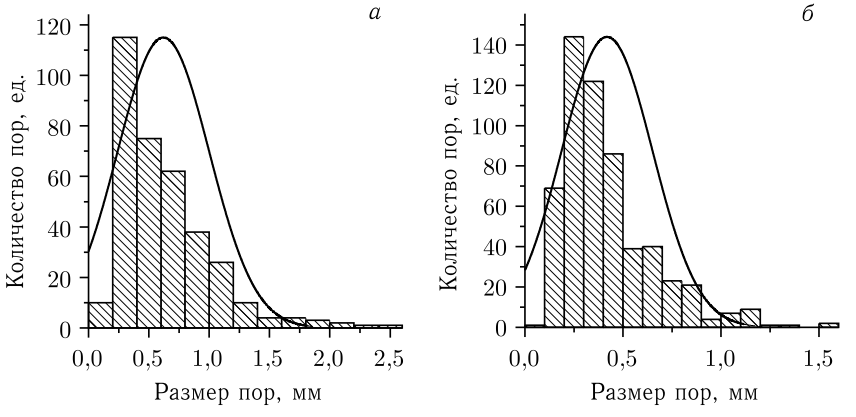


Рис. 4.3. Гистограммы распределения пор по размерам, полученных по контурам расчета, расположенным вдоль (*а*) и поперек (*б*) срединных распилов образцов из головки бедренной кости

Как видно из рис. 4.3, более 50 % пор в направлении, продольном линиям контуров расчета, имеют средний разброс значений 0,2–0,8 мм. Около 25 % пор имеют размер в диапазоне 0,8–1,8 мм, а 10 % пор — более 1,8 мм. Средний разброс размера пор в поперечном направлении контуров расчета — 0,1–0,5 мм (более 70 %), 25 % — 0,5–1,2 и менее 5 % 1,2–1,55 мм.

## Выводы

При исследовании морфологии образцов, полученных из головок бедренных костей, были получены следующие основные результаты.

1. Анализ распределения пор в срединных распилах головок бедренной кости показал, что поры, расположенные в верхней части имеют более правильную форму, в то время как в нижней части поры больше вытянуты вдоль линии разреза и занимают больший объем; средний продольный (0,64 и 0,60 мм) и поперечный (0,40 и 0,44 мм) размеры пор имеют близкие значения для верхней и нижней частей.
2. Нижняя часть головки бедренной кости имеет более высокую пористость (39 и 33 %), чем верхняя часть (34 и 30 %). Общая пористость образца в целом при расчете по контурам, нанесенным вдоль нижней части продольного сечения, равна 37 % и 32 % для поперечного сечения.

## Список литературы

1. *Дианов С.В.*, *Тарасов А.Н.* Аллопластика вертлужной впадины при первичном и ревизионном эндопротезировании тазобедренного сустава // Травматология и ортопедия России. 2009. № 3. С. 130–132.
2. *Мурылев В.Ю.*, *Петров Н.В.*, *Силин Л.Л.*, *Рукин Я.А.*, *Елизаров П.М.*, *Калашник А.Д.* Ревизионное эндопротезирование вертлужного компонента эндопротеза тазобедренного сустава // Кафедра травматологии и ортопедии. 2012. № 1. С. 20–25.
3. *Подорожная В.Т.*, *Кирилова И.А.*, *Шаркеев Ю.П.*, *Легостаева Е.В.* Аллогенные костные материалы: структура, свойства, применение // Известия высших учебных заведений. Физика. 2013. № 12/3. С. 14–21.
4. *Прохоренко В.М.* Первичное и ревизионное эндопротезирование тазобедренного сустава. Новосибирск: АНО «Клиника НИИТО», 2007. 348 с.
5. *Рукин Я.А.* Ревизионное эндопротезирование вертлужного компонента тотального эндопротеза тазобедренного сустава при его асептической нестабильности. Автореферат дисс. ... канд. мед. наук. М., 2008.

6. *Cichanski A.*, *Nowicki K.*, *Mazurkiewicz A.*, *Topolinski T.* Investigation of statistical relationships between quantities describing bone architecture, its fractal dimensions and mechanical properties // Acta of Bioengineering and Biomechanics. 2010. V. 12, No 4. P. 66–77.

7. *Cornu O.*, *Manil O.*, *Godts B. et al.* Neck fracture femoral heads for impaction bone grafting // Acta Orthop. Scand. 2004. V. 75, No 3. P. 303–308.

8. *Nikodem A.* Correlations between structural and mechanical properties of human trabecular femur bone // Acta of Bioengineering and Biomechanics. 2012. V. 14, No 2. P. 37–46.

9. *Tanaka T.*, *Sacurai T.*, *Kashima I.* Structuring of parameters for assessing vertebral bone strength by star volume analysis using a morphological filter // J. Bone and Mineral Metabolism. 2001. V. 19. P. 150–158.

# 5. ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК СРЕДИННЫХ РАСПИЛОВ ГОЛОВОК БЕДРЕННЫХ КОСТЕЙ

*В.Т. Подорожная, И.А. Кирилова, Ю.П. Шаркеев, К.С. Попова, П.В. Уваркин, Н.Г. Фомичев*

Успехи современного естествознания. 2015. № 8. С. 58–61

Образцы срединных распилов из головок бедренных костей, резецированных у 6 пациентов с коксартрозом при первичном эндопротезировании тазобедренного сустава одинаковых типоразмеров 1,0 × 3,0 см, испытывали на микротвердость и нанотвердость, изучали модуль Юнга и элементный состав костного материала. Исследования образцов на трехточечный изгиб показали, что предел прочности изменялся от 0,2 до 1,6 МПа, а модуль упругости — от 1,7 до 8,2 МПа. Микротвердость образцов изменялась в интервале 220–265 МПа, среднее значение микротвердости образцов срединных распилов из головок бедренной кости — 240 МПа. Элементный состав образцов срединных распилов из головок бедренной кости представлен основными элементами Ca, P, O, Na, Mg, а также Sn, S, Fe, Cr, C в микроколичествах, и атомное соотношение Ca к P в костной ткани составило 1,55.

# 5. THE STUDY OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF FEMORAL HEAD MIDLINE SECTION SPECIMENS

*V.T. Podorognaya, I.A. Kirilova, Yu.P. Sharkeev, K.S. Popova, P.V. Uvarkin, N.G. Fomichev*

Specimens of midline sections of femoral heads resected in 6 patients with coxarthrosis during primary hip replacement and having the same size of 1.0 × × 3.0 cm were tested for micro-hardness and nano-hardness, Young's modulus, and the elemental composition of bone material. Three-point bend testing of specimens showed that the tensile strength ranged from 0.2 to 1.6 MPa, and the modulus of elasticity — from 1.7 to 8.2 MPa. Micro-hardness of specimens varied between 220 and 265 MPa, the average value of micro-hardness was 240 MPa. Elemental composition of specimens of femoral head midline sections was represented by the following basic elements: Ca, P, O, Na, and Mg, as well as by trace amounts of Sn, S, Fe, Cr, and C, and Ca/P concentration ratio of bone tissue was 1.55.

## Введение

В настоящее время все более широкие масштабы приобретает использование костной пластики для восполнения дефицита и восстановления целостности костной ткани при ревизионных эндопротезированиях тазобедренных суставов [1–5]. Применение костной пластики приводит к восстановлению биомеханики конечности за счет нормализации центра вращения сустава, что в свою очередь позволяет повысить качество ревизионных операций [1].

Доказано, что материалом для костной пластики могут быть фрагменты губчатой аллокости от кадаверных доноров, но наличие этических проблем подтолкнуло исследователей и врачей предложить использование головок бедренных костей (ГБК), резецированных ранее при первичном эндопротезировании [7, 9].

В то же время известно, что структура резецированной у пациентов кости отличается по анатомо-функциональным свойствам от структуры трабекулярной костной ткани в норме [8]. Поэтому одной из самых важных тем, поднимаемых в современной литературе, посвященной описанию костной ткани, является поиск корреляций между механическими и структурными свойствами ткани [6].

**Цель работы:** изучение анатомо-функциональных свойств головок бедренных костей, резецированных при первичном эндопротезировании тазобедренного сустава у пациентов с коксартрозом.

## Материалы и методы

Материалом исследования служили образцы срединных распилов из головок бедренных костей в количестве шести штук, резецированных в ходе первичного эндопротезирования тазобедренного сустава у пациентов с коксартрозом. Возраст пациентов — доноров костной ткани составил от 46 до 67 лет, средний возраст — 56.

В соответствии с утвержденным алгоритмом у доноров костного материала осуществлялся забор крови для обследования на инфекционные агенты (сифилис, ВИЧ, гепатиты В и С). При отрицательных результатах обследования материал поступал в обработку. Осуществлялся радиальный распил ГБК с шагом 0,4-0,5 см, из срединного фрагмента выпиливался образец размерами $1{,}0 \times 3{,}0$ см. Весь костный материал доноров подвергался промывке очищенной проточной водой, обезжириванию спирт-эфиром и химическому очищению 6 %-м раствором перекиси водорода (в соответствии с методиками).

Микротвердость измерялась по ГОСТ 9450-76 на микротвердомере марки Duramin 5. При измерениях применялась нагрузка 245 мН.

Также производилось измерение нанотвердости на приборе «Nano Hardness Tester» NHT-S-AX-000X в соответствии с международным стандартом ISO 14577-4:2007 при нагрузке на индентор 10 мН. Измерения микротвердости и нанотвердости производились по методу восстановленного отпечатка путем вдавливания алмазной четырехгранной пирамидой Виккерса с углом 136° между противоположными гранями. Значения микротвердости и нанотвердости определяется делением нагрузки $P$ на площадь поверхности отпечатка $F$ (1):

$$HV = \frac{P}{F} = 1{,}8544\frac{P}{d^2}, \qquad (2)$$

где $d$ — диагональ отпечатка.

При измерении нанотвердости на приборе «Nano Hardness Tester» NHT-S-AX-000X проводилась также регистрация модуля Юнга.

Исследования на трехточечный изгиб были выполнены на универсальной настольной электромеханической испытательной машине Instron 3369 (США, «Instron») по ГОСТ 14019-80 при скорости нагружения 0,1 мм/мин и максимальной нагрузке 2 кН. Образцы для испытаний на трехточечный изгиб имели следующие размеры $10 \times$ $\times 30 \times 4$ мм$^3$.

Для определения элементного состава костного материала использовали последовательный волнодисперсионный рентгенофлуоресцентный спектрометр Lab Center XRF-1800 (Япония).

Следует отметить, что имела место некоторая неоднородность исследуемого материала, поскольку анализировался материал от 6 разных пациентов. И по этой причине физико-механические характеристики имели большой разброс. Для более точного определения физико-механических параметров костной ткани необходимо провести исследование на большем количестве образцов.

## Результаты и обсуждение

Морфология всех образцов костной ткани представлена пористой структурой, причем поры расположены по всему объему материала. На рис. 5.1 представлены оптические изображения фрагмента костной ткани, полученного при различной глубине фокуса, позволяющие оценить внутренние поры образца. На некоторых изображениях можно наблюдать посторонние включения красного и черного цветов.

Исследования костных материалов на трехточечный изгиб показали большой диапазон значений как предела прочности, так и модуля упругости. Величина модуля упругости изменяется от 1,69 до 8,15 МПа, а предела прочности — от 0,187 до 1,65 МПа. На рис. 5.2 приведены

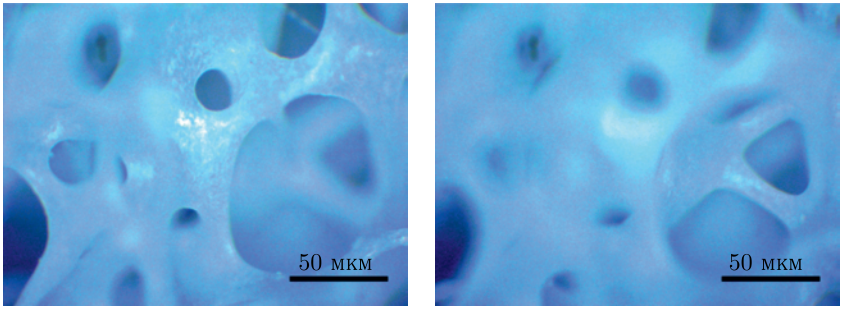


Рис. 5.1. Оптические изображения образца костной ткани, полученные при различной глубине резкости

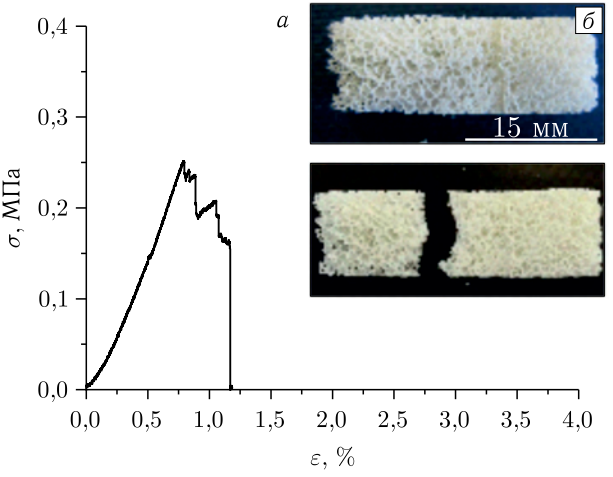


Рис. 5.2. Кривая нагружения образца 69082 из костной ткани при трехточечном изгибе (*а*) и изображения образца (*б*) до испытания и после испытания

типичная кривая деформации образца при трехточечном изгибе и вид образца после испытания.

Основные физико-механические характеристики исследуемых образцов приведены в табл. 5.1.

При исследовании элементного состава костной ткани было выявлено наличие следующих элементов: Ca, P, O, Na, Mg, а также Sn, S, Fe, Cr, C в микроколичествах. Данные по содержанию элементов в атомных процентах приведены в табл. 5.2. Из данных элементного анализа определено соотношение Ca/P в костной ткани, оно составило 1,55.

Таблица 5.1. Физико-механические характеристики костных материалов

| № образца | Возраст донора, лет | Микротвердость ($H_{25}$), МПа | Предел прочности ($\sigma_B$), МПа | Деформация ($\varepsilon$), % | Модуль Юнга при изгибе ($E$), МПа |
|---|---|---|---|---|---|
| 69097 | 59 | 220 | 0,4 | 0,2 | 2,1 |
| 65531 | 59 | 265 | 0,2 | 0,4 | 1,7 |
| 65466 | 51 | 235 | 1,1 | 1,6 | 5,6 |
| 69082 | 53 | 254 | 0,2 | 0,8 | 3,3 |
| 65848 | 46 | 241 | 1,4 | 0,2 | 8,2 |
| 65631 | 67 | 246 | 1,6 | 0,1 | 7,5 |

Таблица 5.2. Содержание основных элементов в костной ткани

| Элемент | Ca | P | O | Na | Mg | Sn | S | Fe | Cr | C |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Содержание, ат. % | 34,85± 0,15 | 22,45± 0,12 | 39,69± 0,17 | 1,36± 0,08 | 0,85± 0,04 | 0,36± 0,02 | 0,28± 0,02 | 0,09± 0,02 | 0,06± 0,01 | 0,04± 0,01 |

## Выводы

При исследовании физико-механических свойств и элементного состава образцов, полученных из головок бедренных костей, были получены следующие основные результаты.

1. Исследования образцов срединных распилов из головок бедренной кости на трехточечный изгиб показали, что предел прочности и модуль упругости изменяются в широких пределах. Модуль упругости изменялся от 1,7 до 8,2 МПа, а предел прочности — от 0,2 до 1,6 МПа.
2. Микротвердость образцов изменялась в интервале 220–265 МПа, среднее значение микротвердости образцов срединных распилов из головок бедренной кости равно 244 МПа.
3. Элементный состав образцов срединных распилов из головок бедренной кости костного материала представлен следующими основными элементами Ca, P, O, Na, Mg, а также Sn, S, Fe, Cr, C в микроколичествах, соотношение Ca к P в костной ткани — 1,55.

## Список литературы

1. *Дианов С.В., Тарасов А.Н.* Аллопластика вертлужной впадины при первичном и ревизионном эндопротезировании тазобедренного сустава // Травматология и ортопедия России. 2009. № 3. С. 130–132.

2. *Мурылев В.Ю.*, *Петров Н.В.*, *Силин Л.Л.*, *Рукин Я.А.*, *Елизаров П.М.*, *Калашник А.Д.* Ревизионное эндопротезирование вертлужного компонента эндопротеза тазобедренного сустава // Кафедра травматологии и ортопедии. 2012. № 1. С. 20–25.
3. *Подорожная В.Т.*, *Кирилова И.А.*, *Шаркеев Ю.П.*, *Легостаева Е.В.* Аллогенные костные материалы: структура, свойства, применение // Известия высших учебных заведений. Физика. 2013. № 12/3. С. 14–21.
4. *Прохоренко В.М.* Первичное и ревизионное эндопротезирование тазобедренного сустава. Новосибирск: АНО «Клиника НИИТО», 2007. 348 с.
5. *Рукин Я.А.* Ревизионное эндопротезирование вертлужного компонента тотального эндопротеза тазобедренного сустава при его асептической нестабильности. Автореферат дисс. ... канд. мед. наук. М., 2008.
6. *Cichanski A.*, *Nowicki K.*, *Mazurkiewicz A.*, *Topolinski T.* Investigation of statistical relationships between quantities describing bone architecture, its fractal dimensions and mechanical properties // Acta of Bioengineering and Biomechanics. 2010. V. 12, No 4. P. 66–77.
7. *Cornu O.*, *Manil O.*, *Godts B. et al.* Neck fracture femoral heads for impaction bone grafting // Acta Orthop. Scand. 2004. V. 75, No 3. P. 303–308.
8. *Nikodem A.* Correlations between structural and mechanical properties of human trabecular femur bone // Acta of Bioengineering and Biomechanics. 2012. V. 14, No 2. P. 37–46.
9. *Tanaka T.*, *Sacurai T.*, *Kashima I.* Structuring of parameters for assessing vertebral bone strength by star volume analysis using a morphological filter // J. Bone and Mineral Metabolism. 2001. V. 19. P. 150–158.

# 6. СВОЙСТВА ДЕМИНЕРАЛИЗОВАННОГО КОСТНОГО МАТРИКСА ДЛЯ БИОИНЖЕНЕРИИ ТКАНЕЙ

*И.А. Кирилова, В.Т. Подорожная, Ю.П. Шаркеев, С.В. Николаев, А.В Пененко, П.В. Уваркин, А.С. Ратушняк, В.В. Чебодаева, Е.А. Анастасиева, С.К. Голушко, А.В. Корель*

Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2017. Т. 6, № 3. С. 25–36

Приведена схема технологии биоинженерии тканей, которая явилась аргументацией для выбора важных для биоинженерии тканей физико-механических свойств деминерализованного костного матрикса губчатой и компактной кости человека. Перечислены методы исследования микроморфологических, пьезоэлектрических и транспортных свойств, адаптированные для измерения у материалов потенциальных скаффолдов, и приведены результаты измерений. Приведены результаты исследования физико-механических свойств деминерализованного костного матрикса губчатой и компактной кости человека. Показано, что деминерализованная губчатая кость обладает наилучшими характеристиками поровой системы для заселения матриксов клетками. Предел прочности и модуль упругости образцов из деминерализованных головок бедренных костей, извлеченных в ходе первичного эндопротезирования тазобедренного сустава, изменяются в широких пределах. Модуль упругости изменялся от 50 до 250 МПа, а предел прочности — от 1,1 до 5,5 МПа.

## 6. PROPERTIES OF THE DEMINERALIZED BONE MATRIX FOR BIOENGINERY OF TISSUE

*I.A. Kirilova, V.T. Podorognaya, Yu.P. Sharkeev, S.V. Nikolaev, A.V. Penenko, P.V. Uvarkin, A.S. Ratushnyak, V.V. Chebodaeva, E.A. Anastasieva, S.K. Golushko, A.V. Korel*

The scheme of bioengineering technology of tissues is presented, which was the argument for choosing tissues important for bioengineering of physico-mechanical properties of the demineralized bone matrix of spongy and compact

human bone. The methods for studying micromorphological, piezoelectric and transport properties, adapted for measuring the materials of potential scaffolds, are listed and the results of measurements are given. The results of studying the physico-mechanical properties of the demineralized bone matrix of spongy and compact human bones are presented. It is shown that the demineralized spongy bone possesses the best characteristics of the pore system for the colonization of matrix cells. The tensile strength and modulus of elasticity of samples from the demineralized heads of the femurs extracted during the initial hip arthroplasty vary widely. The modulus of elasticity varied from 50 to 250 MPa, and the ultimate strength was from 1.1 to 5.5 MPa.

## Введение

Проблема восстановления анатомической целостности и функции костной ткани до сих пор остается актуальной задачей [1–3]. Характер регенераторных процессов в значительной мере определяется свойствами материалов, используемых для заполнения дефектов кости. Современный уровень медицины трудно представить без биологических имплантатов, с помощью которых выполняются реконструктивные хирургические вмешательства в травматологии и ортопедии [4–8, 16, 17], челюстно-лицевой хирургии [9–10], костной онкологии [7]. Поиск новых материалов и способов воздействия на остеогенез с целью формирования органотипического регенерата с помощью костно-пластических материалов (КПМ) является актуальным для современной медицины. В настоящее время в различных областях хирургии начинают использовать КПМ, приготовленные из костной ткани донора, которая, в свою очередь, может быть различной по строению: губчатой, кортикальной, губчато-кортикальной. Перспективными в качестве способа предварительной химической обработки аллогенной костной ткани оказались деминерализация и депротеинизация, которые позволяют получить деминерализованную костную ткань, лишенную минерального компонента, и депротеинизированную костную ткань, лишенную органического компонента [11, 12]. В то же время предварительная химическая обработка может привести к изменению структуры и свойств нативной аллогенной костной ткани, а следовательно, и ее биологического поведения при имплантации в живой организм.

Чтобы обеспечить запросы практической хирургии, необходимы биоинженерные конструкции, пригодные для замещения значительных по площади костных дефектов. Такие конструкции должны обладать следующими свойствами: сохранением физических и анатомических особенностей донорской кости, высокой прочностью, быстрой фиксацией в зоне имплантации и регенераторным потенциалом. Этим

требованиям может удовлетворять только жесткая/упругая матрица, содержащая костные клетки реципиента, способные делиться, дифференцироваться и синтезировать межклеточный матрикс, поддерживающий жизнеспособность клеток [13–17].

Одной из современных тенденций биоинженерии тканей является заселение матриц полипотентными клетками с последующим управляемым инкубированием протоимплантата [18].

В процессе инкубирования полипотентные клетки должны дифференцироваться и формировать тканевый имплантат, годный для имплантации. Для этого можно использовать управляемое воздействие на клетки физико-химическими сигналами, которые, как показано к настоящему времени, включают широкий спектр воздействий от специфических транскрипционных факторов до механических свойств матриц. Чтобы реализовывать такую технологию биоинженерии имплантатов, необходимо всякий раз на входе технологического процесса измерять физико-механические свойства используемой заготовки для матрицы.

В работе приводится аргументация для выбора характеристик заготовки, подлежащих измерению, и использованные для этих измерений методы.

Настоящее исследование необходимо для дальнейшего изучения влияния физико-химических свойств деминерализованного костного матрикса на клетки остеогенного и хондрогенного рядов с целью управления процессами их пролиферации, дифференцировки и таксиса при заселении матриксов в задачах регенеративной медицины.

## Выбор характеристик материала для матрицы

Выбранные характеристики мотивированы нашим пониманием процесса заселения матриц клетками при биоинженерии имплантатов (рис. 6.1).

Именно, заселение и есть результат миграции, пролиферации и дифференцировки клеток. Миграция зависит от подвижности клеток, свойств матрицы, ее механики, геометрии, химического состава поверхностей и т. д. Пролиферация и дифференцировка зависят от концентрации питательных и регуляторных компонентов среды, а распределение уровня концентраций компонентов среды определяется диффузией молекул и потреблением их клетками.

Мы предполагаем, что такой процесс заселения матрицы можно реализовать, научившись управлять функционированием клеток, используя знания о регуляции экспрессии генов (рис. 6.2).

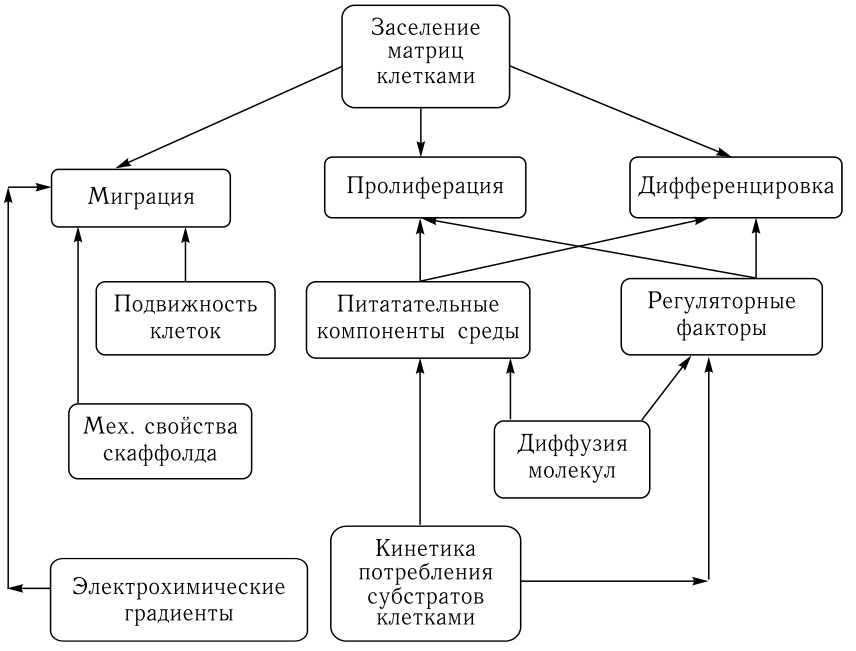


Рис. 6.1. Схема процесса заселения матрицы клетками при биоинженерии имплантатов

На настоящий момент нас интересовали следующие контуры регуляции экспрессии генов.

1. Регуляция морфогенами (регуляторными молекулами, находящимися в среде).
2. Регуляция электрическими потенциалами и микротоками.
3. Регуляция механическими напряжениями и деформациями.

На основе выше перечисленных положений в работе были поставлены следующие задачи.

1. Получить матрицы из деминерализованной кости человека, провести эксперименты по изучению диффузии веществ внутрь таких матриц, построить модели транспортных процессов.
2. Изучить механические свойства матриц. На основе литературного анализа выбрать подходящие модели механики материала.
3. Провести эксперименты по изучению пьезоэлектрических свойств матриц, чтобы использовать их для модуляции жесткости матрикса в экспериментах с клетками.
4. Разработать метод вычисления коэффициенов диффузии компонентов среды в материале матриц.

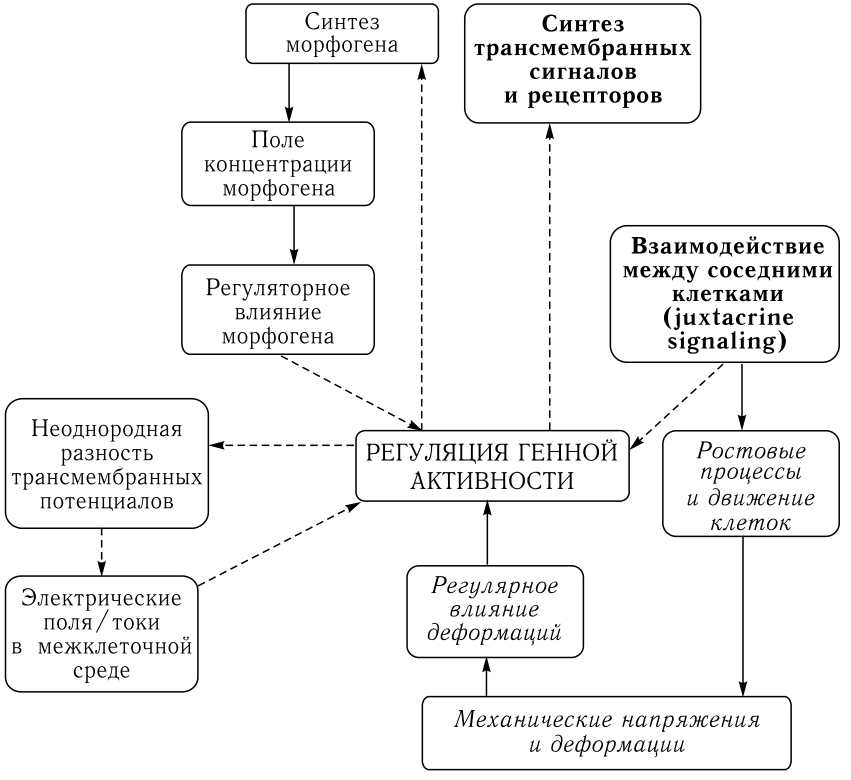


Рис. 6.2. Контуры регуляции активности генов

### Материалы и методы

Материалом для исследования механических и пьезоэлектрических свойств для матриц служили образцы срединных распилов из головок бедренных костей ($n = 6$), резецированных в ходе первичного эндопротезирования тазобедренного сустава у пациентов с коксартрозом. Возраст пациентов — доноров костной ткани составил от 46 до 67 лет, средний возраст — 55,8. А для изучения транспортных свойств дополнительно использовались слои гидрогелей толщиной 100–200 мкм.

В соответствии с утвержденным алгоритмом у доноров костного материала осуществлялся забор крови для обследования на инфекционные агенты (сифилис, ВИЧ, гепатиты В и С). При отрицательных результатах обследования материал поступал в обработку. Осуществлялся радиальный распил ГБК с шагом 0,4–0,5 см, из срединного фрагмента выпиливался образец размерами $1{,}0 \times 3{,}0$ см. Весь костный материал доноров подвергался промывке очищенной проточной водой,

обезжириванию спирт-эфиром и деминерализации в 0,6 Н растворе HCl.

*Морфология и механика*. Микротвердость измерялась по ГОСТ 9450-76 на микротвердомере марки Duramin 5 (Дания). При измерениях применялась нагрузка 245 мН. Также производилось измерение нанотвердости на приборе «Nano Hardness Tester» NHT-S-AX-000X (Германия) в соответствии с международным стандартом ISO 14577-4:2007 при нагрузке на индентор 10 мН. Измерения микротвердости и нанотвердости производились по методу восстановленного отпечатка путем вдавливания алмазной четырехгранной пирамидой Виккерса с углом 136° между противоположными гранями. Значения микротвердости и нанотвердости определяется делением нагрузки $P$ на площадь поверхности отпечатка $F$(1):

$$HV = \frac{P}{F} = \frac{2P\sin\alpha/2}{d^2} = 1{,}8544\frac{P}{d^2}, \qquad (1)$$

где $d$ — диагональ отпечатка.

При измерении нанотвердости на приборе «Nano Hardness Tester» NHT-S-AX-000X (Германия) проводилась также регистрация модуля Юнга.

Исследования на трехточечный изгиб проводились на универсальной настольной электромеханической испытательной машине Instron 3369 (США, «Instron») по ГОСТ 14019-80 при скорости нагружения 0,1 мм/мин и максимальной нагрузке 2 кН. Образцы для испытаний на трехточечный изгиб имели размеры $10 \times 30 \times 4$ мм$^3$.

Морфологию костного материала исследовали на металлографическом инвертированном микроскопе «Альтами МЕТ 1МТ» (Россия, Санкт-Петербург) методами светлого и темного полей, а также по методу поляризации. Пористость костной ткани оценивалась по макроскопическим изображениям, полученным посредством макрофотосъемки исследуемых объектов. Общая пористость (П) рассчитывалась как отношение суммарной длины отрезков, попадающих на поры, к общей длине секущих линий и выражается следующей формулой:

$$\text{П} = \frac{\sum l}{\sum L_1}100\,\%, \qquad (2)$$

где $L_1$ — общая длина секущих в условных единицах измерительного прибора, $l$ — длина секущих, попадающих на поры.

В работе для определения элементного состава костного материала использовали последовательный волнодисперсионный рентгенофлуоресцентный спектрометр Lab Center XRF-1800 (Япония).

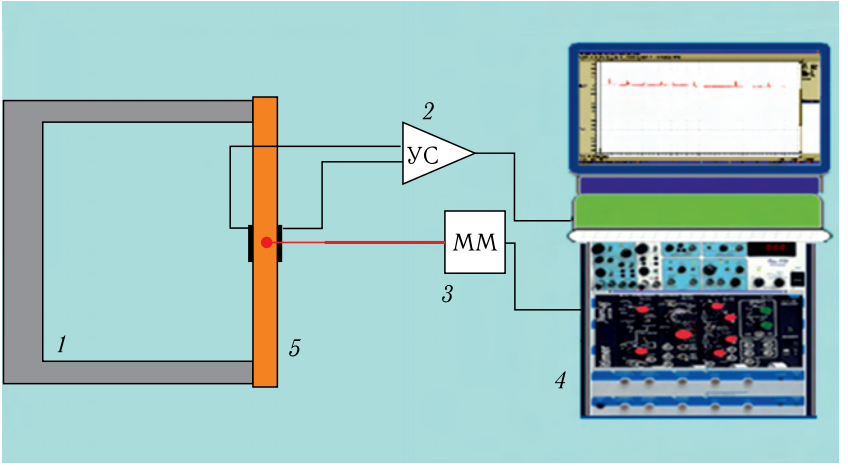


Рис. 6.3. Макет экспериментальной установки для измерения пьезоэлектрических свойств кости (рис. 6.10) и примеры потенциалов, регистрируемых при разных нагрузках и влажности (рис. 6.11) при сопротивлении 20 мОм, Б2 при сопротивлении 80 мОм

*Пьезоэлектрические свойства*. Для измерения пьезоэлектрических свойств нами был сделан макет экспериментальной установки (рис. 6.3) и осуществлена запись пьезоэлектрических потенциалов с образца компактной деминерализованной аллокости. Форма и амплитуда пьезоэлектрических потенциалов зависят от плотности образца (определяемой влажностью) и величины нагрузки. Косвенная оценка влажности осуществлялась измерением электропроводности участка образца, расположенного под электродами. Примеры регистрируемых потенциалов представлены на рис. 6.10, 6.11.

Структурно функциональная схема аппаратно-программного измерительного комплекса состоит из измерительной ячейки (*1*) с образцом (*5*), предварительного усилителя-согласователя (*2*), манипулятора (*3*) и измерительно-управляющего комплекса (*4*).

*Транспортные свойства материала. Метод FRAP*. Для изучения транспортных свойств материала можно использовать метод, состоящий в том, что в изучаемый материал внедряют среду с флуоресцирующим веществом и некоторую область обесцвечивают интенсивным излучением лазера. Затем наблюдают, как восстанавливается флуоресценция в этой области за счет взаимной диффузии «отбеленных» и «активных» молекул. Такой метод называется «восстановление флуоресценции после фотоотбеливания» (Fluorescent Recovery after

Photobleaching — FRAP). По скорости этого восстановления можно оценить коэффициент диффузии флуоресцирующего вещества в изучаемой среде в матриксе материала, решая соответствующую обратную задачу. Экспериментально процедура FRAP проводилась на образцах толщиной порядка 100 мкм. Поэтому для моделирования процесса восстановления была использована двумерная нестационарная диффузионная модель с постоянным коэффициентом диффузии. Этот коэффициент подбирался исходя из минимума отклонения между реальными и смоделированными снимками интенсивности флуоресценции в последовательные моменты времени. За начало отсчета времени принимался момент начала восстановления флуоресценции. Соответствующий снимок использовался в качестве начальных данных. Для поиска коэффициента применялся стандартный метод золотого сечения. С учетом вышесказанного был построен алгоритм, позволяющий оценивать коэффициент диффузии среды по данным обесцвечивания. С помощью построенного алгоритма обработаны результаты ряда экспериментов с различными средами и различными уровнями обесцвечивания.

Результаты измерения поступали в виде набора снимков в известные последовательные моменты времени. На рис. 6.4 показана зависимость средней интенсивности флуоресценции «области интереса» от времени. За начало отсчета модельного времени принята точка минимума кривой, соответствующей средней интенсивности по обес-

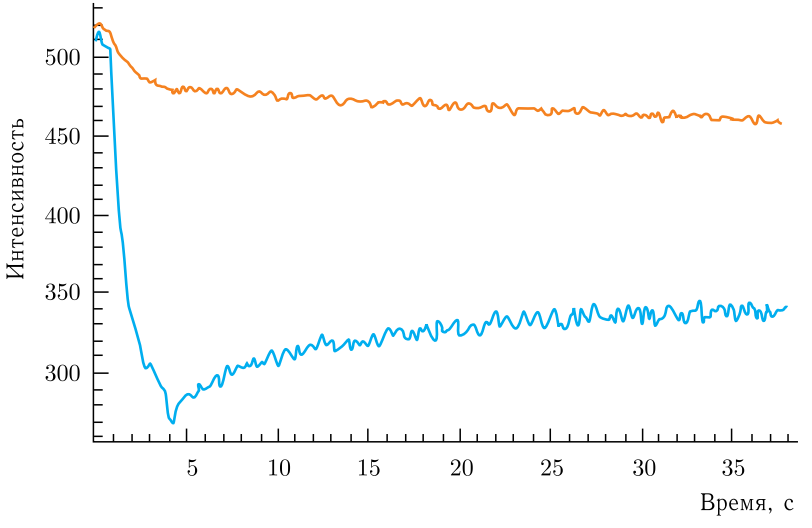


Рис. 6.4. Зависимость средней интенсивности от времени эксперимента. Желтая кривая — средняя по всей области, голубая — по обесцвеченной

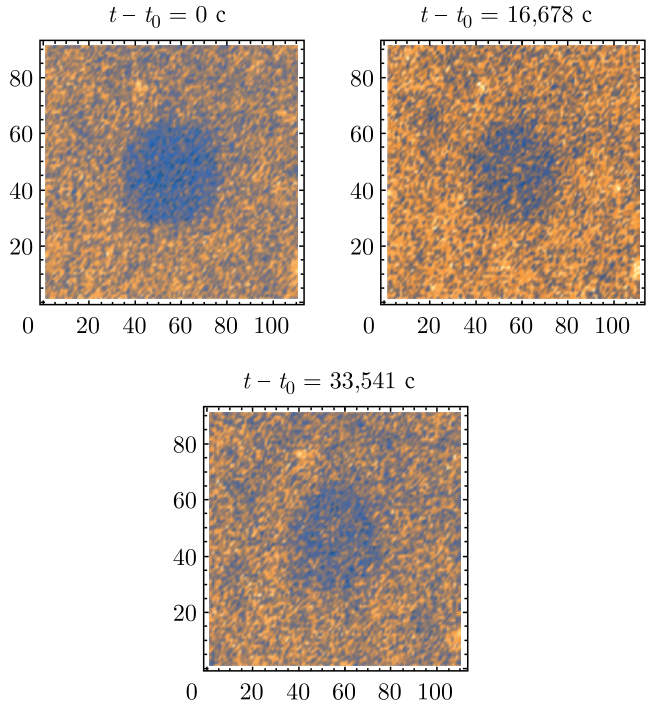


Рис. 6.5. Интенсивность в последовательные моменты времени после окончания обесцвечивания

цвеченной области (голубая кривая на рис. 6.4), в предположении, что это момент окончания процесса обесцвечивания. Соответственно в качестве начальных данных использовали снимок в момент окончания обесцвечивания (рис. 6.5). Последующие снимки служили для решения обратной задачи о поиске коэффициента диффузии.

Численный алгоритм решения обратной задачи по вычислению коэффициента диффузии по экспериментальным данным, аналогичным вышеизложенным, приведен в работе [19].

## Результаты и обсуждение

*Морфология и механика*. Макроскопические образы губчатой и компактной деминерализованной кости одного размера, равного $1{,}0 \times 3{,}0$ см, отличались морфологией поверхности (рис. 6.6).

Морфология всех образцов костной ткани представлена пористой структурой. Поры расположены во всем объеме ткани. На рис. 6.7

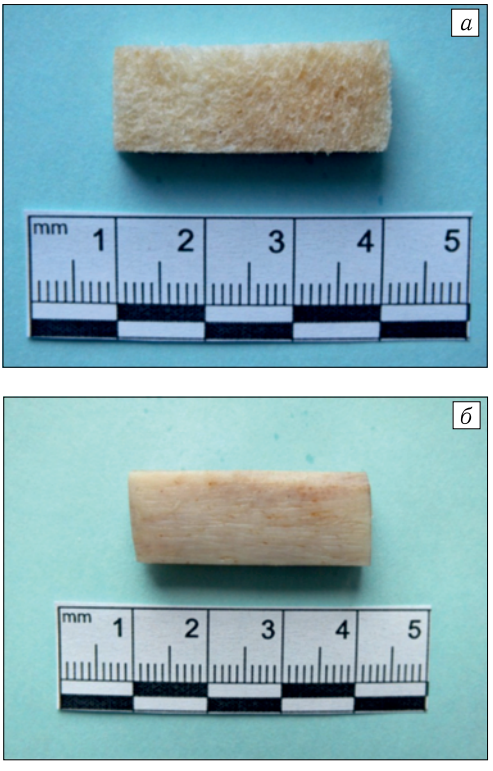


Рис. 6.6. Изображения образцов костной ткани: *а* — деминерализованная костная ткань головки бедренной кости (ДКТ-ГБК), *б* — деминерализованная костная ткань кортикальная (ДКТ — кортикальная)

показаны оптические изображения фрагмента костной ткани, полученные с различными фокальными глубинами, позволяющими оценивать внутренние поры образца (рис. 6.8).

Морфология образцов компактной кости представлена редко расположенными гаверсовыми каналами размером 20 мкм. Расстояние между гаверсовыми каналами варьирует от 100 до 150 мкм. Пористость компактной костной ткани практически отсутствует.

Структура губчатой деминерализованной кости имеет пористость 50 % и выше со средним диаметром пор, наиболее приемлемым для заселения матриц клетками. На рис. 6.9 представлены гистограммы распределения пор по размерам для губчатой деминерализованной кости для исследованных образцов. Все распределения имеют один максимум, положение которого несколько меняется от образца к образцу.

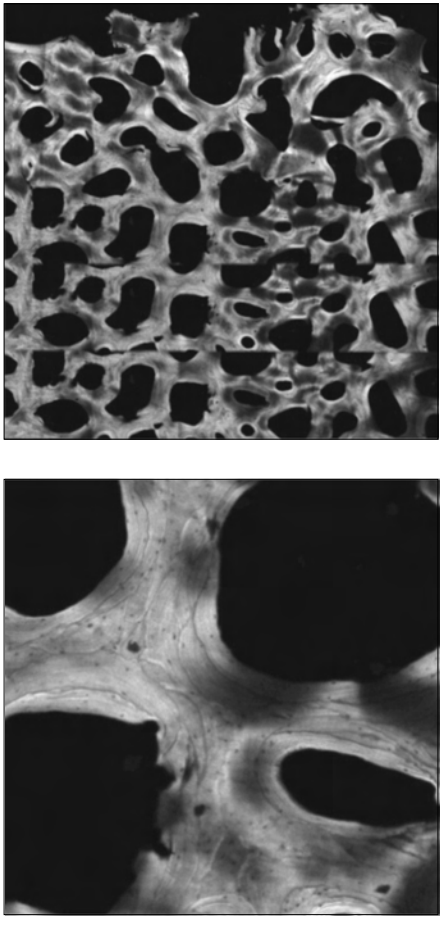

Рис. 6.7. Оптические изображения образца губчатой деминерализованной костной ткани

Средняя пористость составила 52 % для 1 и 2 образцов, 55 % для 3, 4 и 5 образцов и 67 % для 6 образца.

Данные литературы [4, 6] указывают на то, что для заселения матриц остеобластами, которые имеют значительный размер в дифференцированном виде, до 30 мкм, предпочтительнее использовать образцы с размером пор от 250 мкм и более. Изучение микрофотографий показало, что в губчатой кости органический матрикс имеет поры размерами до 0,5 мм и бедно представлены поры размерами от десятка до ста микрометров (рис. 6.9).

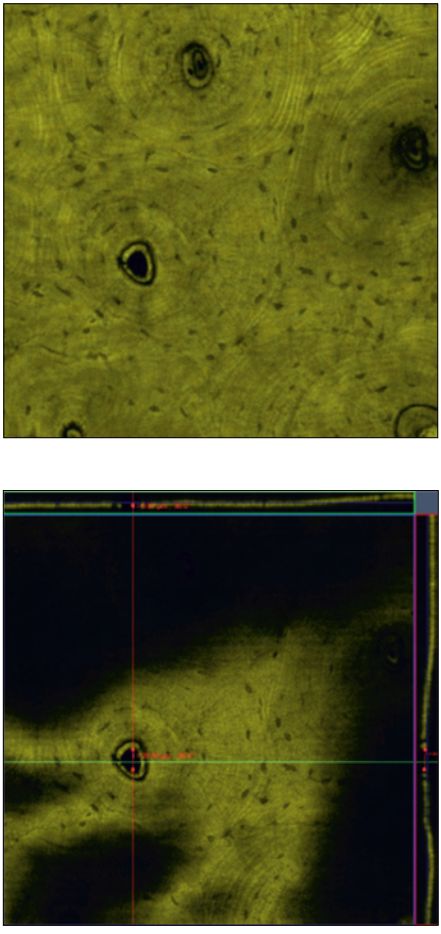

Рис. 6.8. Оптические изображения образца кортикальной деминерализованной костной ткани

В табл. 6.1 и 6.2 приведены механические характеристики для деминерализованной губчатой и кортикальной костной ткани соответственно. Предел прочности для деминерализованной компактной кости изменялся в пределах от 1,1 до 5,5 МПа при предельной деформации до 16,0 %. Модуль Юнга на изгиб изменялся от 49 до 248 МПа. В случае деминерализованной губчатой костной ткани механические характеристики ниже. Так предел прочности изменялся в пределах 1,1–5,5 МПа при максимальной предельной деформации 8,4 %. Модуль Юнга при изгибе изменялся от 3 до 50 МПа. Более низкие

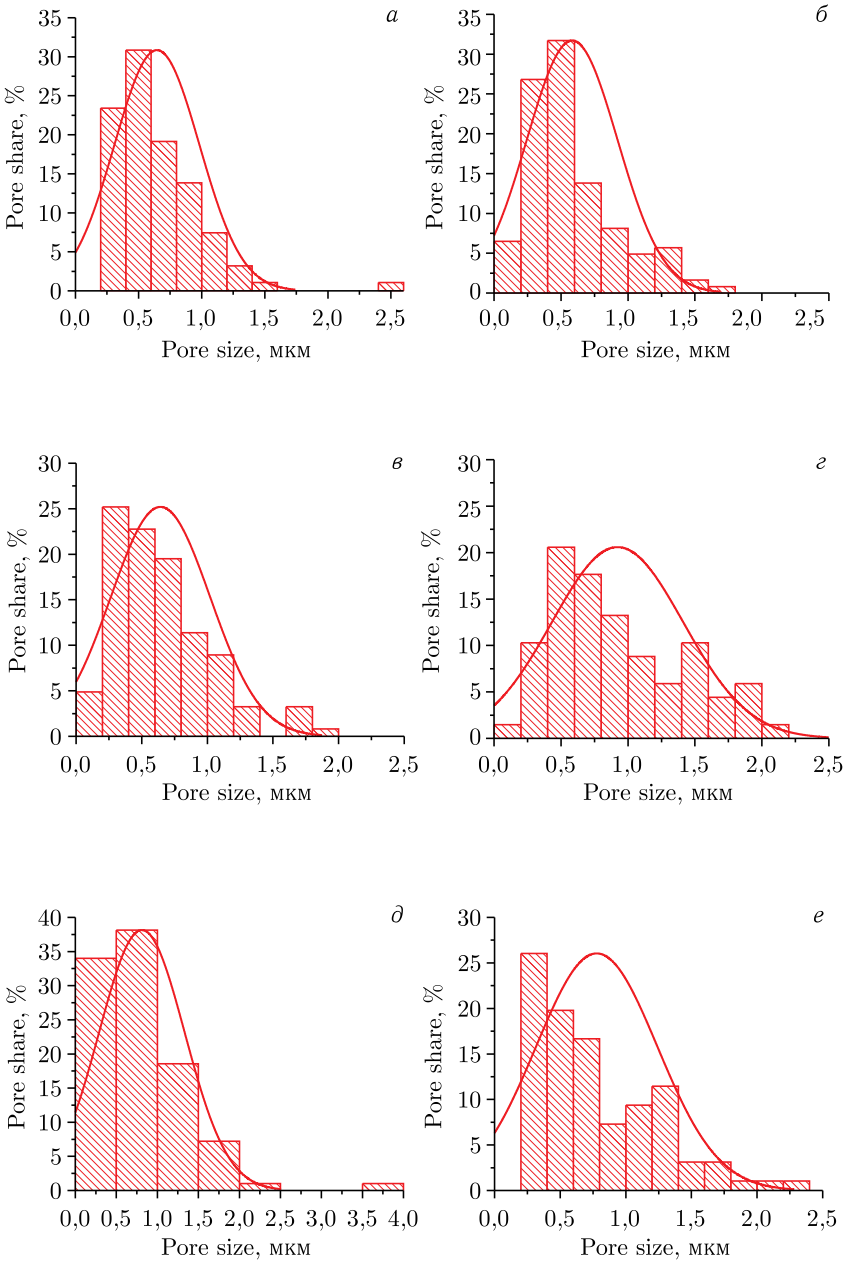


Рис. 6.9. Распределение пор по размерам для деминерализованной трубчатой кости. Номер образца: *а* — 1, *б* — 2, *в* — 3, *г* — 4, *д* — 5, *е* — 6

Таблица 6.1. Механические характеристики деминерализованной кортикальной кости

| Образец | Предел прочности ($\sigma_B$), МПа | Предельная деформация ($\varepsilon$), % | Модуль Юнга при при изгибе ($E$), МПа |
|---|---|---|---|
| 1 | 3,9 | 11,1 | 199 |
| 2 | 2,0 | 13,1 | 75 |
| 3 | 1,1 | 11,2 | 49 |
| 4 | 5,5 | 16 | 220 |
| 5 | 4,9 | 10,8 | 175 |
| 6 | 4,4 | 11,5 | 248 |

Таблица 6.2. Механические характеристики деминерализованной губчатой кости

| Образец | Предел прочности ($\sigma_B$), МПа | Предельная деформация ($\varepsilon$), % | Модуль Юнга при при изгибе ($E$), МПа |
|---|---|---|---|
| 1 | 1,2 | 3,6 | 37 |
| 2 | 0,4 | 7,5 | 12 |
| 3 | 1,9 | 2,6 | 34 |
| 4 | 0,4 | 4,1 | 14 |
| 5 | 0,8 | 5,5 | 3 |
| 6 | 0,8 | 8,4 | 11 |
| 7 | 2,4 | 5,2 | 50 |

характеристики у губчатой костной ткани связаны с наличием каркасной пористой структуры при отсутствии таковой у компактной кости.

При сравнительной оценке механических характеристик деминерализованной кортикальной и губчатой кости с использованием U-критерий Манна–Уитни получили статистически значимые различия уровня всех признаков в сравниваемых группах ($p < 0{,}05$). По пределу прочности и предельной деформации U-критерий Манна–Уитни равен 5, а по модулю Юнга при изгибе U-критерий Манна–Уитни равен 1 при критическом значении при заданной численности сравниваемых 6 групп.

*Пьезоэлектрические свойства*. Проведены пилотные исследования потенциалов на электродах при создании нагрузки на образец. Форма и амплитуда сигналов зависела от степени жесткости образца, которая

определялась его влажностью. Косвенная оценка влажности осуществлялась измерением электропроводности участка образца, расположенного под электродами.

Примеры регистрируемых сигналов представлены на рис. 6.10 и 6.11.

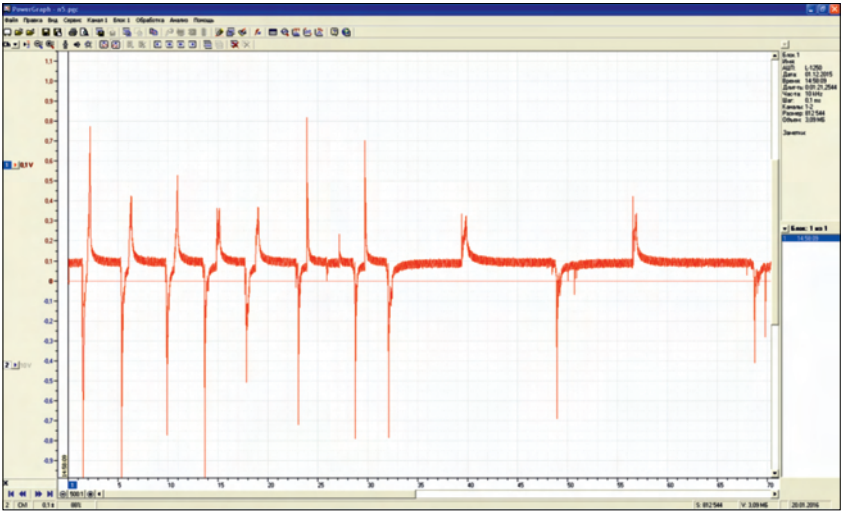

Рис. 6.10. Пример потенциалов на «матрице» при различных значениях деформации (при $R = 20$ мОм)

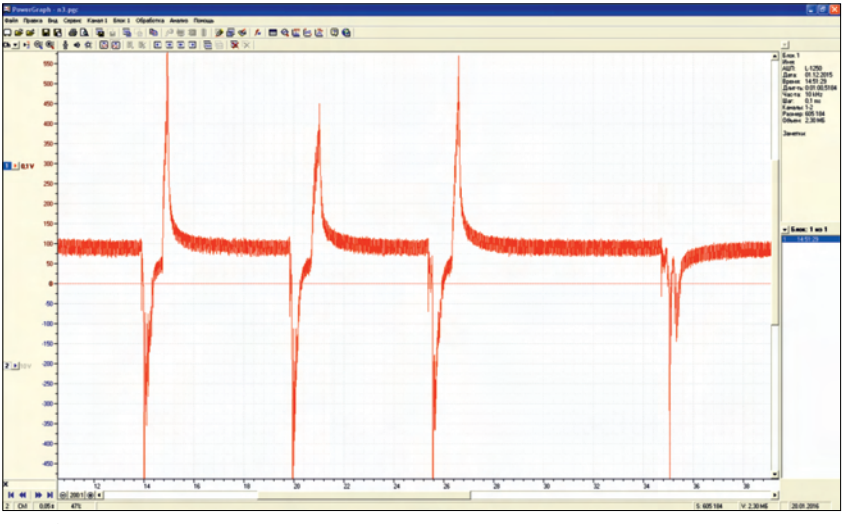

Рис. 6.11. Пример потенциалов на «матрице» при различных значениях деформации (при $R = 80$ мОм)

Рис. 6.12. Диаграмма зависимость амплитуды сигнала от жесткости образца. 1 — $R = 20$ мОм, 2 — $R = 50$ мОм, 3 — $R = 80$ мОм

Таблица 6.3. Расчет коэффициентов диффузии различных матриц

| Материал | $D$, м$^2$/с |
|---|---|
| Chitosan + 25 % Plc | $4{,}96 \times 10^{-12}$<br>$7{,}15 \times 10^{-12}$ |
| Chitosan + 50 % Plc | $2{,}27 \times 10^{-12}$<br>$1{,}17 \times 10^{-11}$ |
| Chitosan + 75 % Plc | $2{,}21 \times 10^{-12}$<br>$7{,}44 \times 10^{-12}$ |
| Chitosan | $2{,}79 \times 10^{-11}$<br>$1{,}493 \times 10^{-11}$<br>$1{,}1 \times 10^{-11}$ |
| Gelatin | $3{,}54 \times 10^{-12}$<br>$3{,}68 \times 10^{-12}$ |
| Matrigel | $1{,}73 \times 10^{-12}$<br>$1{,}84 \times 10^{-12}$<br>$2{,}07 \times 10^{-12}$ |
| Rat collagen | $3{,}45 \times 10^{-11}$<br>$3{,}43 \times 10^{-11}$<br>$3{,}3 \times 10^{-11}$<br>$2{,}61 \times 10^{-11}$<br>$2{,}82 \times 10^{-11}$<br>$1{,}21 \times 10^{-11}$<br>$5{,}45 \times 10^{-12}$ |
| Деминерализованная кость | $4{,}16 \times 10^{-11}$<br>$4{,}76 \times 10^{-11}$ |

По результатам измерений строилась зависимость амплитуды сигнала от жесткости образца (оцениваемой по электропроводности). На рис. 6.12 представлена эта зависимость на основе данных, полученных в пилотных экспериментах.

*Оценка коэффициентов диффузии*. На основе FRAP экспериментов проведены сравнительные оценки коэффициентов диффузии флуоресцентных антигенов в образцах из деминерализованного костного матрикса компактной кости человека и образцах искусственных матриц из желатина, крысиного коллагена и матригеля, а также гидрогеля на основе смеси хитозана с полилактидом в разных пропорциях. Образцы для экспериментов готовились следующим способом: полимеризованный гель или костный образец инкубировались в растворе с флуоресцирующими антителами в течение суток.

Результаты расчета коэффициентов диффузии по проведенным экспериментам представлены в сводной табл. 6.3.

## Заключение

Были отработаны и/или адаптированы методы измерений микроморфологических, пьезоэлектрических и транспортных свойств у материалов потенциальных матриц. Показано, что у полученных образцов материалов из кости человека данные характеристики, как правило, значительно варьируют. Исходя из этого становится очевидным, что отработка протоколов методов измерения вышеперечисленных свойств — важная работа для создания технологии биоинженерии тканевых имплантов для восстановительной хирургии.

## Список литературы

1. *Liao Z.*, *Wang C.H.*, *Cui W.L.* // J. Invest. Surg. 2016. V. 11. P. 1–10 [Epub ahead of print].
2. *Кирилова И.А.* Анатомо-функциональные свойства кости как основа создания костно-пластических материалов для травматологии и ортопедии. Автореферат дисс. ... доктора мед. наук. Новосибирск: Новосибирский гос. мед. ун-т., 2011.
3. *Нигматуллин Р.Т.*, *Щербаков Д.А.*, *Мусина Л.М.*, *Ткачев А.А.* Некоторые аспекты клинического применения костных и хрящевых аллотрансплантатов // Медицинский вестник Башкортостана. 2012. Т. 7, №4. С. 78–83.
4. *Hofer S.*, *Leopold S.S.*, *Jacobs J.* Clinical perspectives on the use of bone graft based on allografts // Laurencin CT, ed. Bone graft substitutes // West Conshohocken, PA: ASTM International. 2003. P. 68–95.

5. *Cammisa F.P.*, *Lowery G.*, *Garfin S.R.*, *Geisler F.H.*, *Klara P.M.*, *McGuire R.A.*, *Sassard W.R.*, *Stubbs H.*, *Block J.E.* Two-year fusion rate equivalency between Grafton DBM gel and autograft in posterolateral spine fusion: a prospective controlled trial employing side-by-side comparison in the same patient // Spine. 2004. V. 29. P. 660–666.

6. *Швец А.И.*, *Ивченко В.К.* Костные трансплантаты и их заменители в хирургии позвоночника // Ортопедия, травматология и протезирование. 2008. № 3. С. 66–69.

7. *Дианов С.В.*, *Тарасов А.Н.* Аллопластика вертлужной впадины при первичном и ревизионном эндопротезировании тазобедренного сустава // Травматология и ортопедия России. 2009. № 3. С. 130–132.

8. *Major M.R.*, *Wong V.W.*, *Nelson E.R.*, *Longaker M.T.*, *Gurtner G.C.* // Plast. Reconstr. Surg. 2015. V. 29, No 5. P. 1489–1498. doi: 10.1097/PRS.0000000000001193

9. *Parisay I.*, *Ghoddusi J.*, *Forghani M.* Review A review on vital pulp therapy in primary teeth // Iran Endod. J. 2015. V. 10, No 1. P. 6–15. Epub 2014., Dec. 24.

10. *Грудянов А.И.*, *Николаев А.В.* Сравнительный анализ отдаленных результатов использования различных ауто- и аллотрансплантатов для создания зоны кератинизированной десны при вестибулопластике на нижней челюсти // Стоматология. 2016. Т. 95, № 1. С. 40–43.

11. *Кирилова И.А.*, *Николаев С.В.*, *Подорожная В.Т.*, *Шаркеев*, *Уваркин П.В.*, *Ратушняк А.С.*, *Чебодаева В.В.* Внеклеточный матрикс из кости человека как основа тканеинженерной конструкции // Российский иммунологический журнал. 2016. Т. 10(19), № 2(1). С. 579–581.

12. *Kirilova I.A.*, *Sharkeev Yu.P.*, *Nikolaev S.V.*, *Podorozhnaya V.T.*, *Uvarkin P.V.*, *Ratushnyak A.S.*, *Chebodaeva V.V.* Physicomechanical properties of the extracellular matrix of a demineralized bone // AIP Conf. Proc. 2016. V. 1760. P. 020027; doi: 10.1063/1.4960246. View online: http://dx.doi.org/10.1063/1.4960246

13. *Vitor E.S.*, *Manuela E.G.*, *Joao F.M.*, *Rui L.R.* Controlled release strategies for bone, cartilage and osteochondral engineering. Part I: Recapitulation of native tissue healing and variables for the design of delivery systems // Tissue engineering: Part B. 2013. V. 19, No 4. P. 308–326.

14. *Velasco M.A.*, *Narváez-Tovar C.A.*, *Garzón-Alvarado D.A.* Design, Materials, and Mechanobiology of Biodegradable Scaffolds for Bone Tissue Engineering // BioMed. Res. Intern. 2015. Article ID 729076. 21 p. doi:10.1155/2015/729076

15. *Кирпичев И.В.*, *Маслов Л.Б.*, *Коровин Д.И.* Актуальные междисциплинарные проблемы применения современных пористых имплантатов для замещения костных дефектов // Современные проблемы науки и образования. 2016. № 1. С. 2. http://www.science-education.ru

16. *Подорожная В.Т.*, *Кирилова И.А.*, *Шаркеев Ю.П.*, *Попова К.С.*, *Уваркин П.В.*, *Фомичев Н.Г.* Изучение структурно-функциональных характеристик срединных распилов головок бедренных костей // Успехи современного естествознания. 2015. № 9. С. 126–129.

17. *Кирилова И.А.*, *Шаркеев Ю.П.*, *Подорожная В.Т.*, *Попова К.С.*, *Уваркин П.В.*, *Фомичев Н.Г.* Изучение морфологии срединных распилов головки бедренной кости // Успехи современного естествознания. 2015. № 8. С. 58–61.

18. *Murphy S.V.*, *Atala A.* Organ engineering — combining stem cells, biomaterials, and bioreactors to produce bioengineered organs for transplantation // Bioessays. 2012. V. 35. P. 163–172.

19. *Пененко А.В.*, *Николаев С.В.*, *Голушко С.К.*, *Ромащенко А.В.*, *Кирилова И.А.* Численные алгоритмы идентификации коэффициента диффузии в задачах тканевой инженерии // Матем. биология и биоинформ. 2016. Т. 11, вып. 2. С. 426–444.

# 7. ЧИСЛЕННЫЕ АЛГОРИТМЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ КОЭФФИЦИЕНТА ДИФФУЗИИ В ЗАДАЧАХ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

*А.В. Пененко, С.В. Николаев, С.К. Голушко, А.В. Ромащенко, И.А. Кирилова*

Mathematical Biology and Bioinformatics. 2016. Т. 11, № 2. С. 426–444

В работе изучаются алгоритмы, позволяющие оценивать коэффициенты диффузии материалов изучаемого образца, погруженного в раствор, по последовательности томографических снимков распределения парамагнитных частиц в этом растворе. С помощью оператора чувствительности, построенного на основе сопряженных уравнений для модели процесса диффузии, соответствующая коэффициентная обратная задача сводится к квазилинейному операторному уравнению, которое затем решается алгоритмом ньютоновского типа с последовательным вычислением $r$-псевдообратных операторов увеличивающейся размерности. Эффективность построенного алгоритма изучается в численных экспериментах. Для сравнения также рассматривается градиентный алгоритм решения поставленной обратной задачи.

# 7. NUMERICAL ALGORITHMS FOR DIFFUSION COEFFICIENT IDENTIFICATION IN PROBLEMS OF TISSUE ENGINEERING

*A.V. Penenko, S.V. Nikolaev, S.K. Golushko, A.V. Romashenko, I.A. Kirilova*

Identification algorithms of diffusion coefficients in a specimen with tomographic images of the solution penetration dynamics are considered. With the sensitivity operator, built on the basis of adjoint equations for diffusion process model, the corresponding coefficient inverse problem is reduced to the quasilinear operator equation which is then solved by the Newton-type method with successive evaluation of $r$-pseudo inverse operators of increasing dimensionality. The efficiency of the constructed algorithm is tested in numerical experiments. For comparison, a gradient-based algorithm for the inverse problem solution is considered.

## Введение

Практически все разрабатываемые технологии тканевой инженерии включают этап приготовления заготовки импланта определенной формы из подходящего материала. Существенной характеристикой такого материала является его пористость — наличие развитой системы каналов с диаметрами от долей до сотен микрон. По каналам, заполненным питательным раствором, могут мигрировать клетки и распространяться химические вещества. Заготовка заселяется клетками, и полученный протоимплант инкубируется в специально подобранных условиях с целью получения тканеинженерного импланта [1, 2]. Естественно ожидать, что транспортные процессы диффузионного типа играют решающую роль в тканевой инженерии. От них зависит скорость заселения заготовок имплантов клетками за счет спонтанной подвижности последних, а также потоки компонентов питательной среды и продуктов метаболизма клеток в процессе заселения и «созревания» протоимпланта.

Данная работа мотивирована задачами изучения транспорта частиц различных масштабов, от малых молекул, макромолекулярных комплексов и до клеток в материалах, представляющих интерес в качестве потенциальных матриксов (scaffolds) для тканевых имплантов. В качестве экспериментального метода используется метод магнитно-резонансной томографии (МРТ), поскольку материалы для скаффолдов часто являются оптически непрозрачными. В типичном эксперименте в дискретные моменты времени делаются томографические снимки проникновения вещества внутрь образца из окружающего раствора, по которым восстанавливается распределение концентрации в образце в зависимости от времени.

В предварительных экспериментах в качестве детектируемых меток тестировались ионы марганца и наночастицы из оксида марганца. Были проведены эксперименты с наблюдением диффузии этих частиц из раствора внутрь коллагенового и минерального матриксов костных образцов. На рис. 7.1 показаны результаты одного из экспериментов, проведенных для отработки протокола получения экспериментальных данных о процессах диффузии парамагнитных частиц в неоднородной области (сосуд с образцом) с помощью МРТ.

Для такого эксперимента можно сформулировать прямую задачу по определению динамики распределения концентрации диффундирующего вещества в сосуде и находящемся в нем образце заданной формы при заданных коэффициентах диффузии и начальном распределении концентраций.

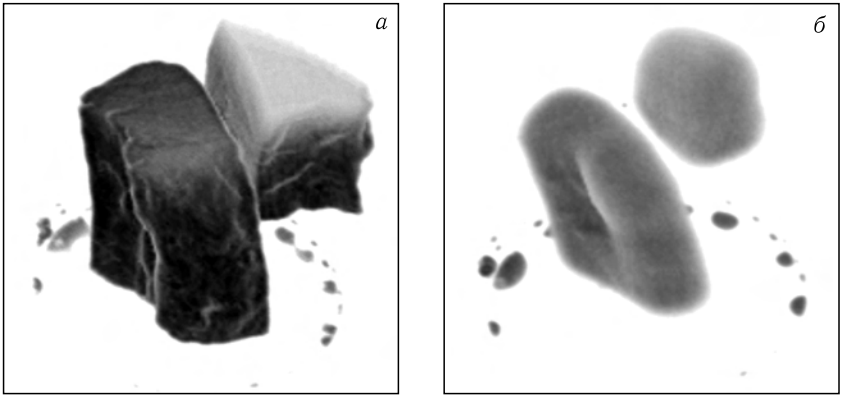


Рис. 7.1. Измерение диффузии ионов марганца в коллагеновом матриксе костного образца методом МРТ. Показаны поверхности одинаковой концентрации ионов: *а* — начало эксперимента, *б* — после 6 часов диффузии

В случае когда образец имеет продолговатую форму, а в качестве исходных данных используются томографические срезы, перпендикулярные длинной оси образца и расположенные около середины этой оси, диффузию с хорошим приближением можно считать двумерной. Пример таких снимков приведен на рис. 7.2. В данном случае для получения МРТ-снимков образец помещали в цилиндр шприца, заполненного буферным раствором с ионами марганца. Снимки производились в фиксированной плоскости с интервалами в полтора часа.

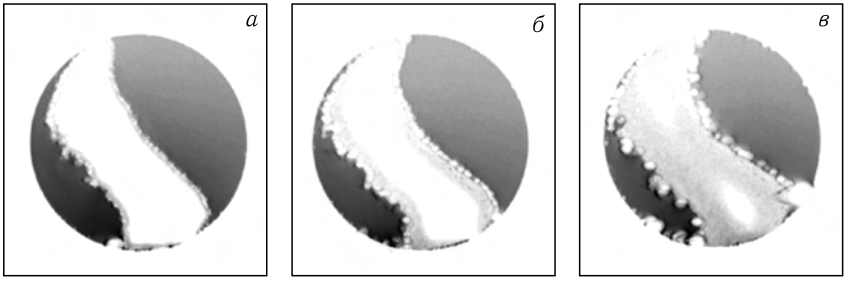


Рис. 7.2. При диффузии ионов марганца внутри образца образуется более темная область, которая при выбранном протоколе МРТ-эксперимента означает увеличение концентрации ионов марганца. Образец представляет собой геометрическое тело, вытянутое перпендикулярно плоскости рисунка с примерно одинаковым поперечным сечением. Показано среднее сечение в моменты времени: *а* — в начале эксперимента, *б* — спустя 1 ч 30 мин, *в* — спустя 6 ч от начала эксперимента

Для этой экспериментальной постановки была сформулирована обратная задача по восстановлению коэффициентов диффузии для двух областей с заданной геометрией, одна из которых содержится в другой. Таким образом, в данной работе изучаются алгоритмы, позволяющие оценить распределение коэффициента диффузии в двумерной области, представляющей срез сосуда с образцом, по временному ряду томографических снимков в процессе инкубации образца в растворе с парамагнитными частицами. Численное решение этой обратной задачи может оказаться достаточно затратным с вычислительной точки зрения, поэтому, наряду с изучением алгоритмов решения, исследуется вопрос о способах экспресс-оценки информативности экспериментальных данных для обратной задачи.

Часто для решения обратных задач используются оптимизационные алгоритмы градиентного типа на основе сопряженных уравнений [3, 4, 5, 6] и др. Также в монографии [7] можно найти обзор вариационных методов в приложении к нелинейным обратным задачам построения изображений. Такие алгоритмы позволяют решать широкий круг прикладных задач, однако плохо поддаются распараллеливанию. В данной работе предлагается и исследуется алгоритм, эффективно использующий современные технологии параллельных вычислений. Целью работы является численное исследование эффективности предложенного алгоритма при решении обратной задачи.

Работа состоит из двух разделов. В первом разделе содержится математическая постановка обратной задачи, проводится построение оператора чувствительности и алгоритма ньютоновского типа на основе $r$-псевдообратных операторов [8, 9] увеличивающейся размерности для построенных операторов чувствительности. Во втором разделе представлены результаты численных экспериментов.

## Численный алгоритм

**1. Постановка задачи.** Пусть в нашем распоряжении имеется неоднородный образец и требуется оценить распределение коэффициента диффузии по его объему (в частности, по его поперечному сечению).

Характерные размеры образца — несколько сантиметров. Начальное предположение о структуре образца заключается в том, что образец однородный. Он находится в прямоугольной области $\Omega = [0, X] \times \times [0, Y]$, на границах $\partial\Omega$ которой заданы постоянные концентрации контрастного раствора $\varphi_{\partial\Omega}(x, t)$.

Образец в начальный момент времени погружается в некоторый раствор, не содержащий детектируемой метки, и пропитывается им. После этого раствор заменяется на другой, содержащий метку, кон-

центрацию которой можно измерять с помощью соответствующего оборудования, например томографа. Таким образом, в начальный момент времени концентрация детектируемой метки внутри образца равна 0. Определим временной интервал $[0, T]$. Модель процесса определяется начально-краевой задачей

$$\varphi_t(x,t) = \nabla \cdot (k(x)\nabla\varphi(x,t))\,(x,t) \in \Omega \times [0,T], \tag{1}$$

$$\varphi(x,t) = \varphi_{\partial\Omega}(x,t), \quad x \in \partial\Omega, \quad t \in [0,T], \tag{2}$$

$$\varphi(x,0) = I_0(x), \quad x \in \Omega. \tag{3}$$

Коэффициент диффузии $k(x)$ будем искать из множества ограниченных достаточно гладких функций $K \subset L_2(\Omega)$, отделенных от 0:

$$0 < k_{\min} < k(x) < k_{\max}, \quad x \in \Omega. \tag{4}$$

**Прямая задача.** Требуется по известным $I_0(x)$, $\varphi_{\partial\Omega}(x,t)$, $k(x)$ решить начально-краевую задачу (1)–(3) и найти $\varphi(x,t)$. Для удобства дальнейшего изложения обозначим решение прямой задачи через $\varphi(x,t;k)$. Определим оператор прямой задачи как

$$A : \begin{cases} K \to H \\ k \mapsto \{\varphi(.,t_m;k)\}_{m=1}^{M} \end{cases}, \tag{5}$$

где $H = L_2(\Omega)^M$.

В последовательные моменты времени $\{t_m\}_{m=0}^{M}$ такие, что $t_0 = 0$ и $t_M = T$, делаются снимки $I_m$ распределения концентраций внутри этого образца. Оператор измерений, связывающий переменные модели с результатами таких измерений, действует по правилу:

$$\varphi(x,t_m) = I_m(x) + \delta I_m(x), \quad x \in \Omega, \quad m = 0,\dots,M, \tag{6}$$

где $\delta I_m(x)$ — погрешность в данных. Предположим, что коэффициент диффузии $k \in K$ — достаточно гладкий, чтобы существовали следы $\varphi(x,t_m) \in L_2(\Omega)$, $m = 0,\dots,M$. Обозначим через $\mathbf{I} = \{I_m\}_{m=1}^{M} \in H$ вектор, состоящий из всех доступных снимков, кроме нулевого, а через $\delta\mathbf{I} = \{\delta I_m\}_{m=1}^{M} \in H$ — вектор, состоящий из всех погрешностей данных измерений.

**Обратная задача.** Требуется по $\varphi_{\partial\Omega}(x,t)$, $I_m(x)$, $m = 0,\dots,M$, $\|\delta\mathbf{I}\|$ и соотношениям (1)–(3), (6) найти коэффициент диффузии $k(x)$, т. е. решить нелинейное операторное уравнение с неточной правой частью

$$A(k) = \mathbf{I} + \delta\mathbf{I}. \tag{7}$$

В теории обратных задач постановки такого типа известны как задачи с финальным переопределением. В частности, в работе [10] дан

теоретический анализ свойств аналогичной задачи в одномерном случае. В рассматриваемой в данной работе постановке обратной задачи используется не один финальный снимок, а целая последовательность снимков.

**Оператор чувствительности.** Обобщить идею сопряженных уравнений [11, 12] и функций чувствительности [3, 13] позволяет оператор чувствительности [14, 15]. Он связывает вариации неизвестного коэффициента с вариациями измеряемых величин. Основой для формирования оператора чувствительности является соотношение вида

$$\langle A(k_2) - A(k_1), \mathbf{p} \rangle_H = \langle M[k_2, k_1; \mathbf{p}], k_2 - k_1 \rangle_K , \tag{8}$$

где

$$\langle a, b \rangle_H = \sum_{m=1}^{M} \int_\Omega a_m(x) b_m(x) dx$$

и $\langle ., . \rangle_K$ — скалярные произведения в пространстве, содержащем $K$ соответственно.

В рассматриваемой постановке соотношение (8) определяется согласно теореме 1.

**Теорема 1.** *Если $k_1, k_2 \in K$ и $\psi(x,t)$ удовлетворяет системе*

$$-\psi_t(x,t) = \nabla \cdot (k_1(x) \nabla \psi(x,t)), \quad (x,t) \in \Omega \times \cup_{m=1}^{M} (t_{m-1} t_m), \tag{9}$$

$$\psi(x,t) = 0, \quad (x,t) \in \partial\Omega \times \cup_{m=1}^{M} [t_{m-1}, t_m], \tag{10}$$

$$[\psi(x,t)]_{t=t_m} = p_m(x), \quad x \in \Omega, \quad m = 1, \ldots, M, \tag{11}$$

$$\psi(x, T+) = 0, \quad x \in \Omega, \tag{12}$$

*то верно тождество*

$$\sum_{m=1}^{M} \int_\Omega (\varphi(x, t_m; k_2) - \varphi(x, t_m; k_1)) p_m(x) dx = \\ = \int_0^T \int_\Omega (k_2(x) - k_1(x)) \nabla \varphi(x, t; k_2) \cdot \nabla \psi(x,t) dx\, dt. \tag{13}$$

Если $k \in K$, то для вариации функционала

$$J(k) = \sum_{m=1}^{M} \int_\Omega \left(\varphi(x t_m; k) - I_m(x)\right)^2 dx \tag{14}$$

верно соотношение

$$J(k+\delta k)-J(k)=\int\limits_{\Omega}\delta k(x)\left(\int\limits_{0}^{T}\nabla\varphi(x,t;k)\cdot\nabla\psi(x,t)dt\right)dx+$$
$$\int\limits_{\Omega}\int\limits_{0}^{T}\delta k(x)\left(\nabla\varphi(x,t;k+\delta k)-\nabla\varphi(x,t;k)\right)\cdot\nabla\psi(x,t)dt\,dx+$$
$$\sum_{m=1}^{M}\int\limits_{\Omega}\left(\varphi(x,t_m;k+\delta k)-\varphi(x,t_m;k)\right)^2dx, \quad (15)$$

где $\psi(x,t)$ — решение сопряженной системы (9)–(12) при

$$k_1=k, \quad (16)$$

$$p_m(x)=2\left(\varphi(x,t_m;k)-I_m(x)\right), \quad m=1,\ldots,M, \quad x\in\Omega. \quad (17)$$

Здесь $[f(t)]_{t=t_m}:=f(t_m+0)-f(t_m-0)$ обозначает скачок функции. Если $a,b\in\mathbb{R}^2$, то $a\cdot b=\sum\limits_{m=1}^{2}a_mb_m$. Доказательство приведено в приложении. Утверждения такого типа известны и их аналоги для различных постановок приводятся, например, в [3, 16] и др.

Обозначим через $\psi(x,t;k,\mathbf{p})$ решение сопряженной задачи (9)–(12), где $\mathbf{p}=\{p_m\}_{m=1}^{M}\in H$, а через $\psi(x,t;k)$ — решение (9)–(12) совместно с (16)–(17). В этих обозначениях

$$M[k_2,k_1;\mathbf{p}]:=\int\limits_{0}^{T}\nabla\varphi(x,t;k_2)\cdot\nabla\psi(x,t;k_1,\mathbf{p})dt. \quad (18)$$

Если прямая задача корректна, а второе и третье слагаемое в (15) оцениваются как $o(\|\delta k\|)$, то градиент целевого функционала (14) определяется соотношением

$$\nabla_kJ(k)=\int\limits_{0}^{T}\nabla\varphi(x,t;k)\cdot\nabla\psi(x,t;k)dt \quad (19)$$

и может быть использован для минимизации этого функционала градиентным методом.

В соотношении (8) в качестве $\mathbf{p}$ рассмотрим элементы некоторой ортонормированной системы $L=\{e_l\}_{l\in\Lambda}\subset H$, конечной или бесконечной.

В этом случае верно соотношение

$$Pr_L\left(A(k_2)-A(k_1)\right)=\sum_{l\in\Lambda}\left\langle A(k_2)-A(k_1),e_l\right\rangle_H e_l, \tag{20}$$

где $Pr_L$ — ортогональный проектор на $L$. Тогда в силу (8)

$$Pr_L\left(A(k_2)-A(k_1)\right)=\left\langle\sum_{l\in\Lambda}M\left[k_2,k_1;e_l\right]e_l,k_2-k_1\right\rangle_K. \tag{21}$$

Назовем оператором чувствительности линейный оператор

$$M_L[k_2,k_1]:\begin{cases}L_2(\Omega)\to\left(L_2(\Omega)\right)^M\\ z\mapsto\left\langle\sum\limits_{l\in\Lambda}M\left[k_2,k_1;e_l\right]e_l,z\right\rangle_K\end{cases}.$$

Верно соотношение

$$Pr_L\left(A(k_2)-A(k_1)\right)=M_L\left[k_2,k_1\right](k_2-k_1),$$

связывающее вариацию операторов прямой задачи с вариацией коэффициентов. Это выражение позволяет переформулировать обратную задачу в виде квазилинейного операторного уравнения. Подытожим проведенные рассуждения теоремой 2.

**Теорема 2.** *Если* $k_*,k_0\in K$, $A(k_*)=\mathbf{I}$ *и* $L\subset H$ — *некоторая ортонормированная система векторов, то*

$$Pr_L\left(\mathbf{I}-A(k_0)\right)=M_L[k_*,k_0]\left(k_*-k_0\right). \tag{22}$$

Если для любых $k_*,k_0\in K$ выполняется соотношение

$$\|M_L[k_*,k_0]-M_L[k_0k_0]\|\leqslant C\|k_*-k_0\|, \tag{23}$$

то

$$Pr_LA(k_*)'=M_L[k_*,k_*], \tag{24}$$

как это для другой постановки обратной задачи показано в [14].

**3. Алгоритм ньютоновского типа с $r$-псевдообратными операторами.** В качестве ортонормированной системы

$$L=\{e_{mpq}|1\leqslant p\leqslant P,1\leqslant q\leqslant Q,1\leqslant m\leqslant M\}, \tag{25}$$

$$e_{mpq}(x,y)=\left\{0,\dots,\overbrace{\frac{XY}{2}\cos\left(\frac{2\pi px}{X}\right)\cos\left(\frac{2\pi py}{Y}\right)}^{},\dots,0\right\}, \tag{26}$$

будем рассматривать конечные подмножества косинус-базиса для каждого из $1,\dots,M$ снимков. Выбор $P$ и $Q$ можно осуществлять на основе

разрешения получаемых снимков и возможностей компьютера. Таким образом, число элементов базиса возрастает как с увеличением числа снимков, так и с увеличением их детализации.

Мощным инструментом анализа линейных операторов является разложение Шмидта (для случая матриц известное как сингулярное разложение). Его смысл состоит в том, что всякий линейный вполне непрерывный оператор $C$ допускает разложение

$$C = \sum_{l=1}^{r(C)} \sigma_l u_l \langle ., v_l \rangle, \tag{27}$$

где $r(C)$ — ранг оператора $C$, $\{v_l\}_{l=1}^{r(C)}$, $\{u_l\}_{l=1}^{r(C)}$ — некоторые ортонормированные системы, $\sigma_l(C) > 0$ — упорядоченные по убыванию $s$-числа оператора [17].

Разложение Шмидта позволяет оптимизировать размерность рассматриваемых данных измерений. В частности, если разложить $A(k_2) - A(k_1)$ по левым сингулярным векторам, то можно сказать, какая часть этой разности содержит большую часть информации о разности коэффициентов $k_2 - k_1$ (она определяется старшими сингулярными числами). При этом естественным образом возникает упорядоченность системы базисных функций. Поэтому для максимально возможного количества элементов системы $L$ строится оператор $M_L[k_0, k_0]$. Обозначим элементы его сингулярной структуры через $\{v_l(k_0, k_0)\}_{l=1}^{r(k_0,k_0)}$, $\{\sigma_l(k_0, k_0)\}_{l=1}^{r(k_0,k_0)}$, $\{u_l(k_0, k_0)\}_{l=1}^{r(k_0,k_0)}$. Количество $S(\varepsilon)$ рассматриваемых элементов базиса выберем равным максимальному $s$ такому, что для некоторого заданного $\varepsilon$ выполнено соотношение $\sigma_1(k_0, k_0)/\sigma_s(k_0, k_0) < \varepsilon$. Заметим, что $\sigma_1(k_0, k_0)/\sigma_s(k_0, k_0)$ аналогично числу обусловленности матрицы, характеризующей корректность решения линеаризованной матричной системы. В качестве ортонормированной системы для построения операторов чувствительности в последующих расчетах в качестве $L$ используем систему $\Sigma = \{u_l(k_0, k_0)\}_{l=1}^{S(\varepsilon)}$.

Кроме того, разложение Шмидта позволяет регуляризовать операцию обращения и получать $r$-решения [8]. Пусть $\{V_l\}_{l=1}^{S(\varepsilon)}$, $\{\theta_l\}_{l=1}^{S(\varepsilon)}$, $\{U_l\}_{l=1}^{S(\varepsilon)}$ — элементы разложения Шмидта оператора $M_\Sigma$, тогда можно определить $r$-псевдообратный оператор [9]

$$M_\Sigma^{-r}[k_2, k_1] := \sum_{l=1}^{r} \frac{V_l(k_2, k_1)}{\theta_l(k_2, k_1)} \langle U_l(k_2, k_1), . \rangle. \tag{28}$$

Пусть $\{1 \leqslant p_s \leqslant S(\varepsilon)\}_{s=1,..,N}$ — возрастающая последовательность натуральных чисел. Построим следующий итерационный алгоритм

с постепенным увеличением размерности $r$-псевдообратных операторов. При этом вместо неизвестного оператора $M_\Sigma[k_*, k_l]$ с точным значением неизвестного коэффициента $k_*$ будем рассматривать его аппроксимацию $M_\Sigma[k_l, k_l]$, получая метод, аналогичный методу Ньютона–Канторовича (см. (24)). Теоретическое исследование различных методов ньютоновского типа для нелинейных некорректных задач с абстрактными операторами можно найти в [18].

В предлагаемом алгоритме на внешней итерации $s = 1, \dots, N$ до стабилизации последовательности $k_l$ вычисляется выражение

$$k_{l+1} := k_l + M_\Sigma^{-p_s}[k_l, k_l]\,(\mathbf{I} - A(k_l)).$$

После стабилизации увеличиваем размерность до $p_{s+1}$ и т. д.

Для сравнения рассмотрим градиентный алгоритм решения задачи. В простейших методах градиентного типа выбирается начальное приближение $k_0$ и запускается итерационный процесс

$$k_{l+1} := k_l - \alpha_l \nabla J(k_l),$$

в котором $\alpha_l$ может быть постоянным (метод простой итерации или метод итераций Ландвебера, см., например, [7]). Однако такие алгоритмы в практических расчетах часто показывают медленную скорость сходимости по сравнению с методами наискорейшего спуска, когда $\alpha_l$ выбирается исходя из одномерной задачи минимизации $J(k_l - \alpha_l \nabla J(k_l)) \to \min\limits_{\alpha_l}$, или методами типа сопряженных градиентов, поэтому на практике часто используются именно эти группы методов [4]. В численных экспериментах мы использовали модификацию метода сопряженных градиентов Флетчера–Ривса:

$$k_{l+1} := k_l - \alpha_l s_l, \quad \alpha_l = \operatorname*{argmin}_{\alpha>0} J(k_l - \alpha s_l),$$

$$s_l = \begin{cases} g_l + \beta_l s_{l-1}, & l > 1, \\ g_l, & l = 1, \end{cases}$$

$$g_l = -\nabla J(k_l), \quad \beta_l = \frac{\langle g_l, g_l \rangle}{\langle g_{l-1}, g_{l-1} \rangle}.$$

Для уменьшения ошибок реализации в расчетах использован алгоритм сопряженных градиентов Флетчера–Ривса, представленный в свободно распространяемой библиотеке GSL [19].

Для численной реализации прямых и сопряженных задач в двумерном случае использована схема расщепления. Для аппроксимации дифференциальных операторов использованы разностные схемы. При этом схемы решения дискретных прямых и сопряженных задач строились таким образом, чтобы для них выполнялись дискретные аналоги (13).

При решении обратной задачи можно применять различную априорную информацию. В частности, информацию о форме образца, что позволяет ограничить поиск коэффициента только его внутренней областью. Это требует предварительного сканирования формы образца, поэтому было решено отказаться от этого типа априорной информации. В данной работе использован подход к уменьшению неопределенности, когда искомый коэффициент разыскивается не на основной расчетной пространственной сетке, а на некоторой более грубой сетке, как это делается в [16]. Это связано с тем, что информация высокой пространственной детализации часто теряется при решении обратной задачи.

Проанализируем возможности распараллеливания обоих алгоритмов. Градиентный алгоритм требует последовательного решения прямых и сопряженных задач. При вычислении оператора чувствительности требуется решить семейство сопряженных задач, однако они могут решаться параллельно, однотипны и отличаются только значениями функции $p_m$, стоящими в правых частях соответствующих численных схем. Поэтому вычисление оператора чувствительности хорошо поддается распараллеливанию. Следовательно, самые затратные по времени операции — это построение $r$-псевдообратных матриц оператора чувствительности. Оба алгоритма допускают распараллеливание на уровне схем расщепления при решении прямых и сопряженных задач.

### Результаты численных экспериментов

Параметры сеточных областей для численных экспериментов:

$$X = Y = 0{,}02, \quad T = 6000,$$
$$N_x = N_y = 50, \quad N_t = 60,$$
$$N_{cx} = N_{cy} = 25,$$

где $N_x = N_y$, $N_t$ — число узлов равномерных расчетных сеток по пространству и времени соответственно; $N_{cx} = N_{cy}$ — число узлов равномерных пространственных сеток, в ячейках которых предполагается постоянным разыскиваемый коэффициент.

Для примера в качестве «точного решения» $k_*$ возьмем коэффициент диффузии, представленный на рис. 7.3, *а*. В качестве априорного начального приближения $k_0$ — коэффициент, соответствующий однородному образцу рис. 7.3, *б*.

Расчеты проводились на ПЭВМ с восьмиядерным процессором с частотой 3,40 ГГц и 32 Гб оперативной памяти.

**4. Решение прямой задачи.** Сначала рассмотрим решение прямой задачи. Динамика изменения полей концентраций диффундирующего

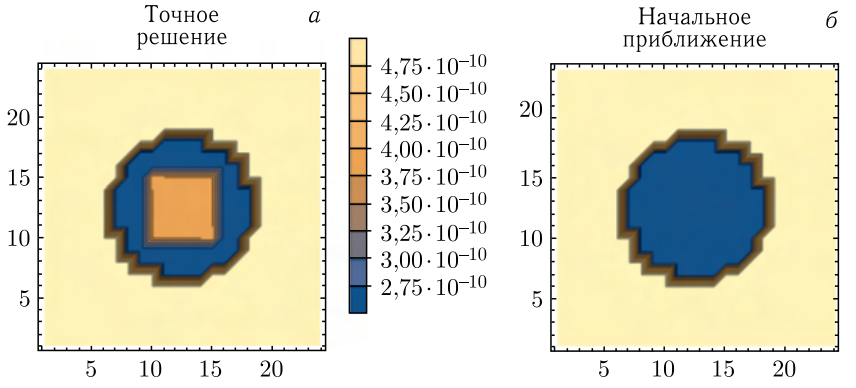


Рис. 7.3. Коэффициенты диффузии: точное решение (*а*), начальное приближение (*б*)

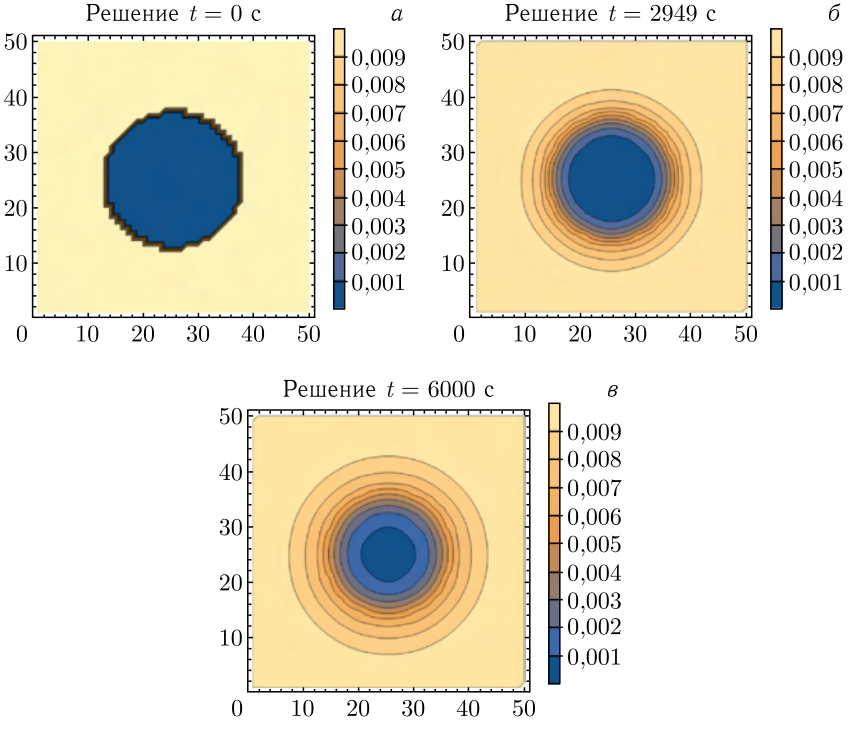


Рис. 7.4. Решение прямой задачи. Поле концентраций во времени для начального момента времени (*а*), для середины временного интервала (*б*) и для финального момента (*в*)

вещества представлена на рис. 7.4 для разных моментов времени. Для восстановления коэффициентов диффузии воспользуемся этими тремя снимками. Можно отметить сглаживающий характер процесса по мере того, как раствор проникает в образец.

**5. Сравнение с градиентным алгоритмом.** Сравним решение, полученное разрабатываемым алгоритмом на основе $r$-псевдообратных операторов (SVD), с решением, полученным градиентным алгоритмом. Здесь и далее параметры алгоритма SVD: $P = Q = 15$, $\varepsilon = 10^{10}$, количество последовательных отрезков спектра $N = 10$, в каждом отрезке разбиения спектра равное количество элементов. На рис. 7.5 представлены точное решение и результаты восстановления коэффициента диффузии, полученные изучаемыми алгоритмами.

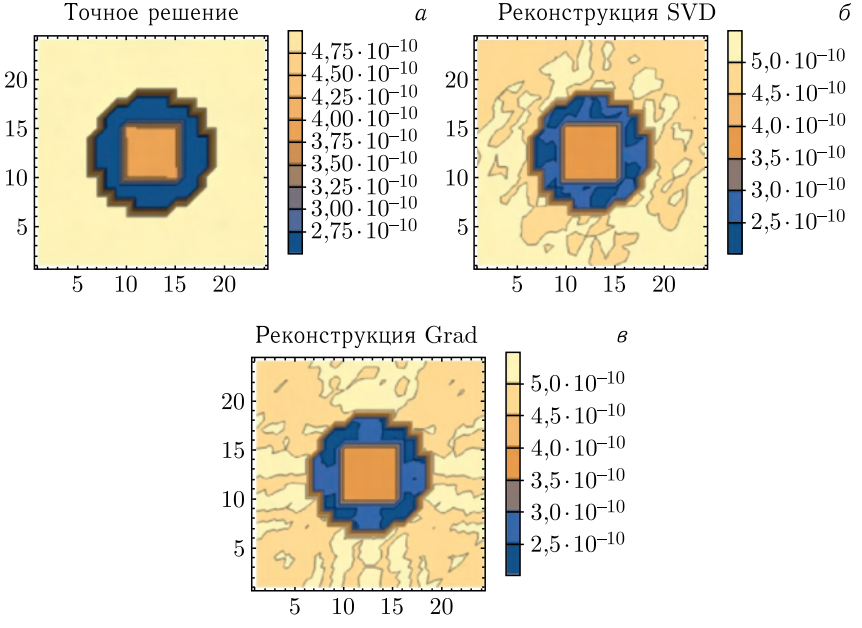


Рис. 7.5. Сравнение решений: «точного» (*а*), на основе $r$-псевдообратных операторов (SVD) (*б*), градиентного алгоритма (Grad) (*в*)

На рис. 7.6 представлено поведение относительных невязок и ошибок обоих алгоритмов в зависимости от времени счета в одних и тех же условиях. То, что итерации алгоритма на основе $r$-псевдообратных операторов (SVD) начинаются с некоторого времени, объясняется тем, что сначала идет подготовка информативного базиса.

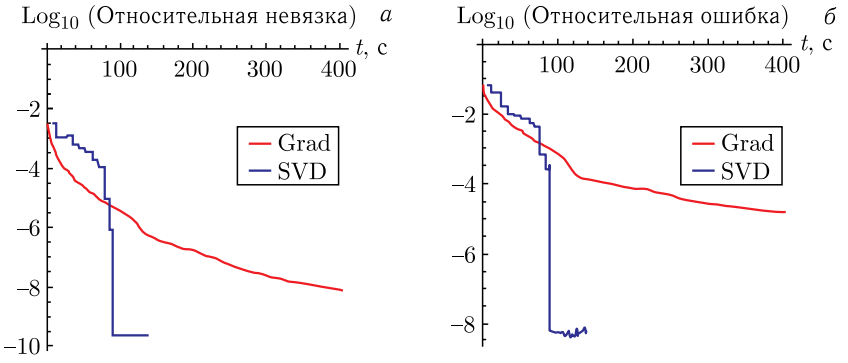


Рис. 7.6. Сравнение сходимости алгоритма на основе $r$-псевдообратных операторов (SVD) и градиентного алгоритма (Grad). Убывание относительной невязки (*а*) и убывание относительной ошибки (*б*)

Заметим, что результат получен для сеток небольшой размерности. Для построения сингулярного разложения используется модифицированный алгоритм Голуба–Райнша, реализованный в библиотеке GSL [19]. Для эффективной работы SVD алгоритма с большими сетками потребуется привлечение параллельных процедур сингулярного разложения.

Таким образом, можно заключить, что в проведенных численных экспериментах разрабатываемый алгоритм оказался эффективнее оптимизационного алгоритма, основанного на стандартных процедурах.

**6. Влияние шума в данных.** Для алгоритмов решения обратных и некорректных задач важнейшим вопросом является чувствительность решения к погрешностям данных измерений. На рис. 7.7 приводится аналог рис. 3 с добавлением $10\,\%$ шума.

Зашумленные данные измерений рассчитываются по формуле:

$$I_m(x_i, y_j) = (1 + \sigma\xi)\varphi(x_i, y_j, t_m; k_*),$$

$$\delta I_m(x_i, y_j) = \sigma\xi\varphi(x_i, y_j, t_m; k_*),$$

$$i = 1, \dots, N_x, \quad j = 1, \dots, N_y, \quad m = 1, \dots, M,$$

где $x_i$, $y_j$ — координаты точек расчетной сетки; $\sigma > 0$ — параметр, определяющий величину шума, а $\xi$ — нормально распределенная случайная величина с нулевым средним и единичной дисперсией.

Изучим, как в численном эксперименте ведут себя характеристики сходимости алгоритма: относительная ошибка, соотношение сингулярных чисел, относительная норма проекции невязки на информативный базис, относительная норма невязки.

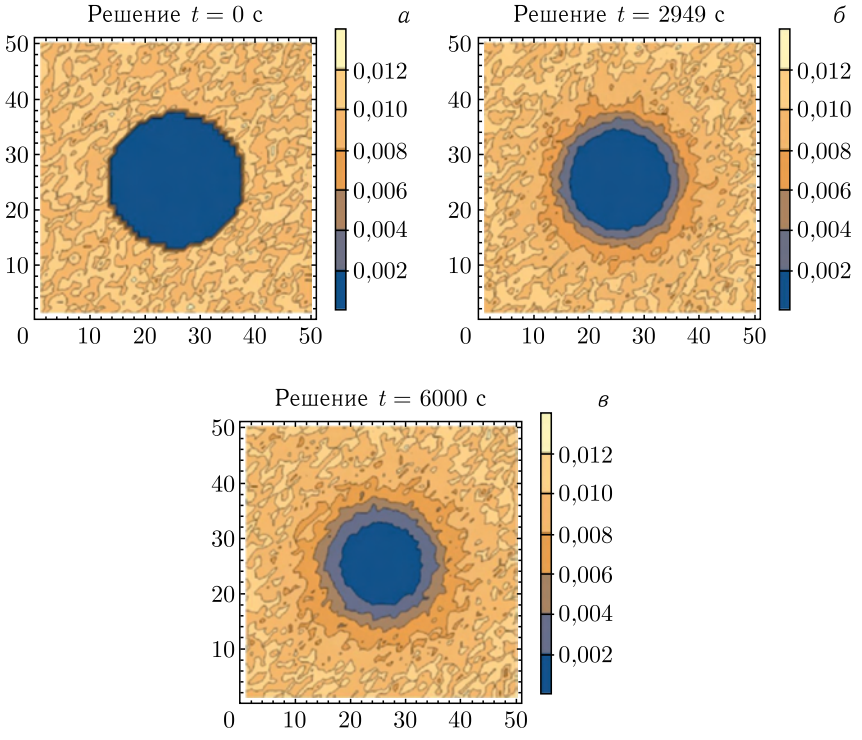


Рис. 7.7. Решение прямой задачи с добавлением 10 % шума. Поле концентраций во времени для начального момента времени (*а*), для середины временного интервала (*б*) и для финального момента (*в*)

На рис. 7.8, *в* можно отметить, что поведение нормы проекции невязки монотонное. При этом ошибка (рис. 7.8, *а*) сначала убывает, а затем начинает возрастать. Этот момент совпадает с пресечением нормы проекции невязки уровня проекции шума в данных, т. е. когда впервые выполняется соотношение

$$\|Pr_L(\mathbf{I} - A(k_l))\| \leqslant \|Pr_L \delta\mathbf{I}\|. \tag{29}$$

На рис. 7.9–7.11 представлено, как соотносятся результаты при использовании остановки по принципу невязки, то есть на итерации, когда впервые выполняется условие (29), и без нее. В последнем случае остановка осуществлялась при появлении отрицательных значений коэффициента или при достижении размерности $S(\varepsilon)$.

Можно отметить, что чем меньше шум в данных, тем лучше качество восстановления при использовании правила остановки. Возникает

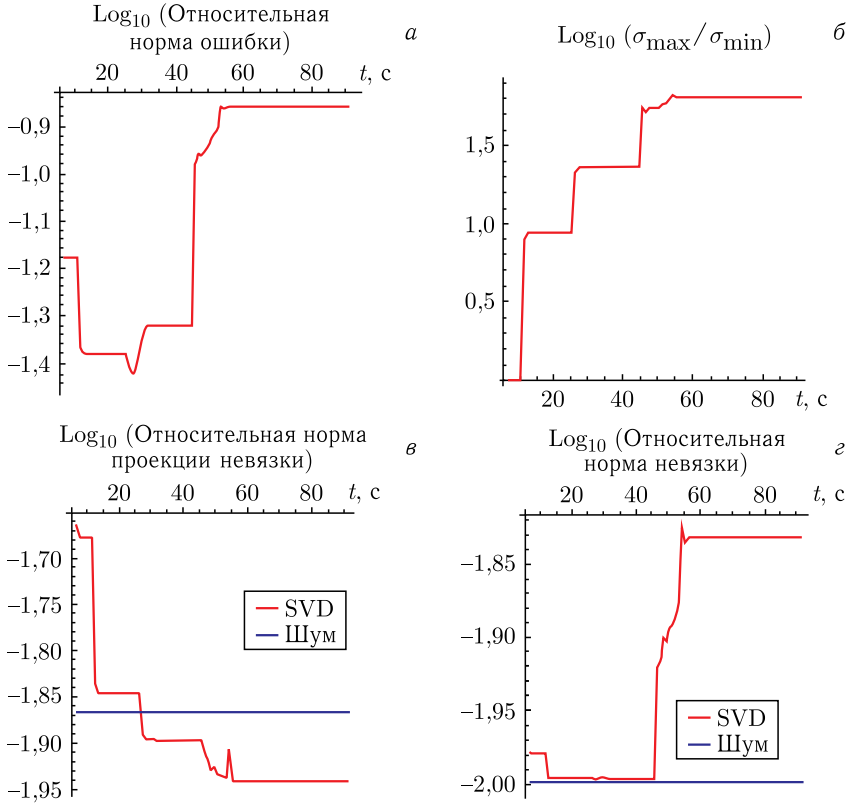


Рис. 7.8. Параметры сходимости при 1 % шума: *а*) относительная ошибка, *б*) соотношение сингулярных чисел, *в*) относительная норма проекции невязки на информативный базис, *г*) относительная норма невязки

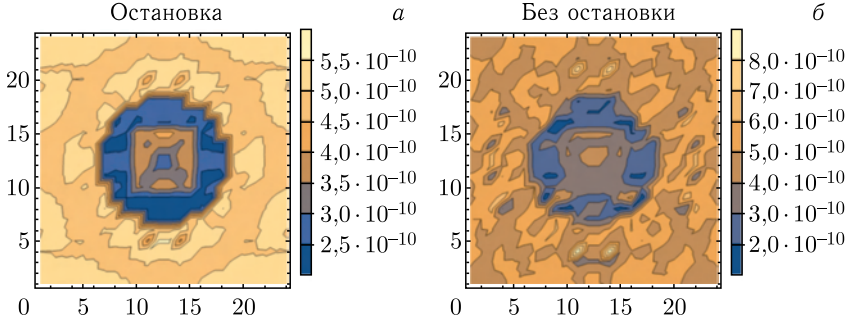


Рис. 7.9. Восстановление с остановкой по принципу невязки (*а*) и без нее (*б*) при 1 % шума

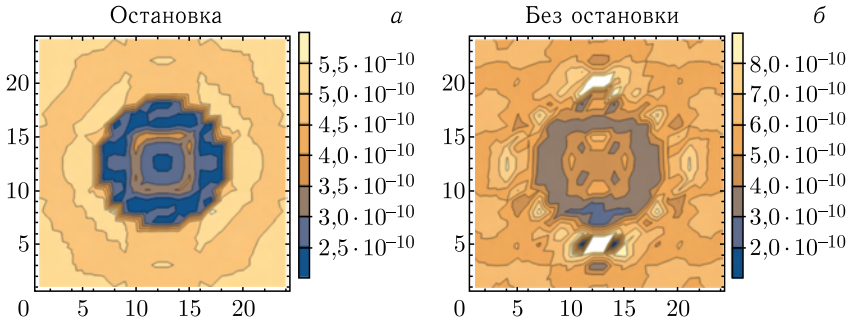


Рис. 7.10. Восстановление с остановкой по принципу невязки (*а*) и без нее (*б*) при 4 % шума

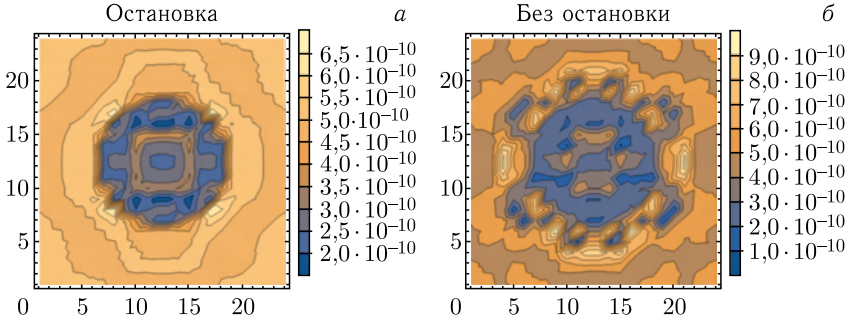


Рис. 7.11. Восстановление с остановкой по принципу невязки (*а*) и без нее (*б*) при 10 % шума

вопрос, как оценить эту ошибку. Она не превосходит ошибки в исходных данных, однако вопрос ее оценки — важное направление для последующей работы. Например, зная статистические характеристики шума, можно попытаться оценить данное значение методом Монте-Карло. На этапе выбора информативного базиса и элементов данных происходит фильтрация шума. С другой стороны, при увеличении количества рассматриваемых элементов базиса проекция невязки на него стремится к исходной невязке.

**7. Спектр оператора чувствительности.** Сопоставим, как соотносятся спектр операторов чувствительности и результаты восстановления коэффициента диффузии. Для этого рассмотрим вариант, когда отрезок времени измерения уменьшен в 10 раз и раствор «не успевает» проникнуть в образец в достаточном количестве ко времени получения последнего снимка поля концентрации (рис. 7.12).

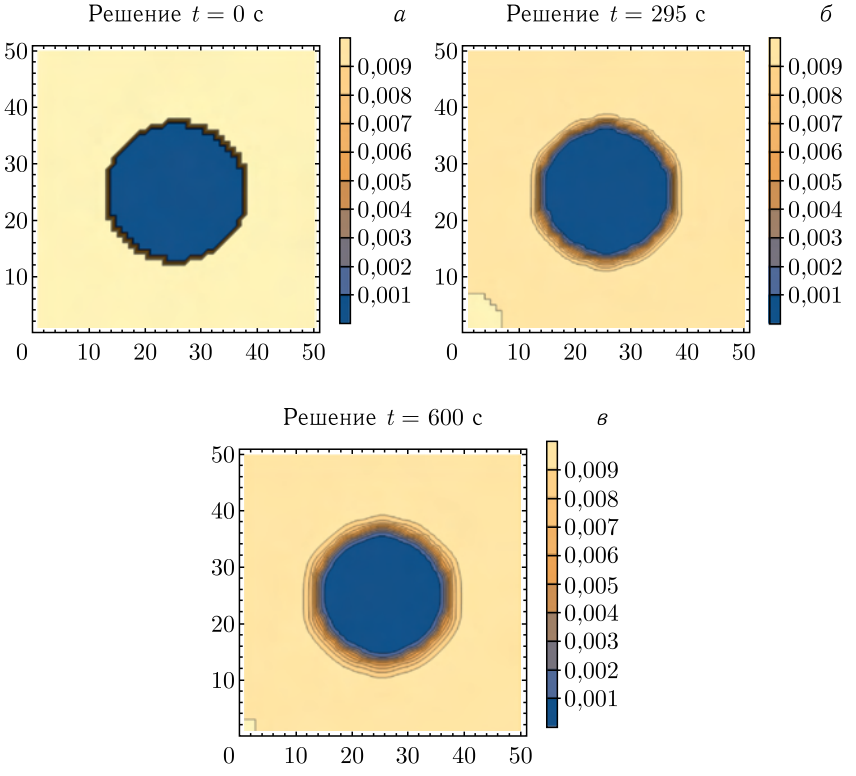


Рис. 7.12. Решение прямой задачи при длительности эксперимента $T = 600$ с. Поле концентраций во времени (*а*) для начального момента времени, для середины временного интервала (*б*) и для финального момента (*в*)

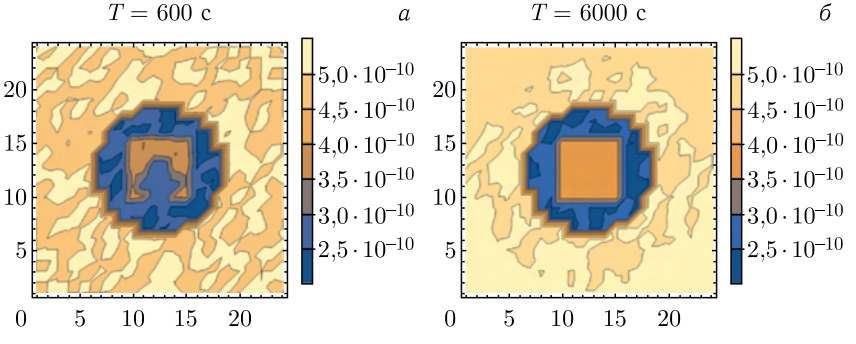


Рис. 7.13. Восстановление при различной длительности эксперимента $T = 600$ с (*а*) и $T = 6000$ с (*б*)

Убывание сингулярного спектра является характеристикой линейной задачи, однако его можно использовать и при сведении нелинейной обратной задачи к квазилинейной форме для анализа разнообразных постановок.

На рис. 7.13 представлены результаты восстановления коэффициента диффузии. Заметим, что внутренняя часть образца восстанавливается хуже.

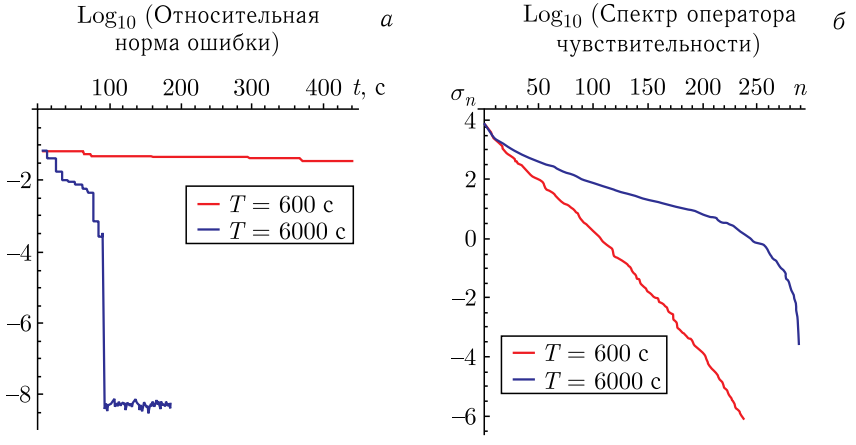


Рис. 7.14. Сопоставление убывания относительной ошибки решения (*а*) и сингулярных спектров операторов чувствительности (*б*) при различной длительности эксперимента: $T = 600$ с (*а*) и $T = 6000$ с (*б*)

На рис. 7.14 представлено поведение относительной ошибки решения обратной задачи в зависимости от номера итерации и сингулярные спектры операторов чувствительности. Можно отметить, что для большего временного интервала характерны как более быстрая сходимость итераций алгоритма, так и более медленное убывание сингулярного спектра оператора чувствительности.

## Заключение

В работе представлен алгоритм решения задачи о поиске коэффициента диффузии на основе набора изображений полей концентрации диффундирующего вещества в последовательные моменты времени. С помощью оператора чувствительности, обобщающего понятие функций чувствительности, нелинейная коэффициентная обратная задача сведена к квазилинейному уравнению. Полученное уравнение решается последовательным построением $r$-решений с увеличивающимся количеством рассматриваемых сингулярных векторов этого оператора

($r$-псевдообратных к оператору чувствительности увеличивающейся размерности). Перед применением разработанного алгоритма для уменьшения размерности входных данных была использована их проекция на подпространство, определенное заданным количеством левых сингулярных векторов оператора чувствительности.

В проведенных численных экспериментах алгоритм показал более высокую эффективность по сравнению с градиентным оптимизационным алгоритмом. При добавлении шума к данным измерений важным оказалось использование остановки по принципу невязки.

Рассмотренная постановка задачи адекватна в случае, когда диффузия является скорость-определяющим процессом при распространении вещества (частиц) по образцу. В настоящее время в развитие данной работы создается алгоритм для оценки коэффициентов модели диффузии с обратимой адсорбцией. По нашему мнению, с методической точки зрения данная работа может быть полезной и при изучении транспортных свойств тканей *in vivo*.

## Список литературы

1. *Murphy S.V.*, *Atala A.* Organ engineering — combining stem cells, biomaterials, and bioreactors to produce bioengineered organs for transplantation // Bioessays. 2012. V. 35. P. 163–172. doi: 10.1002/bies. 201200062

2. *Kirilova I.A.*, *Sharkeev Yu.P.*, *Nikolaev S.V.*, *Podorozhnaya V.T.*, *Uvarkin P.V.*, *Ratushnyak A.S.*, *Chebodaeva V.V.* Physicomechanical properties of the extracellular matrix of a demineralized bone // AIP Conf. Proc. 2016. V. 1760. P. 020027-1–020027-7. doi: 10.1063/1.4960246

3. *Penenko V.V.* Metody chislennogo modelirovaniia atmosfernykh protsessov (Methods of numerical modeling of atmospheric processes). Leningrad, 1981. 352 p. (in Russ.)

4. *Alifanov O.M.*, *Artiukhin E.A.*, *Rumiantsev S.V.* Ekstremal'nye metody resheniia nekorrektnykh zadach (Extreme methods for solving ill-posed problems). Moscow, 1988. 288 p. (in Russ.)

5. *Vasil'ev F.P.* Chislennye metody resheniia ekstremal'nykh zadach (Numerical methods for solving extreme problems). Moscow, 1988. 550 p. (in Russ.)

6. *Kabanikhin S.I.*, *Hasanov A.*, *Penenko A.V.* The gradient-based method for solving the inverse coefficient heat-conduction problem // Numerical Analysis and Applications. 2008. V. 1, No 1. P. 34–45. doi: 10.1134/S1995423908010047

7. *Scherzer O.*, *Grasmair M.*, *Grossauer H.*, *Haltmeier M.*, *Lenzen F.* Variational Methods in Imaging. Applied Mathematical Sciences. New York: Springer, 2009. 320 p.

8. *Godunov S.K.*, *Antonov A.G.*, *Kiriliuk O.P.*, *Kostin V.I.* Garantirovannaia tochnost' resheniia sistem lineinykh uravnenii v evklidovykh prostranstvakh (Guaranteed accuracy of solving systems of linear equations in Euclidean spaces). Novosibirsk, 1992. 360 p. (in Russ.)
9. *Cheverda V.A.*, *Kostin V.I.* R-pseudoinverse for compact operators in Hilbert space: existence and stability // J. Inverse and Ill-Posed Problems. 1995. V. 3, No 2. P. 131–148. doi: 10.1515/jiip.1995.3.2.131
10. *Gol'dman N.L.* Inverse problems with final overdetermination for parabolic equations with unknown coefficients multiplying the highest derivative // Dokl. Mathem. 2011. V. 83, No 3. P. 316–320. doi: 10.1134/S1064562411030136
11. *Marchuk G.I.* Formulations of some inverse problems // Dokl. Akad. Nauk SSSR. 1964. V. 156, No 3. P. 503–506 (in Russ.).
12. *Marchuk G.I.* Chislennoe reshenie zadach dinamiki atmosfery i okeana (Numerical solutions for the dynamic problems of atmosphere and ocean). Leningrad, 1974 (in Russ.).
13. *Penenko V.V.* // Nekotorye problemy vychislitel'noi i prikladnoi matematiki (Some Problems of Computational and Applied Mathematics) / Ed. M.M. Lavrent'ev. Novosibirsk, 1975. P. 61–77 (in Russ.).
14. *Penenko A.V.* // Sibirskie elektronnye matematicheskie izvestiia. Trudy pervoi mezhdunarodnoi molodezhnoi shkoly-konferentsii «Teoriia i chislennye metody resheniia obratnykh i nekorrektnykh zadach» (Siberian Electronic Mathematical Reports: Proceedings of the First International Youth School-Conference «Theory and Computational Methods for Inverse and ill-posed problems»). Part I / Ed. S.I. Kabanikhin. Novosibirsk, 2010. P. 178–198 (in Russ.).
15. *Penenko A.V.* // Sibirskie elektronnye matematicheskie izvestiia. Trudy vtoroi mezhdunarodnoi molodezhnoi shkoly-konferentsii «Teoriia i chislennye metody resheniia obratnykh i nekorrektnykh zadach» (Siberian Electronic Mathematical Reports: Proceedings of the First International Youth School-Conference «Theory and Computational Methods for Inverse and ill-posed problems»). Part II. Ed. S.I. Kabanikhin. Novosibirsk, 2010. P. 320–339 (in Russ.).
16. *Hasanov A.*, *DuChateau P.*, *Pektas B.* An adjoint problem approach and coarse-fine mesh method for identification of the diffusion coefficient in a linear parabolic equation // J. Inverse and Ill-Posed Problems. 2006. V. 14, No 5. P. 435–463. doi: 10.1515/156939406778247615
17. *Gokhberg I.Ts.*, *Krein M.G.* Vvedenie v teoriiu lineinykh nesamosopriazhennykh operatorov (Introduction to the theory of linear non-selfadjoint operators). Moscow, 1965. 448 p. (in Russ.).
18. *Kaltenbacher B.* Some Newton-type methods for the regularization of nonlinear ill-posed problems // Inverse Problems. 1997. V. 13, No 3. P. 729–753. doi: 10.1088/0266-5611/13/3/012

## Приложение

**Доказательство теоремы 1.** Рассмотрим разность уравнений (1)–(3), соответствующих коэффициентам $k_2, k_1 \in K$:

$$\varphi_t(x,t;k_2) - \varphi_t(x,t;k_1) = \\ = \nabla \cdot (k_2(x)\nabla\varphi(x,t;k_2) - k_1(x)\nabla\varphi(x,t;k_1)), \quad (30)$$

$$(x,) \in \partial\Omega \times [0,T],$$

$$\varphi(x,t;k_2) - \varphi(x,t;k_1) = 0, \quad (x,t) \in \partial\Omega \times [0,T], \quad (31)$$

$$\varphi(x,0;k_2) - \varphi(x,0;k_1) = 0, \quad x \in \Omega. \quad (32)$$

С учетом краевых условий (31) и предположения (10) получим

$$\int\limits_\Omega \nabla \cdot (k_2(x)\nabla\varphi(xt;k_2) - k_1(x)\nabla\varphi(x,t;k_1))\,\psi(x,t)dx = \\ = -\int\limits_\Omega (k_2(x) - k_1(x))\,\nabla\varphi(x,t;k_2)\cdot\nabla\psi(x,t)dx + \\ + \int\limits_\Omega (\varphi(x,t;k_2) - \varphi(x,t;k_1))\,\nabla\cdot(k_1\nabla\psi(x,t))dx.$$

Разобьем временной интервал $[0,T]$ моментами получения снимков $\{t_m\}_{m=0}^M$ полей концентрации и учтем начальные условия (32):

$$\int\limits_{\Omega_t} (\varphi_t(x,t;k_2) - \varphi_t(x,t;k_1))\,\psi(x,t)dx\,dt = \\ \int\limits_\Omega (\varphi(x,T;k_2) - \varphi(x,T;k_1))\,\psi(x,T-)dx - \\ - \sum_{m=1}^{M-1} \int\limits_\Omega [(\varphi(x,t;k_2) - \varphi(x,t;k_1))\,\psi(x,t)]_{t=t_m}\,dx - \\ - \int\limits_{\Omega_t} (\varphi(x,t;k_2) - \varphi(x,t;k_1))\,\psi_t(x,t)dx\,dt.$$

В силу непрерывности решения прямой задачи по времени

$$[(\varphi(x,t;k_2) - \varphi(x,t;k_1))\,\psi(x,t)]_{t=t_m} = \\ = (\varphi(x,t_m;k_2) - \varphi(x,t_m;k_1))\,[\psi(x,t)]_{t=t_m}$$

или

$$\int\limits_{\Omega_t} \left(\varphi_t(x,t;k_2) - \varphi_t(x,t;k_1)\right)\psi(x,t)dx\,dt =$$

$$= \int\limits_{\Omega} \left(\varphi(x,T;k_2) - \varphi(x,T;k_1)\right)\psi(x,T-)dx -$$

$$- \sum_{m=1}^{M-1} \int\limits_{\Omega} \left(\varphi(x,t_m;k_2) - \varphi(x,t_m;k_1)\right)\left[\psi(x,t)\right]_{t=t_m} dx -$$

$$- \int\limits_{\Omega_t} \left(\varphi(x,t;k_2) - \varphi(x,t;k_1)\right)\psi_t(x,t)dx\,dt.$$

Собирая, получаем тождество

$$\int\limits_{\Omega} \left(\varphi(x,T;k_2) - \varphi(x,T;k_1)\right)\psi(x,T-)dx -$$

$$- \sum_{m=1}^{M-1} \int\limits_{\Omega} \left(\varphi(x,t_m;k_2) - \varphi(x,t_m;k_1)\right)\left[\psi(x,t)\right]_{t=t_m} dx -$$

$$- \int\limits_{\Omega_t} \left(\varphi(x,t;k_2) - \varphi(x,t;k_1)\right)\psi_t(x,t)dx\,dt =$$

$$= - \int\limits_{\Omega_t} \left(k_2(x) - k_1(x)\right)\nabla\varphi(x,t;k_2)\cdot\nabla\psi(x,t)dx\,dt +$$

$$+ \int\limits_{\Omega_t} \left(\varphi(x,t;k_2) - \varphi(x,t;k_1)\right)\nabla\cdot\left(k_1(x)\nabla\psi(x,t)\right)dx\,dt.$$

Пусть $\psi(xt)$ удовлетворяет соотношениям (9)–(12), тогда получим тождество (13).

Распишем вариацию

$$J(k+\delta k) - J(k) =$$

$$= \sum_{m=1}^{M} \int\limits_{\Omega} \left(\left(\varphi(x,t_m;k+\delta k) - I_m\right)^2 - \left(\varphi(x,t_m;k) - I_m\right)^2\right)dx =$$

$$= \sum_{m=1}^{M} \int\limits_{\Omega} \left(\varphi(x,t_m;k+\delta k) - \varphi(x,t_m;k)\right)2\left(\varphi(x,t_m;k) - I_m\right)dx +$$

$$+ \sum_{m=1}^{M} \int\limits_{\Omega} \left(\varphi(x,t_m;k+\delta k) - \varphi(x,t_m;k)\right)^2 dx,$$

воспользуемся тождеством (13) и получим выражение (15).

# 8. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ КОСТНОГО МОЗГА ПАЦИЕНТОВ С ОРТОПЕДИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

*Н.М. Астахова, А.В. Корель, К.Е. Орищенко, Я.Р. Ефремов, Г.А. Кудров, С.В. Николаев, И.А. Кирилова*

Сибирский научный медицинский журнал. 2018. Т. 38, № 1. С. 38–46

В статье приведены данные по культивированию и характеристике мезенхимальных стромальных клеток (МСК), выделенных из костного мозга пациентов с диспластическим коксартрозом. Во фракции адгезивных МСК из обоих образцов костного мозга выявлено несколько морфологических фенотипов: веретенообразные удлиненные клетки, большие уплощенные клетки и тонкие звездчатые клетки. Иммунофенотипический анализ показал, что по характеру и уровню экспрессии поверхностных антигенов (CD90, CD73, CD105, CD45 и CD34) клетки представляют собой популяции МСК. Использование для культивирования МСК человека новой ростовой среды, не содержащей компонентов животного происхождения, позволяет МСК достигать конфлюэнтности на 16–18 день инкубации, без замедления пролиферативной активности клеток и без потери способности к дифференцировке в хондро- и остеогенные типы тканей. Мультипотентность МСК подтверждена остеогенной дифференцировкой клеток при их длительном культивировании в соответствующей индукционной среде *in vitro*. Дифференцировку МСК в остеобласты подтверждали иммуноцитохимическим окрашиванием на щелочную фосфатазу и ализариновым красным. Впервые определены такие характеристики МСК человека, как митотический индекс, траектории и средняя скорость движения клеток на культуральном пластике. Митотический индекс активно пролиферирующих МСК составил от 2,7 до 3,4 % от общего количества клеток, двигательная активность (скорость миграции) — 38–42 мкм/ч. Таким образом, аспират костного мозга от пациентов с ортопедической патологией является источником МСК, которые удовлетворяют критериям, определенным Международным обществом клеточной терапии, и могут быть использованы в регенеративной терапии костной ткани.

## 8. CULTIVATION AND CHARACTERISTICS OF MESENCHyMAL STEM CELLS FROM THE BONE MARROW OF THE PATIENTS WITH ORTHOPEDIC PATHOLOGY

*N.M. Astakhova, A.V. Korel, K.E. Orishchenko, Y.R. Efremov, G.A. Kudrov, S.V. Nikolaev, I.A. Kirilova*

The article presents data on the cultivation and characteristics of mesenchymal stem cells (MSC) isolated from the bone marrow of patients with dysplastic coxarthrosis. Several morphological phenotypes were found in the fraction of adhesive MSC: spindle-shaped elongated cells, large flattened cells, and thin stellate cells in both samples of bone marrow. Immunophenotypic analysis showed that cells express surface antigens (CD90, CD73, CD105, CD45 and CD34), which are characteristic for typical stem cells. It was shown that the use of a new growth medium containing no components of animal origin for the cultivation of human MSC allowed to achieve confluence of the cell culture on the 16th–8th day of incubation without delaying the proliferative activity of the cells and without loss of ability to differentiate into chondro- and osteogenic types of tissues. Multipotency of MSC was confirmed by osteogenic and chondrogenic differentiation of cells, during prolonged cultivation of MSCs in induction media *in vitro*. The differentiation of MSC into osteoblasts was confirmed by immunocytochemical staining for alkaline phosphatase and alizarin red S. For the first time, such characteristics of human MSC as: mitotic index, trajectory of cells migration and average speed of migration on culture plastics were determined. The mitotic index of actively proliferating MSC was from 2.7 to 3.4% of the total cell number. The moving activity (speed of cell migration) was 38–42 $\mu$m/h. Thus, bone marrow aspirate from patients with orthopedic pathology is the source of stem cells that meet all the criteria for MSC as determined by the International Society of Cellular Therapy and can be used in regenerative therapy of bone.

Одной из главных проблем травматологии, ортопедии опорно-двигательного аппарата остается замещение дефектов костной ткани. В настоящее время широкое распространение получили методы клеточной терапии, основанные на применении остеогенных клеток, дифференцированных из мезенхимальных стромальных клеток (МСК), полученных из различных тканевых источников: костного мозга, жировой ткани, пульпы зуба, периферической крови и т. д. [7, 11, 13–15]. Одним из требований к пластическому материалу является тканеспецифичность, отсутствие токсичности, высокий регенераторный потенциал и формирование органоспецифической костной ткани в зоне трансплантации. Чтобы обеспечить запросы практической хирургии, необходимы биоинженерные конструкции, пригодные для замещения костных дефектов, характеризующиеся следующими свойствами: сохранение физических и анатомических особенностей кости, высокая прочность, быстрая

фиксация в зоне имплантации и замещение тканью реципиента, отсутствие реакции отторжения имплантата.

Главная стратегия тканевого инжиниринга заключается в следующем: 1) выделение МСК и их пролиферация *in vitro*; 2) заселение на трехмерный скаффолд и 3) имплантация скаффолда в очаг повреждения [10, 17]. Внедрение этой стратегии в медицинскую практику требует проведения дополнительной хирургической процедуры и временных затрат, которые необходимы для создания костного трансплантата *in vitro*. Костный мозг является резервуаром МСК для ряда соединительных тканей, которые могут дифференцироваться в остеогенные, хондрогенные и жировые клетки [5, 6].

В условиях хирургического стационара травматолого-ортопедического профиля использование такого ресурса, как резецированные при первичном эндопротезировании полусуставы, представляется целесообразным. Поскольку объем первичных операций постоянно растет, то ограничений в источнике костного мозга, при согласии пациента, нет. А увеличение ревизионных операций, связанных с дефицитом костной ткани, формирует запрос клиницистов на тканеинженерные конструкции, обладающие высокими прочностными свойствами.

Как первый шаг в создании подобных конструкций нами выполнены забор костного мозга у двух пациентов, выделение МСК, культивирование и описание их характеристик. В нашем эксперименте МСК из аспиратов костного мозга служили источником остеогенных и хондрогенных клеток человека, которые в дальнейшем предполагается использовать для заселения трехмерных имплантатов («скаффолдов») с перспективой использования для восстановления костной и хрящевой тканей. Дифференцировка этих клеток проводилась *in vitro* путем изменения условий культивирования в процессе роста. Ее можно также инициировать, обеспечивая новое физиологическое микроокружение в области трансплантации *in vitro* [8]. Кроме того, в ряде работ было показано, что жесткость субстрата и топография поверхности «скаффолда», а также биомеханические воздействия на трехмерные каркасы значительно влияют на развитие тканей, морфогенез, патогенез и заживление, особенно в ортопедических тканях. Такие биологические процессы критически связаны с дифференцировкой МСК человека. Текущие исследования предполагают использование различных факторов для контроля процесса дифференцировки МСК и ускорения процесса создания трехмерных тканеинженерных конструкций [12, 18].

Пролиферация МСК, выделенных из клеточного аспирата костного мозга, зависит от объема, техники выделения и культивирования клеток.

В связи с новыми международными требованиями к культивированию МСК пациентов *in vitro* без реагентов животного происхождения была использована усовершенствованная бессывороточная питательная среда. Исследовали следующие характеристики выделенных МСК: адгезия, экспрессия специфических CD-маркеров, сохранение мультипотентности, дифференцировка, пролиферативный потенциал (митотический индекс), двигательная активность (скорость миграции). Изучение динамических характеристик МСК и подбор оптимальных условий культивирования позволят разработать стандартные подходы для новых технологий получения индивидуальных тканеинженерных конструкций в регенеративной медицине.

## Материалы и методы

**Мезенхимальные стволовые клетки** человека были выделены из аспиратов костного мозга резецированных головок бедренных костей пациентов с диспластическим коксартрозом при операции первичного эндопротезирования тазобедренных суставов в ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России. В экспериментах были использованы МСК от двух доноров (женщины, возраст 37 лет и 41 год), с общим числом пассажей от 0 до 4. МСК пациенток удовлетворяли критериям, определенным Комитетом международного общества по клеточной терапии. Минимальный набор стандартных критериев для определения МСК человека следующий: во-первых, они должны быть пластик-адгезивными при культивировании в стандартных условиях; во-вторых, должны экспрессировать CD105, CD73 и CD90 и быть негативными по поверхностным антигенам CD45, CD34, CD14 или CD11b, CD79a или CD19, HLA-DR; в-третьих, должны дифференцироваться в остеобласты, адипоциты или хондробласты при культивировании *in vitro* в индукционных средах [9, 12].

Настоящее исследование соответствует этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 № 266. Работа получила одобрение локального этического комитета Новосибирского НИИ им. Я.Л. Цивьяна Минздрава России (выписка из протокола № 011/16 от 04.10.2016). Все лица дали информированное согласие на участие в исследовании.

**Выделение и культивирование.** Аспираты костного мозга, полученные при хирургической операции в стерильных условиях,

промывали модифицированной по Дульбекко средой Игла (Sigma, США) с добавлением 100 Ед/мл пенициллина и стрептомицина, 2,5 мкг/мл фунгизона (Life Technologies, США), процеживали через нейлоновое сито с диаметром пор 100 мкм. Суспензию клеток костного мозга разводили в соотношении 1 : 2 0,9 %-м NaCl, наслаивали на градиент плотности PANcoll (PAN biotech, Германия) ($d = 1{,}077$ г/мл) и центрифугировали при 1300 g течение 15 мин [1, 2]. Ядросодержащие клетки переносили в отдельную пробирку, отмывали от PANcoll центрифугированием при 1500 g в течение 15 мин в бессывороточной среде DMEM с добавлением 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2,5 мкг/мл фунгизона. Надосадочную жидкость удаляли, осадок клеток ресуспендировали в ростовой среде и переносили культуральные флаконы с поверхностью роста клеток 25 $см^2$ или в чашки Петри с поверхностью роста клеток 10 $см^2$ (Techno Plastic Products AG, Швейцария). Культивирование клеток с нулевого пассажа проводили в специальной бессывороточной ростовой среде PowerStem MSC1 (PAN biotech), содержащей 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2,5 мг/мл фунгизона, при 37 °C в $CO_2$-инкубаторе (5 % концентрации $CO_2$). Через 48 ч после посева первичной культуры клетки, не прикрепившиеся к пластику, удаляли путем смены среды. Фракцию адгезивных МСК культивировали до образования 80–90 % конфлюэнтного монослоя, среду заменяли каждые 3–4 дня. Клетки 0–4 пассажей были использованы для следующих экспериментов.

**Иммуноцитометрические исследования.** Конфлюэнтный монослой культуры клеток снимали с культурального пластика путем добавления 0,25 % раствора трипсина (Sigma) в 1 мМ ЭДТА в течение 1–3 мин при 37 °C. Затем промывали центрифугированием в среде PowerStem hMSC (PAN biotech) без сыворотки в течение 5 мин при 367 g. Далее суспензию МКС пропускали через клеточный фильтр с размером ячейки 40 мкм для удаления крупных конъюгатов, после чего инкубировали с флуорохром-конъюгированными антителами на льду в течение 20 мин. Полученные таким образом образцы клеток анализировали на проточном цитофлюориметре FACSAria (BD Biosciences). Иммунофенотипический анализ (экспрессию наиболее общих позитивных и негативных поверхностных ангитенных маркеров) МСК проводили на 0–2 пассаже с использованием антител к CD90 (1 : 80), CD73 (1 : 750), CD105 (1 : 500) CD45 (1 : 150) и CD34 (1 : 20). Моноклональные антитела к CD90-FITC (Abcam, Великобритания), CD73-PE (BD Pharmingen, США), CD105-PE (BD Pharmingen, США), CD45-FITC (BioLegend США), CD34-Alexa Fluor (BD Pharmingen, США) были использованы в экспериментах. Данные иммунофеноти-

пического анализа были обработаны с использованием программного обеспечения 2.5.1 для проточной цитометрии.

**Cell-IQ анализ.** Для анализа пролиферативного потенциала (митотический индекс) и двигательной активности (скорость миграции) выделенные МСК культивировали в течение четырех дней с использованием системы длительного наблюдения за живыми клетками — Cell-IQ (CM Technologies, Германия). Параметры культивирования: температура 37 °C; 5 %-й увлажненный $CO_2$ прокачивался непосредственно через культуральный планшет; периодичность подачи газа — 15 мин включен, 15 мин выключен; первичная подача газа — 30 мин. Параметры съемки: объектив — Nikon CFI Plan Fluorescence DL 10x (Nikon, Япония); частота съемки — 12 изображений в час; количество полей съемки — 12 на одну лунку шестилуночного планшета. Полученные изображения анализировали с помощью специализированного программного обеспечения Cell-IQ Analyser. Для оценки митотического индекса считали общее количество клеток и количество клеток, находящихся в состоянии деления. Для этого создавали библиотеку изображений для детекции и дифференцировки распластанных клеток, делящихся клеток, клеточных отростков, структур цитоплазмы в клетках большого диаметра и клеточного дебриса. На основе данной библиотеки и подобранных параметров (минимального расстояния между соседними клетками, максимального диаметра клетки, симметрии клетки и др.) были проанализированы все полученные изображения. Митотический индекс рассчитывали, как отношение числа делящихся клеток к их общему количеству. Двигательную активность оценивали для 20 случайно выбранных клеток по измерению протяженности траектории, пройденной клеткой за время съемки, либо до момента, пока она находилась в поле съемки. Маркировку клеток осуществляли в ручном режиме по центру ядер. Пройденную траекторию рассчитывали, измеряя расстояние между метками.

**Индукция остеогенной дифференцировки МКС *in vitro*.** Для иммуноцитометрического анализа МСК в концентрации $0{,}3 \cdot 10^4/см^2$ рассевали в культуральные флаконы площадью 25 $см^2$. Для гистохимического анализа клеток и анали-за на аппарате Cell-IQ МСК рассевали в 6-луночные планшеты. Для осуществления остеогенной дифференцировки МСК инкубировали среде StemPro Osteogenesis Differentiation Kit (Gibco). Полные культуральные среды включали все необходимые реагенты для направленной дифференцировки МСК, но не содержали сыворотки животного происхождения. Для выявления экспрессии маркеров остеобластного профиля на 14-е сутки инкубирования клеток в индукционной остеогенной среде определяли активность щелочной

фосфатазы (Amresco, США) согласно протоколу фирмы производителя. Для визуализации минеральных отложений внеклеточного матрикса клетки после 21 суток инкубирования в индукционной среде дважды промывали в PBS (без Ca++ и Mg++), наслаивали 10 %-й формалин и фиксировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем удаляли раствор формалина, дважды отмывали клетки деионизованной водой и окрашивали 2 %-м раствором ализаринового красного (pH 4,1) в течение 20 мин, после чего отмывали шесть раз деионизованной водой, чтобы удалить лишнюю краску. Клетки анализировали и фотографировали с помощью микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения ZEN 2012 (blue edition).

## Результаты и обсуждение

Адгезивная фракция МСК, изолированных из костного мозга, относительно легко наращивается *in vitro* в специальных ростовых средах без дифференцировки. Ранее рядом авторов [4, 16] показано, что условия *in vitro* наращивания МСК могут приводить к постепенной потере характеристик ранних предшественников и к замедлению скорости пролиферации уже ко второму пассажу. Тип питательной среды и использование добавок оказывают существенное влияние на генотип и фенотип МСК, что следует учитывать при выборе оптимальных условий культивирования клеток для клинического использования [4]. В нашем эксперименте МСК достигали конфлюэнтности на 16–18 день инкубирования (0 пассаж), без замедления пролиферативной активности клеток без потери способности к дифференцировке в остеогенные тип ткани. Это объясняется применением новой высококачественной, не содержащей сыворотки плодов коров и компонентов животного происхождения, ростовой среды PowerStem MSC1, специально разработанной для пролиферации и длительного культивирования МСК человека без дифференцировки клеток. Ростовая среда PowerStem MSC1 содержит соли, аминокислоты, гормоны, ростовые факторы и обогащена белками и липидами из компонентов крови человека по оптимизированной рецептуре, при строжайшем соблюдении стандартов производства высокого качества.

Известно, что МСК представляют собой гетерогенную популяцию клеток [3, 4]. На уровне клеточных колоний мы определили несколько морфологических фенотипов: веретенообразные удлиненные клетки, большие уплощенные клетки и тонкие звездчатые клетки (рис. 8.1, *а–в*). Оба образца МСК пациентов имели сходные морфологические типы клеток, значимых различий между ними не обнаружено. В результате иммунофенотипического анализа было показано,

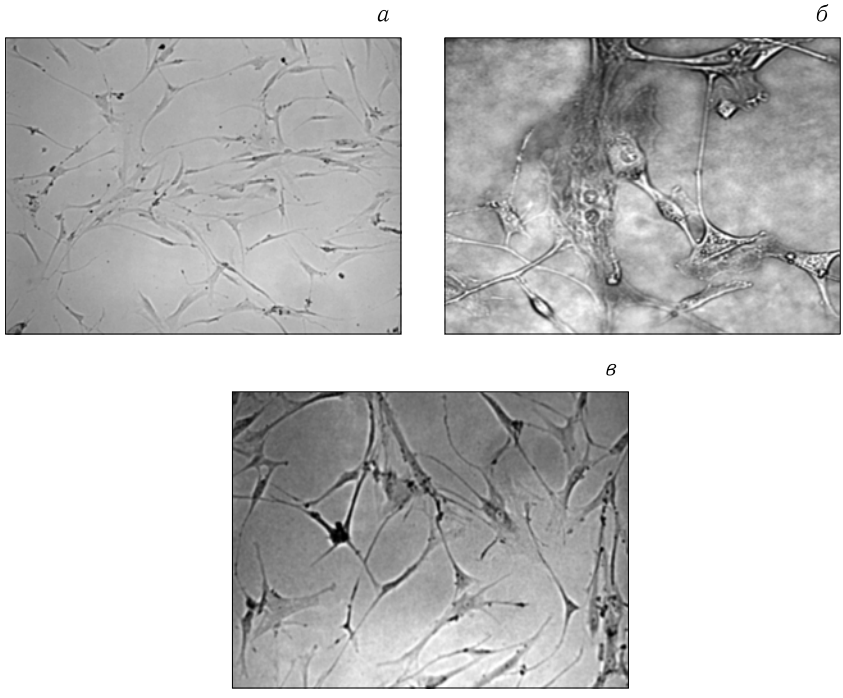


Рис. 8.1. Фенотип культивированных МСК человека. Три клеточных фенотипа наблюдались в МСК-колониях: веретенообразные клетки х10 (*а*), большие уплощенные клетки х63 (*б*) и звездчатые клетки х20 (*в*)

что профили экспрессии поверхностных антигенов, культивируемых МСК соответствовали принятым стандартам [9]. В частности, более 90 % клеток экспрессировали CD90, CD73, CD105 — положительные маркеры, типичные для МСК (рис. 8.2 *в*, *г*, *д*). В то же время более 95 % клеток были негативны по CD45 (общий лейкоцитарный антиген) и по CD34 (маркер ранних кроветворных предшественников), что свидетельствует об отсутствии их примесей в популяции МСК (рис. 8.2 *а*, *б*). Различия по экспрессии CD-маркеров между образцами клеток от разных доноров были статистически недостоверными. Таким образом, иммунофенотипический анализ показал, что по характеру и уровню экспрессии исследованных поверхностных антигенов (CD90, CD73, CD105, CD45 и CD34) культуры МСК человека на ранних пассажах (0–4) представляют собой практически гомогенную популяцию МСК.

Анализ клеточной пролиферации позволил определить общее число клеток, количество делящихся клеток и их соотношение. С помощью

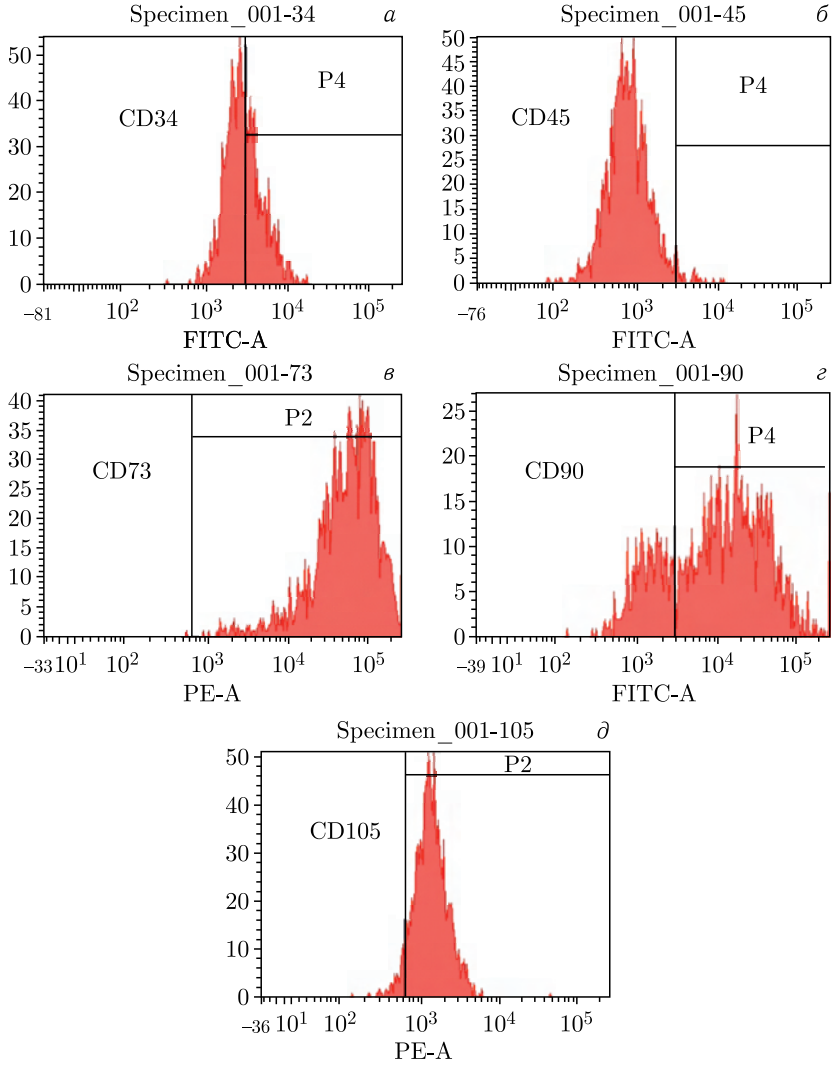


Рис. 8.2. Анализ поверхностного антигенного фенотипа МСК из костного мозга: *а* — CD34, *б* — CD45, *в* — CD73, *г* — CD90, *д* — CD105. Горизонтальные линии показывают анализируемые участки в сравнении с профилем неокрашенных клеток. По оси абсцисс — интенсивность флуоресценции (логарифмическая шкала), по оси ординат — количество событий

созданной библиотеки изображений идентифицировали распластанные, делящиеся клетки и клеточный дебрис (рис. 8.3, *а*). После автоматической обработки всех изображений с помощью пакета программ

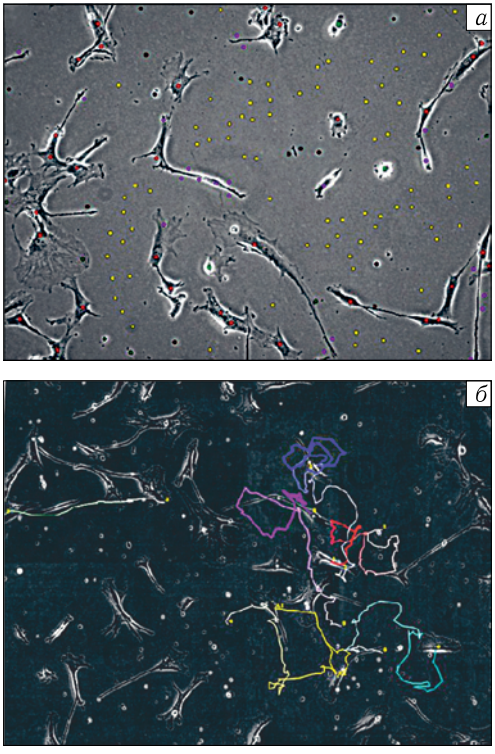


Рис. 8.3. Анализ изображений при помощи программного обеспечения Cell-IQ Analyser. *а* — красными точками обозначены детектированные распластанные клетки, светло-зелеными — делящиеся клетки, темно-зелеными — цитоплазма в клетках большого диаметра, розовыми — клеточные отростки, бордовыми — дебрис, желтыми — фон изображения; *б* — пример определения траекторий движения пяти случайно выбранных клеток. Траектории движения разных клеток окрашены в разные цвета

Cell-IQ Analyser подсчитано среднее значение митотического индекса на протяжении четырех дней непрерывного анализа пролиферирующих МСК. Для клеток, полученных от первого и второго пациента, среднее значение митотического индекса составляет 2,7 и 3,4 % соответственно, что указывает на пролиферацию МСК и подтверждается кривой увеличения количества клеток (рис. 8.4).

Двигательную активность оценивали для 20 случайно выбранных клеток, для чего в программном обеспечении Cell-IQ Analyser отслеживали траекторию движения для каждой из них. Для анализа выбирались траектории тех клеток, которые за период трекинга не испытывали контактных взаимодействий с другими клетками (рис. 8.3, *б*)

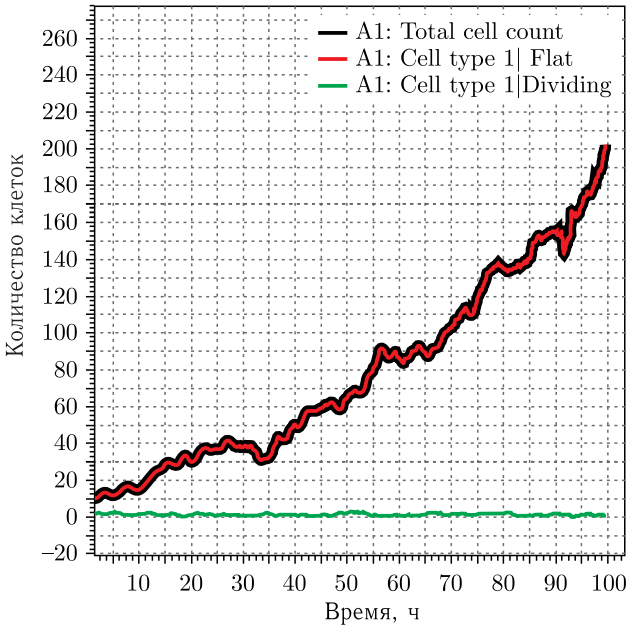


Рис. 8.4. Пролиферативная активность МСК. Красная и зеленая линии соответствуют количеству распластанных и делящихся клеток соответственно, черная линия — суммарное количество клеток; по оси абсцисс — время (ч), по оси ординат — количество клеток

и, таким образом, явились следствием их внутренней активности, независящей от расположения других клеток. Вычисления характеристик подвижности МСК производили с использованием программы в пакете Mathematica 10, разработанной для обработки параметров двигательной активности остеобластов и хондробластов. Значение подвижности (скорость миграции клеток) МСК первого пациента составляет 42 мкм/ч (59 пикселей/час), второго — 38 мкм/ч (56 пикселей/час), что позволяет говорить об активном движении клеток (см. рис. 8.3, *б*). Исследование остеогенного потенциала МСК человека проводили культивированием клеток в стандартной остеогенной среде [1]. С помощью фазово-контрастной микроскопии установлено, что количество веретенообразных клеток снижается, а число полигональных увеличивается визуально уже на третьи сутки инкубирования в дифференцировочной среде. С увеличением срока культивирования МСК в остеогенной среде также возрастала активность щелочной фосфатазы, одного из основных маркеров остеогенной дифференцировки клеток. Это связано

с участием фермента в формировании кристаллов гидроксиапатита во внеклеточном матриксе [17].

Интенсивность реакции на щелочную фосфатазу (рис. 8.5, *а*) оценивали на 16–18-е сутки эксперимента, по интенсивности окрашивания она достигала максимальных значений в «костных бляшках», неравномерно образующихся в плотном монослое при длительном культивировании остеобластов. Завершение остеогенной дифференцировки созреванием остеобластов и формированием кальциевых депозитов внеклеточного матрикса подтверждается интенсивным окрашиванием ализариновым красным. В клеточных скоплениях, напоминающих «костные бляшки», плотность минерализации соединений кальция пропорциональна интенсивности красной окраски (рис. 8.5, *б*).

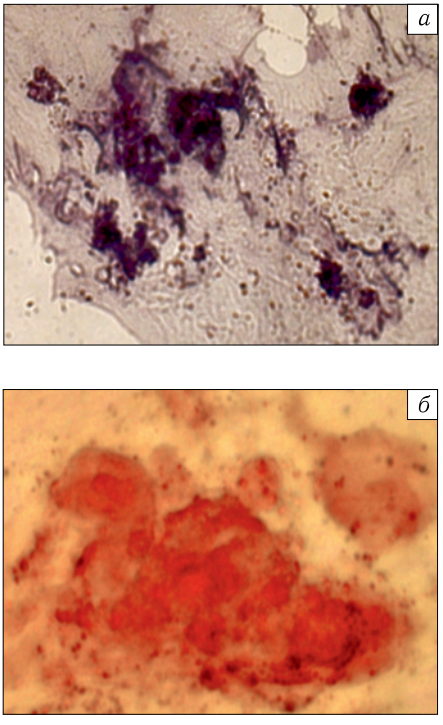


Рис. 8.5. Гистохимическая характеристика остеогенного потенциала МСК из костного мозга при длительном культивировании в индукционной среде. *а* —активность щелочной фосфатазы — темно-фиолетовое окрашивание «костных бляшек», х20, *б* — окраска на ализариновый красный S, х63. Плотность минерализации соединений кальция пропорциональна интенсивности красной окраски

## Заключение

Активные разработки тканеинженерных конструкций для регенерации тканей опорно-двигательного аппарата определяют повышенный интерес к исследованиям МСК. МСК, выделенные из костного мозга, остаются в центре внимания большинства исследований из-за наличия у них способности дифференцироваться в клетки остеогенного типа ткани. В нашей работе показано, что аспираты костного мозга пациентов с диспластическим коксоартрозом являются полноценным источником МСК, которые удовлетворяют требованиям, определенным Международным обществом клеточной терапии. В экспериментах по длительному культивированию с визуальным контролем на аппарате Cell-IQ определены размеры и морфология типов клеток в популяции МСК, адгезия, экспрессия типичных поверхностных маркеров, проведена дифференцировка МСК по остеогенному типу. Впервые оценены параметры подвижности МСК, включая траекторию движения, среднюю скорость, а также митотический индекс МСК при инкубировании на культуральном пластике. МСК являются перспективными кандидатами для тканевой инженерии, с прицелом на регенерацию костной ткани. Полученные данные могут использоваться как контрольные параметры клеток при сравнении с аналогичными параметрами при заселении клетками различных «скаффолдов». Сравнение изученных характеристик клеток позволит оценить токсичность и биосовместимость «скаффолдов» различного происхождения и различных физико-химических свойств. Вычисление скорости заселения клетками объемных трехмерных «скаффолдов» позволит разработать методические подходы к достижению оптимальных показателей адгезии МСК, поддержанию их пролиферации и направленной дифференцировки.

## Список литературы

1. *Кожевникова М.Н.*, *Микаелян А.С.*, *Старостин В.И.* Молекулярно-генетический и иммунофенотипический анализ антигенного профиля, остеогенных и адипогенных потенций мезенхимальных стромальных клеток из печени зародышей и костного мозга половозрелых крыс // Цитология. 2009. Т. 51, № 6. С. 526–538.

2. *Andreeva N.V.*, *Bonartsev A.P.*, *Zharkova I.I. et al.* Culturing of Mouse Mesenchymal Stem Cells on Poly-3-Hydroxybutyrate Scaffolds // Cell Technol. in Biology and Medicine. 2015. V. 2. P. 114–119.

3. *Banfi A.*, *Muraglia A.*, *Dozin B. et al.* Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy // Exp. Hematol. 2000. V. 28, No 6. P. 707–715.

4. *Bara J.*, *Richards R.G.*, *Alini M.*, *Stoddart M.J.* Concise Review: Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Change Phenotype Following *In Vitro* Culture: Implications for Basic Research and the Clinic // Stem cells. 2014. V. 32. P. 1713–1723.

5. *Beyer N.N.*, *da Silva M.L.* Mesenchymal stem cells: isolation, *in vitro* expansion and characterization // Handb. Exp. Pharmacol. 2006. V. 174. P. 249–282.

6. *Bianco P.*, *Riminucci M.*, *Gronthos S.*, *Robey P.G.* Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications // Stem. Cells. 2001. V. 19, No 3. P. 180–192.

7. *Charbord P.* Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts // Human Gene Therapy. 2010. P. 1045–1056.

8. *da Silva M.L.*, *Caplan A.I.*, *Nardi N.B.* In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells // Stem Cells. 2008. V. 26, No 9. P. 2287–2299.

9. *Dominici M.*, *Le Blanc K*, *Mueller I. et al.* Minimal criteria for defining multipotentl mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy. 2006. V. 8, No 4. P. 315–317.

10. *Dong Youhai*, *Xujun Chen*, *Yang Hong*. Tissue-Engineered Bone Formation *In Vivo* for Artificial Laminae of the Vertebral Arch Using $\beta$-Tricalcium Phosphate Bioceramics Seeded With Mesenchymal Stem Cells // Spine. 2013. V. 38, No 21. P. 1300–1306.

11. *Gimble J.M*, *Grayson W.*, *Guilak F. et al.* Adipose tissue as a stem cell source for musculoskeletal regeneration // Front. Biosci. (Schol Ed.). 2011. V. 3. P. 69–81.

12. *Horner C.B. et al.* Magnitude-dependent and inversely-related osteogenic/chondrogenic differentia tion of human mesenchymal stem cells under dynamic compressive strain // J. Tissue Eng. Regen. Med. 2016. doi:10.1002/term.2332.

13. *Horwitz E.M. et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statemen // Cytotherapy. 2005. V. 5. P. 393–395.

14. *Mizuno H.* Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review // Nippon. Med. Sch. 2009. V. 76, No 2. P. 56–66.

15. *Mizuno H*. Adipose-derived stem and stromal cells for cell-based therapy: current status of preclinical studies and clinical trials // Curr. Opin. Mol. Ther. 2010. V. 12, No 4. P. 442–449.

16. *Mosna F*., *Sensebe L*., *Krampera M*. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide // Stem Cells Develop. 2010. V. 19, No 10. P. 1449–1470.

17. *Nunzia Di Maggio* Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Niches and Regenerative Medicine // Basel (Schweiz). 2010. V. 5. P. 142.

18. *Wu Y*. *et al*. The combinedeffect of substrate stiffness and surface topography on chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells // Tissue Eng. Part A. 2017. V. 23(1–2). P. 43–54.

# 9. ИЗУЧЕНИЕ БАЗОВЫХ ХАРАКТЕРИСТИК КЛЕТОК ОСТЕОГЕННОГО И ХОНДРОГЕННОГО РЯДОВ, ЗНАЧИМЫХ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ ИМПЛАНТОВ

*Н.М. Астахова, А.В. Корель, Е.И. Щелкунова, К.Е. Орищенко, С.В. Николаев, У.С. Зубаирова, И.А. Кирилова*

Клеточные технологии в биологии и медицине. 2017. № 4. С. 249–257

Выделены и охарактеризованы культуры клеток из костной и хрящевой тканей лабораторных мини-свиней. У адгезивных клеток остеогенного и хондрогенного рядов были уточнены размеры и характерные морфологические особенности. Исследуемые культуры клеток *in vitro* экспрессировали специфические маркеры, которые выявляли иммуногистохимическим окрашиванием: у остеобластов — щелочную фосфатазу и отложение кальциевых депозитов, а у хондрогенных клеток — экспрессию коллагена II типа и хрящевого внеклеточного матрикса при длительном культивировании в стандартных условиях. Кроме того, пролиферативный потенциал (митотический индекс) для обоих типов клеток составил 4,64 % от общего числа клеток. Двигательная активность — средняя скорость миграции клеток составила: для остеобластов — 49 пикселей/ч, а для хондробластов — 47 пикселей/ч, среднее значение длины пройденного пути для хондробластов составило 2045 пикселей, для остеобластов — 2118 пикселей. Полученные линии клеток уже используются в качестве модельного контроля при определении оптимальной биосовместимости материалов матриц. Характеристики двигательной активности клеток костной и хрящевой тканей предполагается использовать для моделирования и вычисления скорости заселения клетками 3D-объемов скаффолдов с различной внутренней структурой и физико-химическими свойствами из синтетических и биологических полимеров при разработке тканевых имплантов в условиях *in vitro*.

## 9. THE STUDY OF THE BASIC CHARACTERISTICS OF THE OSTEOGENIC AND CHONDROGENIC CELLS, IMPORTANT FOR TISSUE ENGINEERING IMPLANTS

*N.M. Astakhova, A.V. Korel, E.I. Shchelkunova, K.E. Orishchenko, S.V. Nikolaev, U.S. Zubairova, I.A. Kirilova*

Cell cultures of bone and cartilage tissue of lab mini-pigs were isolated and characterized. Size and morphological features of osteogenic and chondrogenic adherent cells were specified.

The *in vitro* test cells express specific markers which were identified by immunohistochemical staining: for osteoblasts — alkaline phosphatase and calcium deposition, and for chondrogenic cell — expression of type II collagen and cartilage extracellular matrix during long term cultivation under standard conditions. Moreover, the proliferative potential (mitotic index) for both types of cell was 4.64 % of the total cell number. Cell motility — the average speed of cell migration was: for osteoblast — 49 pixels/hour, and for chondroblasts — 47 pixels/h, the average length of run distance for chondroblasts was 2045 pixels, for osteoblast — 2118 pixels. The obtained cell lines already are used as a control model for determination optimal biocompatibility of scaffold materials. Characteristics of the bone and cartilage cells motility to be used for modeling and calculating the rate of cells settlement of 3D scaffolds with different internal structure and physicochemical properties from synthetic and biological polymers for design tissue implants *in vitro*.

Клеточные культуры остеобластов и хондробластов используются для изучения биохимии и физиологии формирования костей и хрящей, в исследованиях молекулярных клеточных основ болезней опорно-двигательного аппарата человека. На культуре остеобластов также изучают механизмы резорбции кости в сочетании с процессами образования костной ткани. На культуре хондробластов, в частности, изучают процессы формирования и функционирования хрящевой ткани в норме и при различных патологиях. Кроме того, культуры обоих типов клеток используются для скрининга потенциальных анаболических агентов, для разработки и тестирования новых биоматериалов, а также служат источником клеток для тканевой инженерии.

Разработка биосинтетических регенерирующих имплантов и инженерия тканей относится к актуальнейшим темам современной медицины. Во всем мире ежегодно происходят десятки миллионов случаев, требующих хирургических вмешательств по восстановлению повреждений опорно-двигательного аппарата разной этиологии. В большинстве случаев необходим костный материал или его заменитель для восстановления обширных дефектов костной ткани. Учитывая старение населения во всем мире и увеличение количества случаев повреждения костей, потребность в имплантатах костной ткани в будущем будет только возрастать. В последние несколько лет исследователи сосредоточились на проектировании и разработке трехмерных (3D) скаффолдов, которые предлагают значительные преимущества в плане пролиферации клеток. Тканевой инжиниринг, использующий клетки, ростовые факторы и 3D-матрицы в качестве носителей клеток, является современным клиническим подходом для регенерации значительных по площади дефектов костной ткани и коррекции травматических повреждений костей.

Ключевой стратегией устранения костных дефектов является использование скаффолдов, заселенных как мезенхимальными стволовыми, так и дифференцированными остеогенными клетками. В настоящее время ведутся разработки объемных матричных конструкций для восполнения дефектов костной ткани методом 3D-печати. В качестве материала для печати используют биополимеры и соединения фосфата кальция. Данный метод позволяет получить образцы точных размеров, сложной геометрии и с заданной архитектоникой [2]. Однако остеоиндуктивные и остеокондуктивные свойства этих материалов недостаточны для замещения дефектов объемом более 1 $см^3$ [2, 18]. Это связано с несколькими факторами: костная и хрящевая ткани несут механическую нагрузку и обладают сбалансированными упруго-прочностными характеристиками. Показано, что при излишней жесткости имплантата из твердых материалов, таких как металлокерамика, может травмироваться ткань, его окружающая.

Еще одной нерешенной проблемой остаются слабоадгезивные свойства поверхности материалов для заселения клеткам в качестве межклеточного матрикса. Для восстановления обширных повреждений свода черепа применяют композиционные полилактидные скаффолды, полученные методом фазового разделения из поли *L*-лактида, глицерофосфата кальция и коллагенового геля. Остеоиндуктивные свойства скаффолда изменяли добавлением глицерофосфата кальция. Биосовместимость полилактида улучшали совмещением его с коллагеновым гелем [3, 21]. Показано, что такая модификация улучшает биосовместимость клеток с материалом скаффолда [1]. Микроволокнистые матриксы из полилактида обладают высокой механической прочностью, способностью к биодеградации, отсутствием токсичности. Однако из-за отсутствия полярных функциональных групп проявляют высокую гидрофобность, что негативно влияет на адсорбцию белков, а также существенно ограничивает проникновение клеток в поры трехмерных структур (пролиферация клеток наблюдается на поверхности и в прилегающих слоях). Поэтому для оптимизации процессов инфильтрации и пролиферации клеток необходима модификация поверхности материалов и специальная перфузионная система для заселения матрицы клетками [3].

Проблему недостаточно быстрого заселения матрицы клетками *in vivo* в настоящее время пытаются решить с помощью веществ или субстанций, инициирующих регенерацию кости. С увеличением глубины миграции клеток внутри матрицы при больших дефектах и соответствующих размерах матриц нарушается микроциркуляция, что ведет к недостаточному обеспечению клеток питанием, низкой скорости передачи гуморальных сигналов и ответа клеток на них, т. е. к замедлению

метаболизма клеток в тканеинженерной конструкции. Последние исследования в этой области показали, что применение механических, электрических и электромагнитных стимулов [6, 14] способствует дифференцировке и нормальному функционированию клеток костной [15] и хрящевой тканей [13] и ускоряет процесс заселения клетками 3D-объемов матриц [7], однако при конструировании имплантатов это пока учитывается недостаточно.

Таким образом, некоторые непреодоленные недостатки в регенерации костной ткани по-прежнему существуют, несмотря на многообразие методов создания и разнообразие материалов скаффолдов. Нет четких протоколов заселения, не создано специальное оборудование, обеспечивающее процесс равномерного заселения матриц клетками. Несомненно, что для их решения требуется комплексный междисциплинарный подход, позволяющий учесть многие факторы.

## Материалы и методы

**Экспериментальная модель мини-свиньи.** Исследование выполнено на лабораторных мини-свиньях, выведенных в Институте цитологии и генетики СО РАН для лабораторных и доклинических исследований. В ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России мини-свиней используют для моделирования артифицированных дефектов костной и хрящевой тканей с последующей коррекцией дефектов с помощью разрабатываемых тканеинженерных конструкций в экспериментах *in vivo*. Все исследования проводились с соблюдением положений Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации и правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных [4]. Проведение исследований и возможность их публикации были одобрены Комитетом по биомедицинской этике при ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России (выписка из протокола 005/17 от 03 марта 2017 года).

**Выделение и культивирование.** Клетки хондрогенного ряда выделяли из хрящевой ткани коленного сустава экспериментальных минисвиней (две самки, возраст 1–1,5 недели). Гиалиновый хрящ отмывали в растворе Хенкса с канамицином 1 г/л в течение 15 мин, измельчали в чашке Петри с минимальным объемом среды RPMI 1640 (Биолот, Россия) до размеров 1–2 мм$^2$, а затем помещали в раствор 1,5 % коллагеназы II типа (Gibco) и инкубировали при температуре 37 °C в течение 5–8 ч на шейкере. Затем суспензию клеток пропускали через нейлоновый фильтр и центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. Далее полученную суспензию клеток разводили в концентрации $3 \cdot 10^5$/мл в ростовой питательной среде RPMI 1640 с добавлением 10 % фетальной

сыворотки плодов коров (Gibco) и 100 ед/мл пенициллина-стрептомицина (Биолот, Россия), инкубировали в культуральных флаконах (TPP) в стандартных условиях $CO_2$ инкубатора: 37 °C и 5 % $CO_2$.

Из фрагментов губчатой ткани головки бедренной кости мини-свиней были выделены клетки, экспрессирующие характеристики остеобластов, одного из видов клеток остеогенного ряда. Были отработаны условия культивирования и стимуляции первичных остеобластов на культуральном пластике. Для этой цели были опробованы несколько типов культуральных сред DMEM Gluto MAX, RPMI, RPMI Gluto MAX (Gibco). Комбинация ростовой среды RPMI Gluto MAX с добавлением 10 % фетальной сыворотки плодов коров (Gibco) оказалась оптимальной для длительного культивирования остеобластов в стандартных условиях $CO_2$ инкубатора (37 °C и 5 % $CO_2$). Культуральные среды для обоих типов клеток заменяли каждые 3–4 дня. Конфлюэнтный монослой культуры клеток обоих типов снимали с культурального пластика путем обработки 0,25 % раствором трипсина (Sigma) в 1 мМ ЭДТА в течение 1–3 мин при 37 °C, затем клетки осаждали центрифугированием при 1500 об/с в течение 5 мин. Во всех экспериментах были использованы клетки между пятым и пятнадцатым пассажем.

**Морфометрический и иммуногистохимический анализ.** На репрезентативных выборках первичных остеобластов и хондробластов были определены средние значения диаметров клеток. Измерение диаметров клеток проводили в суспензионном 3D-состоянии в растворе PBS после снятия конфлюэнтного монослоя клеток 0,25 % трипсином с культурального пластика. Морфометрические измерения были произведены при помощи пакета программ Axio Vision Le Rel. 4.3 фирмы Carl Zeiss и Morpho Images.

Для подтверждения хондрогенных свойств культивируемые клетки флуоресцентно окрашивались антителами с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 568 к коллагену II типа (Invitrogene, США). Этот специфический маркер хондрогенной дифференцировки четко окрашивается в цитоплазме клеток (рис. 9.1, *в*). Интенсивность свечения коллагена II типа не одинакова среди клеточной популяции хондроцитов. При длительном культивировании хондробласты начинают продуцировать межклеточный матрикс хрящевой ткани, который специфически окрашивается альциановым синим. Интенсивность окрашивания альциановым синим пропорциональна толщине отложения хрящевого матрикса (рис. 9.1, *г*).

Дифференцировка остеобластов *in vitro* может характеризоваться тремя стадиями: а) пролиферация клеток, б) созревание матрикса и в) минерализация матрикса.

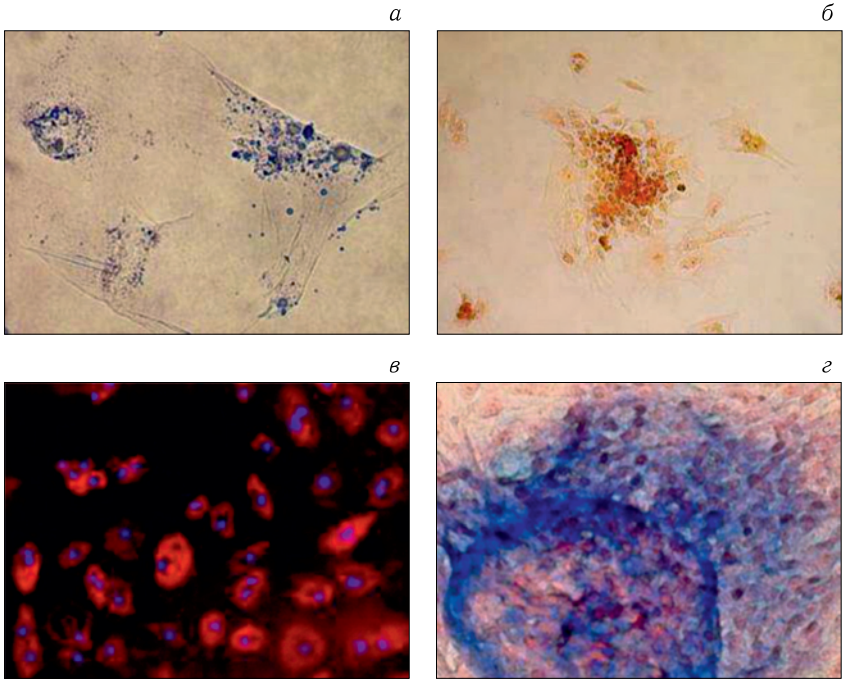


Рис. 9.1. Цитохимические маркеры клеток остеогенного (*а*, *б*) и хондрогенного (*в*, *г*) рядов: *а*) окраска на щелочную фосфатазу, ×10; *б*) окраска на ализариновый красный S, ×20; *в*) окраска на коллаген II типа, ядра клеток окрашены DAPI, ×20; *г*) окраска на альциановый синий, ядра клеток окрашены Nuclear Fast Red, ×10

В течение всех стадий остеобластами экспрессируются специфические белки, которые являются маркерами данного вида клеток и могут быть выявлены с помощью иммуногистохимического окрашивания. Фермент щелочной фосфатазы начинает выявляться уже на стадии пролиферации клеток и достигает максимальной экспрессии при созревании матрикса. Поэтому этот специфический маркер был выбран для определения степени дифференцировки остеобластов. Измерение активности щелочной фосфатазы после реакции с субстратом BCIP/NBT (Amresco, США) проводили визуально. Клетки окрашивались от слабо-голубоватого до темно-сине-фиолетового цветов в зависимости от активности щелочной фосфатазы (рис. 9.1, *а*).

Остеобласты на стадии минерализации (в) продуцируют многочисленные межклеточные кальциевые депозиты *in vitro*. Этот процесс свидетельствует об успешном формировании костной ткани. Кальциевые отложения могут быть специфически окрашены ярко-красным при

использовании красителя — ализаринового красного S. В клеточных скоплениях плотность минерализации соединений кальция пропорциональна интенсивности красной окраски (рис. 9.1, *б*). Анализ окрашенных образцов клеток проводили с помощью светового микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения ZEN 2012 (blue edition).

**Cell-IQ анализ основных характеристик клеток.** Для анализа пролиферативного потенциала (митотический индекс), траекторий миграции и двигательной активности выделенные остеобластные и хондробластные клетки культивировали в течение четырех дней в двух независимых экспериментах с использованием системы длительного наблюдения за живыми клетками — Cell-IQ. Параметры культивирования: температура 37 °C; 5 %-й увлажненный углекислый газ прокачивался непосредственно через культуральный планшет; периодичность подачи газа — 15 мин включен, 15 мин выключен; первичная подача газа — 30 мин. Параметры съемки: объектив — Nikon CFI Plan Fluorescence DL 10x, частота съемки — 6 изображений/ч, количество полей съемки — 3 на одну лунку двенадцатилуночного планшета, по три лунки на каждую линию клеток. Период съемки — 43 ч. Полученные изображения анализировали с помощью специализированного программного обеспечения Cell-IQ Analyser. Для оценки митотического индекса с помощью Cell-IQ Analyser анализировали общее количество клеток и количество клеток, находящихся в состоянии деления. Для этого создавали библиотеку изображений, для детекции и дифференциации распластанных клеток, делящихся клеток и клеточного дебриса (рис. 9.2, *а*, *б*).

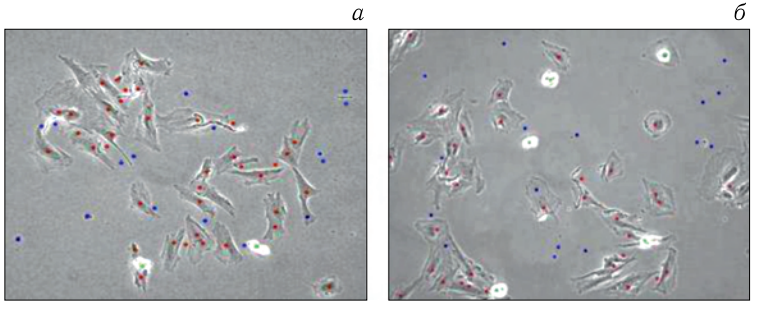


Рис. 9.2. Пример детекции распластанных клеток, делящихся клеток и клеточного дебриса при помощи программного обеспечения Cell-IQ Analyser: *а*) первичные остеобласты; *б*) первичные хондробласты свиньи. Красными точками обозначены детектированные распластанные клетки, зелеными — клетки в состоянии деления и синими — клеточный дебрис

На основе данной библиотеки и подобранных параметров (минимального расстояния между соседними клетками, максимального диаметра клетки, симметрии клетки и др.) был создан протокол и проанализированы все полученные изображения.

Митотический индекс рассчитывали по формуле: $MI = \frac{M}{N} \times 100\,\%$, где $M$ — суммарное количество клеток в состоянии деления для каждого из полей зрения за весь период съемки, $N$ — общее количество клеток для каждого из полей зрения за весь период съемки. Двигательную активность клеток оценивали для 18 случайно выбранных клеток по измерению протяженности траектории пройденной клеткой за время съемки либо до момента, пока клетка находилась в поле съемки (рис. 9.3).

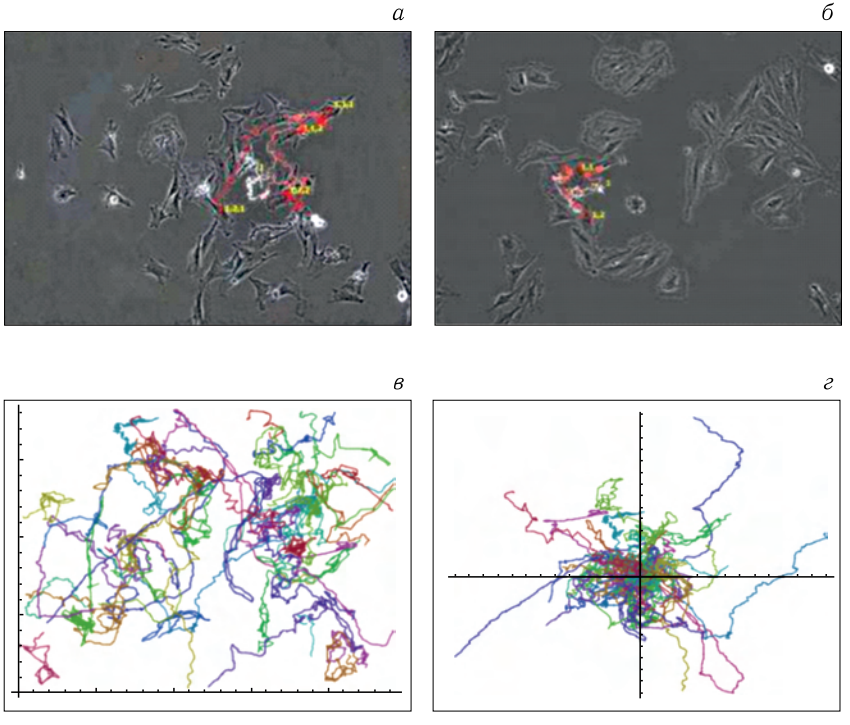


Рис. 9.3. *а*) Траектории движения хонробласта и его потомков; *б*) траектории движения остеобласта и его потомков; *в*) сводный график (по 12 кадрам) траекторий движения хондробластов на культуральном пластике; *г*) те же траектории, приведенные к системе координат, связанной с началом каждой траектории. Траектория движения каждой клетки окрашена в определенный цвет

Эксперименты по изучению подвижности клеток на субстратах с разной жесткостью также проводили в аппарате Cell-IQ. Для изучения подвижности клеток были выбраны культуры в редком посеве с начальной плотностью посадки $\sim$ 400 кл/см$^2$. Подвижность ходробластов оценивали на субстратах с разной жесткостью: пластик и желатин. Трекинг клеток производился вручную по изображениям покадровой съемки с помощью программы Fiji (http://fiji.sc/Fiji). Для анализа выбирались траектории клеток, которые за период трекинга не испытывали контактных взаимодействий с другими клетками. Таким образом, траектории наблюдаемых клеток явились следствием внутренней активности именно этих клеток, а не реализовались в результате контактов с другими клетками, то есть не зависели от расположения других клеток. Для вычисления характеристик подвижности клеток были написаны программы в пакете Mathematica 10.

## Результаты и обсуждение

Линия первичных остеобластов свиньи была впервые получена нами в ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России и АО «Медицинский технопарк» на основе методик [8, 9] с модификациями. Остеобластная линия клеток выделена для изучения основных характеристик костных клеток при разработке костных имплантов и для биологической оценки субстратов матриц. В аналогичных отечественных и зарубежных исследованиях используются дорогие коммерческие линии предостеобластов мыши MC3T3 и крысы из DSMZ PromoCell GmbH (Германия) [5, 10, 11] либо клеточные линии остеосаркомы MG63, TE85, SaOS2, которые сильно хромосомно перестроены, в связи с этим могут иметь существенные изменения остеогенных свойств [9].

Морфологический тип клеток хондрогенного ряда в основном имеет слегка вытянутую форму с несколькими короткими отростками цитоплазмы, с округлым большим ядром, содержащим 1–2 ядрышка. Клетки остеобластного ряда крупнее, с обширной цитоплазмой и более короткими, «острыми» ее отростками, в зрелом состоянии в цитоплазме остеобластов идентифицируются линейные структурированные микрофиламенты, ядра средних размеров с 2–3 ядрышками. Морфометрический анализ показал, гетерогенность популяций молодых, растущих и больших, зрелых клеток как в культуре остеобластов, так и в культуре хондробластов. Значения диаметров хондрогенных клеток варьировали от 12,97 мкм до 26,70 мкм, среднее значение составило 16,75 мкм (табл. 9.1). Несмотря на то, что среднее значение диаметра остеогенных клеток было 17,37 мкм, в популяции данного

Таблица 9.1. Значения диаметров хондробластных и остеобластных клеток

| Диаметры | $N$* | Минимум | Максимум | Среднее | Стандартная ошибка средней | Стандартное отклонение |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Остеобласты, мкм | 27 | 9,33 | 29,91 | 17,37 | 1,01 | 5,26 |
| Хондробласты, мкм | 27 | 12,36 | 26,70 | 16,75 | 0,57 | 2,98 |
| * $N$ — Количество проанализированных клеток. | | | | | | |

типа клеток наблюдался еще более значительный разброс значений от 9,33 мкм до 29,91 мкм, что согласуется с литературными данными о размерах костных клеток, в частности диаметр зрелых остеокластов, может достигать 90 мкм и более. Значительный размер клеток обоих типов в дифференцированном виде (до 30 мкм) необходимо учитывать при выборе материалов матриц, предпочтительнее использовать образцы с размером пор от 250 мкм и более. В предыдущих исследованиях инфильтрации, пролиферации и дифференцировки остеобластов на скаффолдах также было показано, что больше клеточной миграции и инфильтрации наблюдалось в матрицы с большими размерами пор [20].

Для обоих типов клеток был посчитан митотический индекс. В результате как для первичных остеобластных клеток, так и для первичных хондробластов значение митотического индекса составило 4,64 % от общего количества клеток. То есть клеточные линии обоих типов пролиферировали активно и с одинаковым потенциалом, что также видно и по кривым увеличения общего количества клеток за время эксперимента (43 ч) (рис. 9.4, *а*, *б*).

Двигательную активность оценивали для 9 случайно выбранных клеток (по одной в каждом поле съемки) и всех ее потомков как для остеобластов, так и для хондробластов. Для этого в программном обеспечении Cell-IQ Analayser отслеживали траекторию определенной клетки до деления и затем ее потомков (рис. 9.3, *а*, *б*). В результате удалось оценить среднюю скорость движения обоих типов клеток. Для остеобластов значение подвижности клеток составило 49 пикселей/ч, а для хондробластов 47 пикселей/ч, среднее значение длины пройденного пути для хондробластов составляет 2045 пикселей, для остеобластов — 2118 пикселей. Полученные характеристики соответствуют активно двигающимся клеткам (собственные наблюдения).

Изучение подвижности клеток и способов ее описания продолжается на протяжении более ста лет. На феноменологическом

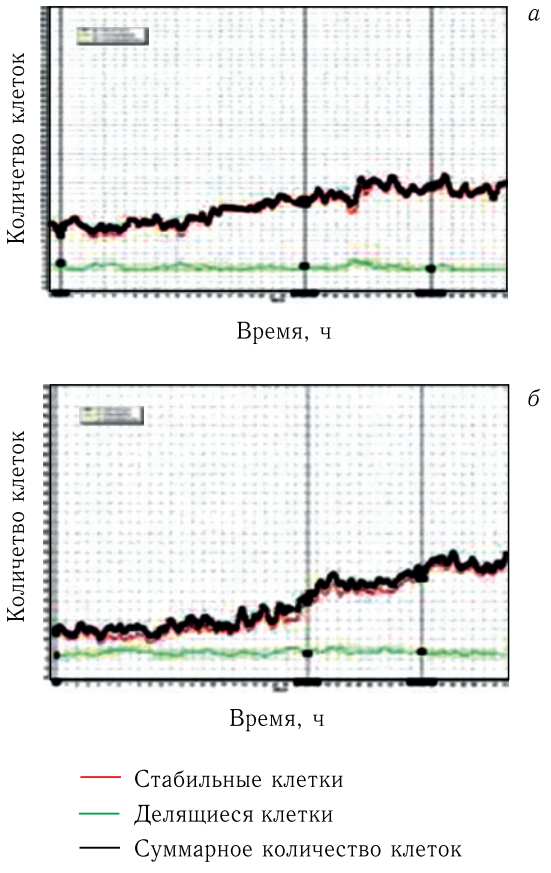


Рис. 9.4. Анализ пролиферативной активности двух типов клеток: *а*) первичные хондробласты свиньи; *б*) первичные остеобласты свиньи. Красная и зеленая линии соответствуют количеству распластанных и делящихся клеток соответственно. Черная линия — суммарное количество клеток

уровне подвижность клеток можно описывать моделью процесса Орнштейна—Уленбека (ОУ) по формуле $\langle d(t)2\rangle = 2nD(t - P(1 - e - tP))$ для среднего квадрата перемещения клетки $d(t) = r(t) - r(0)$ от начала ее траектории; $\langle\cdots\rangle$ обозначает ожидаемое значение, $t$ — время, $n = 1, 2, 3$ — размерность пространства, в котором изучаются траектории $r(t)$. $D$ — коэффициент диффузии ОУ-процесса и называется (в случае изучения подвижности) коэффициентом подвижности клеток. $P$ — персистентное время движения [17]. Однако, приступая к изучению подвижности клеток, можно стартовать с модели простой диффузии. Для изучения подвижности клеток в рамках модели

простой диффузии в пакете Mathematica 10 были написаны программы для импорта данных из программы Fiji; формирования наборов треков, удовлетворяющих определенным критериям и их визуализации (рис. 9.3, *в–г*); для вычисления таких элементов движения, как перемещения клеток, векторы пробегов, углы поворотов, и вычисления их статистик; для вычисления характеристик подвижности клеток в рамках простого броуновского движения.

Предварительные результаты показали, что чем жестче поверхность, тем выше подвижность клеток, и это согласуется с литературными данными [19].

## Заключение

Получены линии клеток хрящевой и костной тканей для дальнейшей оптимизации работ по созданию *in vitro* модели тканевых имплантов. В экспериментах по длительному культивированию хондробластов и остеобластов с визуальным контролем на аппарате Cell-IQ были определены размеры и морфология типов клеток в гетерогенных популяциях. Подобраны гистохимические маркеры для подтверждения хондрогенного и остеогенного статусов клеток. Получены оценки подвижности клеток обоих типов в приближении броуновского движения. Впервые были оценены такие параметры как митотический индекс; расстояние, пройденное отдельными клетками в единицу времени; траектория движения; средняя скорость движения хондробластов и остеобластов при инкубации их на культуральном пластике в течение длительного времени. Таким образом, отработанные экспериментальные методики и разработанные алгоритмы / программы для извлечения и обработки информации, полученной в ходе этих экспериментов, позволяют в значительной мере характеризовать и модулировать физико-химические условия в материале потенциальных скаффолдов для имплантов и реакции клеток на эти условия. Подбор оптимальных условий позволит разработать стандартные протоколы получения индивидуальных клеточных 3D-конструктов для регенеративной терапии.

## Список литературы

1. *Деев Р.В.*, *Цупкина Н.В.*, *Бозо И.Я. и др.* Тканеинженерный эквивалент кости: методологические основы создания и биологические свойства // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011. Т. VI, № 1. С. 62–67.
2. *Комлев В.С.*, *Сергеева Н.С.*, *Федотов А.Ю. и др.* Исследование физико-химических и биологических свойств композиционных матриксов в си-

стеме альгинат–фосфаты кальция, предназначенных для использования в технологиях прототипирования при замещении костных дефектов // Материаловедение. 2016. С. 38–42.

3. *Нащекина Ю.А.*, *Никонов П.О.*, *Михайлов В.М. и др.* Зависимость заполнения стромальными клетками костного мозга трехмерной матрицы от способа посева клеток и типа модификации поверхности матрицы // Цитология. 2014. № 4. С. 283–290.
4. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.03.2003 г. № 226.
5. *Bo Yin*, *Ma P.*, *Chen J. et al.* Hybrid Macro-Porous Titanium Ornamented by Degradable 3D Gel/nHA Micro-Scaffolds for Bone Tissue Regeneration // Intern. J. Mol. Sci. 2016. № 17. P. 575–586.
6. *Cao X.*, *Lin Y.*, *Driscoll T.P. et al.* A chemomechanical model of matrix and nuclear rigidity regulation of focal adhesion size // Biophys. J. 2015. No 3. P. 1807–1817.
7. *De Santis R.*, *Russo A.*, *Gloria A. et al.* Towards the Design of 3D Fiber-Deposited Poly(-caprolactone)/Iron-Doped Hydroxyapatite Nanocomposite Magnetic Scaffolds for Bone Regeneration // J. Biomed. Nanotechn. 2015. V. 11, No 7. P. 1236–1246.
8. *Di Silvio L.* Development of a cell culture model and the characterization of primary human osteoblasts. PhD Thesis. London: University College, 1995. Ch. 2.
9. *Dillon J.P.*, *Waring-Green V.J.*, *Taylor A.M. et al.* Primary human osteoblast cultures // Meth. Mol. Biol. 2012. V. 816. P. 3–18.
10. *Hadjicharalambous C.*, *Mygdali E.*, *Prymak O.*, *Buyakov A.*, *Kulkov S.*, *Chatzinikolaidou M.* Proliferation and osteogenic response of MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells on porous zirconia ceramics stabilized with magnesia or yttria // J. Biomed. Mater Res. 2015. V. 103, No 11. P. 3612–3624.
11. *Hadjicharalambous C.*, *Buyakov A.*, *Buyakova S.*, *Kulkov S.*, *Chatzinikolaidou M.* Porous alumina, zirconia and alumina/zirconia for bone repair: fabrication, mechanical and *in vitro* biological response // Biomed. Mater. 2015. V. 10. P. 1–13.
12. *Heidari M.*, *Tahmasebi*, *Etemad S. et al. In vitro* Human Chondrocyte Culture // A Modified Protocol Middle-East J. Sci. Res. 2011. V. 9, No 1. P. 102–109.
13. *Huang L.*, *Xieyi Cai*, *Hui Li et al.* The effects of static pressure on chondrogenic and osteogenic differentiation in condylar chondrocytes from temporomandibular joint // Archives of Oral Biolog. 2015. V. 60, No 4. P. 622–630.
14. *Iandolo D.*, *Ravichandran A.*, *Liu X. et al.* Development and characterization of organic electronic scaffolds for bone tissue engineering // Adv. Healthcare Mater. 2016. V. 5. P. 1505–1512.

15. *Maeda A.*, *Bandow K.*, *Kusuyama J. et al.* Induction of CXCL2 and CCL2 by pressure force requires IL-1$\beta$-MyD88 axis in osteoblasts // Bone. 2015. P. 76–82.

16. *Pati F.*, *Song T.*, *Rijal G.*, *Jang J. et. al.* Ornamenting 3D printed scaffolds with cell-laid extracellular matrix for bone tissue regeneration // Biomaterials. 2014. P. 1–12.

17. *Selmeczi D.*, *Mosler S.*, *Hagedorn P.H. et al.* Cell Motility as Persistent Random Motion: Theories from Experiments // Biophys. J. 2005. V. 89. P. 912–931.

18. *Smith B.D*, *Grande D.A.* The current state of scaffolds for musculoskeletal regenerative applications // Nat. Rev. Rheumatol. 2015. V. 11, No 4. P. 213–222.

19. *Tsekov R.*, *Lensen M.* Brownian motion and temperament of living cells // Chinese Phys. Lett. 2013. V. 30. P. 070501.

20. *Tsiridis E.*, *Gurav N.*, *Bailey G.*, *Sambrook R.*, *Di Silvio L.* A novel *ex vivo* culture system for studying bone repair // Injury. 2006. V. 37, No 3. P. 10–17.

21. *Wang T.*, *Yang X.*, *Qi X.*, *Jiang C.* Osteoinduction and proliferation of bone-marrow stromal cells in three-dimensional poly($\varepsilon$-caprolactone)/hydroxyapatite/collagen scaffolds // J. Transl. Med. 2015. V. 13. P. 152.

# 10. ЗАСЕЛЕНИЕ ДЕМИНЕРАЛИЗОВАННОГО КОСТНОГО МАТРИКСА КЛЕТКАМИ ХОНДРОГЕННОГО РЯДА

*Е.И. Щелкунова, А.А. Воропаева, А.В. Корель, Д.А. Майер, В.Т. Подорожная, И.А. Кирилова*

Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.
2018. Т. 7, № 2. С. 102–111

**Основные положения**

- Определен дозозависимый эффект воздействия экстракта деминерализованного костного матрикса (ДКМ) на клетки в лаг- и лог-фазах.
- Подобраны условия очистки ДКМ от агрессивных агентов, токсичных для клеток.
- Определены способы повышения эффективности заселение ДКМ клетками.

**Цель.** Поиск эффективных способов обработки деминерализованной костной ткани после консервации для эффективного заселения хондроцитами.

**Материалы и методы.** В качестве материала исследования использовали деминерализованный костный матрикс (ДКМ) размером $1 \times 1 \times 1$ см$^3$. Для удаления цитотоксических веществ из матриц разработан способ очистки, заключающийся в поэтапном замачивании образца в $H_2O$, растворе 0,1 Н NaOH, растворе 1 Н NaOH, $H_2O$ и DPBS до нейтрального pH. Для улучшения клеточной адгезии на матрицах на последние перед заселением воздействовали ультразвуком. На образец, прошедший химическую очистку 3 раза, воздействовали ультразвуком в течение 1 мин и $W = 5$. После каждого воздействия, воду в емкости меняли. После этого воду в емкости сменили на DPBS и обрабатывали ультразвуком в течение 1 мин и $W = 5$. После окончания процедур образец находился в нейтральной среде (pH 7,0). Обработанные таким способом матрицы заселяли клетками. В качестве источника клеток для заселения была выбрана ткань гиалинового хряща мини-поросенка. Хондроциты выделяли стандартным способом с применением коллагеназы II типа и культивировали в течение 20 сут в культуральных флаконах. Матрицы заселяли хондроцитами 1 пассажа. Для повышения эффективности заселения костного матрикса клетками был апробирован способ предварительной обработки деминерализованной костной ткани 1 %-м раствором желатина. Для определения пригодности матрикса к заселению его хондроцитами использовали микротитрационный тест влия ния экстракта, получаемого в ходе ультразвуковой обработки матрицы,

на жизнеспособность клеток. Тест проводили на лаг- и лог-фазах роста клеток. Воздействие экстракта на клетки длилось 3 сут.

**Результаты.** Показано, что обработка хондроцитов экстрактом на этапе лаг-фазы роста культуры оказывает прямой дозозависимый цитотоксический эффект в отличие от эффекта обработки хондроцитов в фазе логарифмического роста культуры. Показано, что низкая эффективность заселения деминерализованного костного матрикса связана не только с жесткими условиями изготовления ДКМ, но и с условиями последующей подготовки матрицы, фазы роста заселяемой клеточной культуры. С увеличением глубины миграции клеток вглубь матрицы нарушается микроциркуляция, что ведет к недостаточному обеспечению клеток в тканеинженерной конструкции питанием и замедлению метаболических процессов.

**Заключение.** Эффективность равномерного заселения деминерализованного костного матрикса клетками связана не только с условиями обработки матрикса, выраженным цитотоксическим эффектом, но и с его архитектоникой. Проблема замедления метаболизма клеток в тканеинженерной конструкции решается путем комбинированного метода очистки ДКМ химическим и ультразвуковым способом. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости применении механических и электрических стимулов для нормального функционирования клеток костной и хрящевой тканей внутри матрицы.

## 10. SEEDING OF THE DEMINERALIZED BONE MATRIX WITH CHONDROGENIC CELLS

*E.I. Shchelkunova, A.A. Voropaeva, A.V. Korel, D.A. Mayer, V.T. Podorognaya, I.A. Kirilova*

### Highlights

- The dose-dependent effects of the extract-treated demineralized bone matrix (DBM) on the cells growth during the lag- and log-phase have been found.
- Purification methods of DBM from aggressive agents that are toxic to cells have been developed.
- Methods improving cell seeding efficiency of DBM have been proposed.

**Aim.** To determine optimal approaches of demineralized bone tissue processing after preservation to ensure efficient seeding of chondrocytes.

**Methods.** Demineralized bone matrix specimens sized $1 \times 1 \times 1$ cm$^3$ were used in the experiment. A purification method ensuring the removal of cytotoxic substances from the matrices has been developed. It consists of a multi-stage soaking of the specimens in $H_2O$, 0.1 H NaOH, 1 N NaOH, $H_2O$ and DPBS until a neutral pH is reached. After chemical purification (a 3-stage process), all the specimens were subjected to sonication for 1 minute at 5W to improve cell adhesion. The water was changed after each exposure. Then, the water was replaced to DPBS and the specimens were sonicated for 1 minute at 5W. After it, the sample was placed in a neutral medium (pH 7.0). The matrices undergoing sonicated procession were seeded with cells. Hyaline cartilage of minipigs was

used as a source of the cells. Chondrocytes were isolated using collagenase II digestion and cultured for 20 days in the culture flasks. Passage 1 chondrocytes were seeded on the matrices. DBM were pretreated with a 1 % gelatin solution to improve the efficiency of cell seeding. The microtitration viability test estimating the impact of the extract obtained during sonation cycles on cell viability was performed to determine whether these matrices may be seeded with chondrocytes. The test was performed on the lag- and log-phase cells. The effect of the extract on the cells lasted around 3 days.

**Results.** Extract-treated chondrocytes during the lag-phase showed a direct dose-dependent cytotoxic effect, compared to extract-treated chondrocytes during the log-phase. Low efficiency of DBM was associated with both, the stringent requirements for the manufacturing process of DBM and the subsequent matrices processing, including the cell growth phases. The increased cell migration depth into the matrices resulted in the disturbances of the microcirculation, leading to the insufficient cell feeding and slowed down metabolic processes.

**Conclusion.** The efficiency of DBM cell seeding depends on the matrix processing, its cytotoxic effect and architectonics. The problem of slowing down the metabolism of cells in DMB may be solved by the application of the combined purification technique, i. e. chemical and ultrasonic purification methods. The obtained results prove the necessity of using mechanical and electrical stimuli for the normal functioning of bone and cartilage tissue cells within the matrix.

## Введение

Тканевая инженерия в настоящее время является одной из самых многообещающих стратегий восстановления поврежденных органов и тканей и входит в число главных междисциплинарных областей [2, 3]. Для ее реализации необходимы, по крайней мере, два основных компонента: клетки и специализированный носитель клеток (матрикс, scaffold), обеспечивающий условия для нормального протекания процессов гисто- и морфогенеза [1, 4, 5]. Иммобилизация клеток на поверхности матрикса обеспечивает механическую прочность конструкции, имитирует межклеточное вещество костной ткани, взаимодействующее с клетками *in vivo* и обеспечивающее реализацию их функций [2, 6]. Биоматериал матрикса, с одной стороны, выполняет функцию носителя клеток, а с другой — влияет на необходимую дифференцировку хондроцитов. Кроме того, использование матрикса, заселенного клетками, существенным образом упрощает оперативное вмешательство, когда клеточно-матриксный комплекс прямо вносится в дефект хряща без дополнительной фиксации [7]. Оптимальная адгезия культивированных клеток к поверхности носителя — важнейшее условие реализации биологического действия тканеинженерной конструкции [4]. Для успешного исхода данной процедуры матрица должна быть биосовместима с тканью реципиента, структурно

и механически стабильна, должна обеспечить условия для пролиферации и экспансии клеток в объеме матрицы. Кроме того, конструкция должна содержать соответствующие биоактивные вещества, влияющие на дифференцировку клеток [7].

В настоящее время в качестве матриц-носителей для хондроцитов применяются мембраны из гиалуроновой кисоты, коллагена и полимеров (PLA, PGA, PLLA, PLDLA) [7–9], матрицы биологического и синтетического происхождения (агароза, альгинат, метилцеллюлоза, коллаген, гиалуронан, фибрин, углеродистое волокно, гидроксиапатит, пористая полимолочная кисота, дексон, викрил, PDS, политетрафлуороэтилен, полиэстер и другие синтетические полимеры) [1, 7]. Матрицы обеспечивают начальную структуру, могут временно стабилизировать хондроциты в дефекте и направлять их пространственное распределение в пределах ткани, а также обеспечивать синтез коллагена и протеогликанов [7]. Известны примеры культивирования хондроцитов на трехмерных матрицах. Среди четырех распространенных матриц наибольшая дифференцировка хондроцитов была на CaReS®, далее следовали Novocard® 3D, Hyalograft® Си MACI®. Данные матрицы были апробированы в клинических испытаниях по лечению дефектов суставного хряща [10].

Исторически первым подходом к функционализации матриц из декальцинированной и депротеинезированной костной ткани было заселение их клетками (ММСК, хондроцитами, фибробластами) с формированием тканеинженерных конструкций [11]. На сегодняшний день данный подход является одним из наиболее разработанных направлений в тканевой инженерии костной ткани. Однако одной из главных проблем культивирования клеток на матриксах и подложках различной природы является низкая эффективность заселения носителей клетками и их неравномерное распределение по структуре [12]. Оптимальная адгезия клеток к поверхности носителя — важнейшее условие реализации биологического действия ТИК [4, 13]. Адекватное совмещение клеток и матрикса должно рассматриваться как ключевой момент в создании тканеинженерной конструкции [4]. Именно поэтому адгезия клеток, заселяющих матрикс, является важным критерием, определяющим успешность этапа исследований *in vitro*.

Перспективным направлением в развитии восстановительной хирургии костной и хрящевой тканей следует считать получение экспериментального обоснования возможности использования различных замещающих материалов для последующего клинического применения. Для этого необходимо проведение исследований в условиях *in vitro* по изучению взаимодействия между клетками и материалом, чтобы

выявить токсичность материалов, воздействие на морфологию и основные характеристики жизнеспособности клеток (способность к адгезии, пролиферации, сохранению свойств, присущих клеткам ткани, куда будет помещен имплантат) [4]. Высокие требования, предъявляемые к материалам, проходящим доклиническую апробацию, определяют необходимость использования агрессивных методов их обработки. Зачастую материал, теоретически оптимальный для размещения клеток и поддержания их в функционально активном состоянии (ДКМ), в процессе обработки теряет ряд своих положительных свойств, и в том числе адгезионные [13].

**Целью** настоящего исследования являлся поиск эффективных способов обработки деминерализованной костной ткани после консервации для эффективного заселения хондроцитами.

## Материалы и методы

В качестве материала исследования были выбраны матрицы деминерализованной костной ткани или деминерализованный костный матрикс (ДКМ) размером $1 \times 1 \times 1$ см$^3$, предоставленные лабораторией заготовки и консервации тканей ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России. Так как в процессе деминерализации костная ткань подвергается химической обработке и может содержать следовое количество кислот, негативно влияющих на культивируемые клетки, то такие матрицы требуют предварительной подготовки перед заселением их клетками.

Для достижения высокой биосовместимости и эффективного заселения матриксов был поставлен ряд экспериментов по обработке ДКМ. Предложены 2 способа обработки ДКМ для удаления цитотоксических веществ из матриц — химический и химический с применением ультразвука. С целью сохранения стерильности образцов все манипуляции по очистке выполнены стерильными растворами в условиях ламинарного шкафа. При подготовке ДКМ к заселению клетками применяли химические методы обработки. Образец замачивали в воде (pH 7,03) на 24 ч. Затем образец отжимали (pH воды изменился до 6,68). Образец ДКМ обрабатывали водой с добавлением 0,1 H NaOH — на магнитной мешалке в течение 24 ч. Образец повторно отжимали и промывали 10 объемами воды с помощью шприца. Затем образец отжимали и обрабатывали водой с добавлением 1 H NaOH — на магнитной мешалке в течение 16 ч. После обработки образец становился хрупким и мягким, pH раствора 9,3. Далее производили серию последовательных манипуляций по промывке образца с целью снижения pH раствора. Образец промывали водой и DPBS («Биолот», Россия)

по 16 ч в каждом растворе до pH 7,4. Образец, готовый к заселению клетками, хранили в стерильных пробирках, содержащих RPMI 1640 с добавлением 50 % FBS («Gibco», США), 42,19 ед/мл пенициллина, 0,042 мг/мл стрептомицина («Биолот», Россия), 0,053 мг/л амфотерицина B («Biowest», Франция).

Второй способ включал комплекс методов, направленных на улучшение клеточной адгезии на матрицах во время культивирования. Прошедший химическую очистку образец, pH окружающей жидкости которого 7,4, помещали в стерильную воду. На образец 3 раза воздействовали ультразвуком в течение 1 мин и $W = 5$. После каждого воздействия воду в емкости меняли. После первого воздействия pH среды 8,15. После третьего воздействия — pH 7,9. После этого воду в емкости сменили на DPBS («Биолот», Россия) и обрабатывали ультразвуком в течение 1 мин и $W = 5$. После окончания процедур образец находился в нейтральной среде (pH 7,0). Образцы хранили в среде RPMI 1640 после обработки ультразвуком. Обработанные таким способом матрицы заселяли клетками.

В качестве источника клеток для заселения ДКМ была выбрана ткань гиалинового хряща мини-поросенка (экспериментальные животные выведены в хозяйстве ИЦиГ СО РАН). Хрящевую ткань забирали в условиях операционной. Гиалиновый хрящ 15 мин отмывали в растворе Хэнкса с 0,1 % канамицином, измельчали в чашке Петри с минимальным объемом среды RPMI 1640 («Биолот», Россия) до размеров 1–2 мм$^2$, помещали в раствор 1,5 % коллагеназы II типа (Gibco, США) и инкубировали при температуре 37 °C в течение 5–8 ч на шейкере. Суспензию клеток пропускали через нейлоновый фильтр и центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. Хондроциты культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 15 % фетальной сыворотки плодов коров (FBS) («Gibco», США), 42,19 Ед/мл пенициллина, 0,042 мг/мл стрептомицина («Биолот», Россия), 0,053 мг/л амфотерицина B (Biowest, Франция) в культуральных флаконах (TPP, Швейцария) в стандартных условиях $CO_2$-инкубатора: 37 °C и 5 % $CO_2$. Пассирование клеток производили с помощью 0,25 % раствора трипсина («Биолот», Россия). Первичная культура хондроцитов гиалинового хряща мини-поросенка является адгезионной и пролиферирующей культурой.

В экспериментах определяли наиболее эффективный способ заселения матриц ДКМ клетками:

1 — предварительно пропитанную питательной средой матрицу размером $1 \times 1 \times 1$ см$^3$ помещали на клеточный монослой в лунку 6-луночного планшета (TPP, Швейцария); 2 — матрицы размером $1 \times 1 \times 1$ см$^3$, помещенные на дно лунки 6-луночного планшета (TPP, Швейцария), заливали суспензией хондроцитов в концентрации $1{,}5 \cdot 10^6$

в объеме 50 мкл и оставляли на 4 ч. Затем матрицу с клетками заливали культуральной средой. Эксперимент проведен в 3 повторениях. В контрольной серии суспензию хондроцитов в той же концентрации помещали на культуральый пластик 6-луночного планшета (TPP, Швейцария).

Возможность повышения эффективности заселения матриц размером $1 \times 1 \times 1$ см$^3$ изучали путем покрытия ДКМ 0,1 % раствором желатина. Матрицы заселяли суспензий хондроцитов в объеме 50 мкл и оставляли на 4 ч, после этого матрицу с клетками заливали культуральной средой. Эксперимент проведен в 3 повторениях.

Производили прижизненное наблюдение в течение 5 сут. Матрицы, заселенные клетками, фиксировали 4 % раствором формалина и окрашивали DAPI. Оценку интенсивности заселения и равномерного распределения хондрогенных клеток на поверхности и в глубине матриц оценивали с помощью микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения ZEN 2012 (blue edition).

Для определения количества жизнеспособных клеток использовали микротитрационный тест (МТТ-тест). Колориметрический метод с использованием МТТ (бромид3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) основан на способности митохондриальных ферментов живых клеток восстанавливать желтый МТТ-субстрат до темно-синего формазана. Число жизнеспособных клеток прямо пропорционально количеству восстановленного формазана, которое можно определить спектрофотометрически после растворения в органическом растворителе [9].

Экстракт для микротитрационного теста был выделен следующим способом: ДКМ поместили в среду RPMI-1640 («Биолот», Россия) в соотношении объемов 1 : 50 (матрица/раствор), обработали ультразвуком 5 раз по 1 мин без охлаждения с перерывами между воздействиями 1 мин. В полученный раствор (экстракт) добавляли 15 % FBS (Gibco, США), 42,19 ед/мл пенициллина, 0,042 мг/мл стрептомицина («Биолот», Россия), 0,053 мг/л амфотерицина В (Biowest, Франция). Для микротитрационного теста использовали культуру хондроцитов колена мини-поросенка на 3-и и 11-е сутки (лаг- и лог-фазы роста культуры соответственно). Фазы роста определяли самостоятельно путем ежедневного подсчета клеток в динамике культивирования. Клетки культивировали с экстрактом в течение 3 сут в следующих дозах 0,8 %; 1,6 %; 3,1 %; 6,3 %; 12,5 %; 25 %; 50 % (v/v).

Рост культуры в присутствии экстракта оценивали после обработки культуры трипсином с подсчетом клеток в гемоцитометре.

**Результаты**

Матрицы, очищенные химическим способом, имели выраженное цитотоксическое влияние на заселяемые клетки. Поэтому в эксперименте были использованы матрицы ДКМ, очищенные комбинированным способом, — с применением ультразвука.

Через 4 ч после заселения матриц клетками 1 способом при визуальном наблюдении отмечено, что клетки монослоя сохраняют свою форму и целостность, но адгезивной активности в отношении матрицы не выявлено. При заселении 2 способом отмечено, что через 4 ч клетки сохраняют округлую форму и скапливаются в «слепых» лакунах

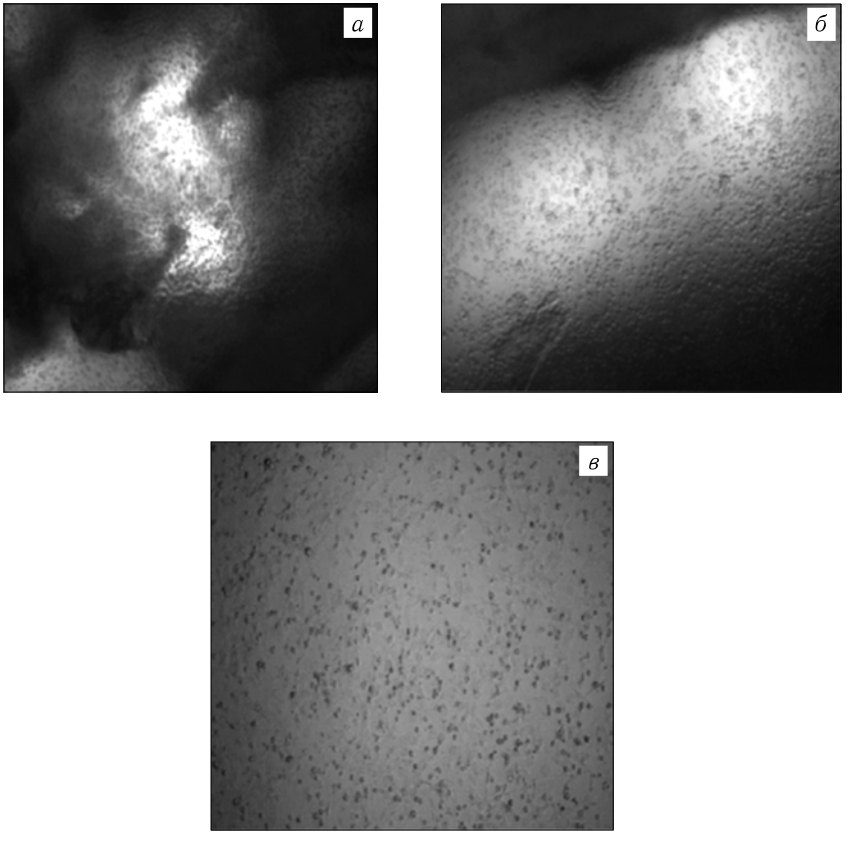


Рис. 10.1. Эффективность заселения ДКМ клетками хондрогенного ряда на 1-е сутки эксперимента: *а*) слепая лакуна матрицы, заполненная округлыми клетками; *б*) адгезия клеток к поверхности культурального пластика вблизи матрицы; *в*) контрольная серия. Высокая степень адгезии хондроцитов к поверхности культуральной посуды

матриц. За пределами матриц так же наблюдали высокую плотность клеток.

Через 1 сут после заселения 1 способом клеток, населяющих матрицу, не обнаружили. При визуальной оценке заселения 2 способом наблюдали округлые клетки в «слепых» лакунах матрицы (рис. 10.1, *а*). Большая часть клеток расположена за пределами матрицы (рис. 10.1, *б*). В контрольной серии наблюдали монослой клеток на разной стадии адгезии (рис. 10.1, *в*).

Через сутки эксперимента отмечена высокая степень насыщения тела матрицы хондрогенными клетками, заселенной 2 способом, но слабая их адгезия в лакунах в сравнении с контрольной серией. Так как заселение ДКМ клетками 1 способом не дало эффективного результата, дальнейшие наблюдения и модификации выполняли по протоколу 2 способа заселения.

На 3-и сутки эксперимента по заселению ДКМ после промывки PBS (Gibco, США) и смены питательной среды визуально отметили снижение количества клеток. Клетки из суспензии, заселенные 2 способом, заполняют все тело матрицы, оседают в слепых лакунах и проходят сквозь матрицу через сквозные лакуны (рис. 10.2, *а*). При этом адгезия клеток к поверхности ДКМ слабая. В контрольной серии на 3-и сутки эксперимента клетки в поле зрения лежат одиночно (рис. 10.2, *б*).

При дальнейшем исследовании ДКМ, заселенных хондроцитами, клетки распределены на поверхности культурального пластика и их численность с течением времени снижается.

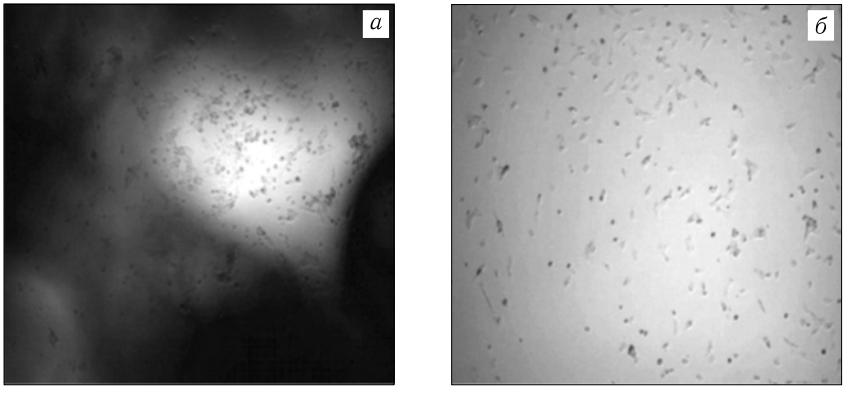


Рис. 10.2. Эффективность заселения ДКМ клетками хондрогенного ряда на 2-е сутки эксперимента: *а*) сквозная лакуна матрицы, заполненная округлыми клетками; *б*) контрольная серия

Для повышения эффективности заселения костного матрикса клетками был апробирован способ предварительной обработки ДКМ 1 % раствором желатина. Обработанную матрицу заселяли клетками способом 2. Культивировали в течение 5 сут. Образец отмывали от неприкрепившихся клеток и окрашивали DAPI. Наблюдали свечение клеточных ядер и адгезию по краю стенки лакуны матрицы (рис. 10.3).

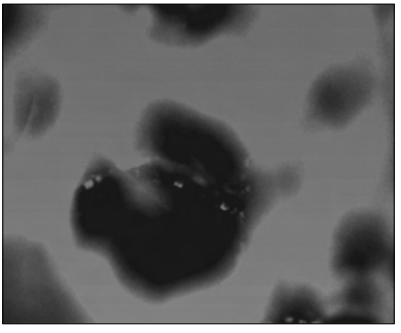

Рис. 10.3. Эффективность заселения ДКМ, обработанного ультразвуком и покрытого 1 % раствором желатина клетками хондрогенного ряда на 5 сут, окрашено DAPI

При окрашивании DAPI матрицы, не покрытой желатином и заселенной клетками, не выявили свечения ядер в области лакуны. Через 5 сут отметили высвобождение клеток из матрицы и переход их в состояние суспензии.

Слабая адгезия клеток к поверхности ДКМ, снижение численности популяции клеток в экспериментальной серии и переход хондроцитов в суспензию свидетельствует о влиянии ДКМ на жизнеспособность клеток. Для выяснения причин этого явления провели микротитрационный тест экстракта, получаемого в ходе ультразвуковой обработки матрицы в растворе среды RPMI объемом, равным 50 объемам матрицы. Тест проводили на лаг- и лог-фазах роста клеток. Воздействие экстракта на клетки длилось 3 сут (рис. 10.4).

Показано, что обработка хондроцитов экстрактом в лаг-фазе роста культуры оказывает на клетки прямой дозозависимый цитотоксический эффект. Максимальное количество жизнеспособных клеток после 3 суток культивирования в присутствии экстракта наблюдали в контроле, а минимальное количество — при содержании 50 % экстракта в культуральной среде.

Жизнеспособность клеток увеличивается по мере снижения концентрации экстракта в культуральной среде.

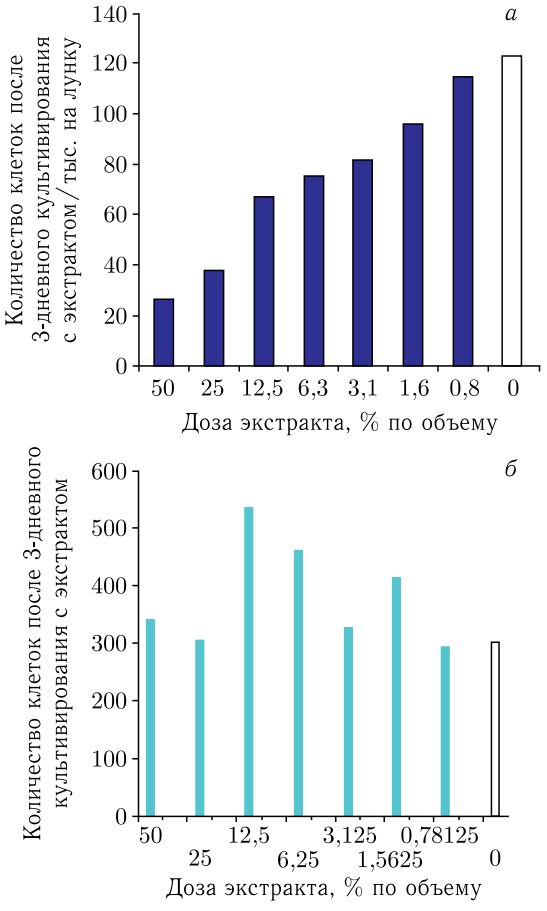


Рис. 10.4. Влияние экстракта ДКМ на хондроциты в течение 3 суток: *а*) воздействие на клетки в лаг-фазе роста культуры; *б*) воздействие на клетки в лог-фазе роста культуры $n = 2$

## Обсуждение

Результаты исследования показали, что более эффективным способом очистки матриц ДКМ является комбинированный способ с последующим применением химической и ультразвуковой обработок. Применение ультразвука при очистке матриц от следовых концентраций химических веществ повышает эффективность заселения клетками и время их жизнеспособности в теле матрицы. Поэтому из двух апробированных в данном исследовании способов обработки матриц,

химического и комбинированного, последний способ был использован для подготовки матриц перед заселением.

При заселении матриц двумя способами показано, что ДКМ не обладает достаточными адгезионными свойствами для культивируемых клеток: обработка агрессивными веществами в ходе технологической подготовки образцов, необходимая для избавления от клеточного материала, приводит к потере ДКМ ряда своих положительных свойств, в том числе и адгезивных [4]. Можно предположить, что агрессивные агенты, используемые при обработке костной ткани и технологическом производстве ДКМ, сохраняются в глубинных зонах ДКМ и удалить их химическим и механическим путями невозможно. При длительном культивировании хондроцитов в присутствие ДКМ повышается концентрация агрессивных веществ в культуральной среде, что отрицательно влияет на жизнеспособность клеток.

Для подтверждения этого явления провели микротитрационный тест экстракта, получаемого в ходе ультразвуковой обработки матрицы.

Жизнеспособность клеток увеличивается по мере снижения концентрации экстракта в культуральной среде. При обработке клеток экстрактом в фазе логарифмического роста культуры цитотоксический эффект не наблюдали. Максимальное количество жизнеспособных клеток после 3 сут культивирования наблюдали при концентрации экстракта 12,5 %, а минимальное — при концентрации 25 %. Таким образом, в присутствии в среде культивирования экстракта с концентрацией от 12,5 до 6,25 % цитотоксический эффект не обнаружен. Возможно, это связано с модификацией белков или содержанием в экстракте факторов роста, которые положительно повлияют на пролиферативную активность клеток в фазе логарифмического роста. Для подтверждения этого предположения требуются дальнейшие биохимические исследования.

Возможно, эффективность равномерного заселения клеточными элементами деминерализованного костного матрикса связана не только с условиями обработки матрикса, но и с его архитектоникой. Клеткам сложно прикрепиться к поверхности, расположенной под углом, поэтому они концентрируются в «слепых» лакунах и на их стенках. С увеличением глубины миграции клеток внутри матрицы нарушается микроциркуляция, что ведет к недостаточному обеспечению клеток питанием, низкой скорости передачи гуморальных сигналов и ответа клеток на них, отвода метаболитов, производимых клетками, т. е. к замедлению метаболизма клеток в тканеинженерной конструкции. Последние исследования в этой области свидетельствуют о необходимости механических и электрических стимулов для нормального функционирования клеток костной и хрящевой ткани. Однако при конструировании матриц и имплантатов это пока учитывается недостаточно.

## Заключение

1. Более эффективным способом очистки матриц ДКМ является комбинированный способ с последующим применением химической и ультразвуковой обработки.

2. Применение ультразвука повышает эффективность заселения матриц клетками и время их жизнеспособности в теле матрицы.

3. Апробированы 3 способа заселения ДКМ клетками хондрогенного ряда. Способ 1 (помещение матрицы на поверхность монослоя) оказался неэффективным. Матрица не контактирует плотно с монослоем и поверхностью культуральной посуды. Способ 2 (заселение ДКМ клеточной суспензией) оказался более эффективным. Суспензия клеток заполняет все тело матрицы, оседает в слепых лакунах и проходит сквозь матрицу через сквозные лакуны. При этом адгезия клеток к поверхности матрицы слабая. Способ 3 (заселение измельченной ДКМ клеточной суспензией) также оказался малоэффективным.

4. Покрытие ДКМ 1 %-м раствором желатина повышает эффективность адгезии клеток к поверхности матрицы.

5. Заселение клетками матрицы следует производить в лог-фазе, поскольку в течение лог-фазы цитотоксический эффект состава матрикса может не влиять на их жизнеспособность и адгезивные свойства.

## Список литературы

1. *Больбасов Е.Н.*, *Антонова Л.В.*, *Матвеева В.Г. и др.* Изменение поверхностных свойств и биосовместимости матриксов из поликапролактона, модифицированных плазмой высокочастотного магнетронного разряда // Биомедицинская химия. 2016. Т. 62, № 1. С. 56–63. doi: 10.18097/PBMC20166201056

2. *Кузнецова Д.С.*, *Тимашев П.С.*, *Баграташвили В.Н.*, *Загайнова Е.В.* Костные имплантаты на основе скаффолдов и клеточных систем в тканевой инженерии (обзор) // Современные технологии в медицине. 2014. Т. 6, № 4. С. 201–212.

3. *Chan B.P.*, *Leong K.W* Scaffolding tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations // Eur Spine J. 2008. V. 17 (Suppl. 4). P. 467–479.

4. *Александрова С.А.*, *Нащекина Ю.А.*, *Цупкина Н.В.* Методологические подходы создания тканеинженерных конструкций для восстановления дефектов костной и хрящевой тканей (опыт Института цитологии РАН) // Клеточные культуры. 2016. Т. 32. С. 95–104.

5. *Kirilova I.A.*, *Sharkeev Yu.P.*, *Nikolaev S.V.* Physicomechanical properties of the extracellular matrix of a demineralized bone // AIP Conf. Proc. 2016. V. 1760, No 1. P. 020027. doi://doi.org/10.1063/1.4960246

6. *Вахрушев И.В.*, *Антонов Е.Н.*, *Попова А.В. и др.* Разработка тканеинженерных имплантов для регенерации костной ткани на основе полилактогликолидных скаффолдов нового поколения и мультипотентных мезенхимальных клеток пульпы молочного зуба (SHED-клеток) // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2012. Т. 1. С. 29–33.

7. *Торгомян А.Л.*, *Гамбарян А.К.*, *Асратян А.А.*, *Худавердян Д.Н.* Современные методы восстановления суставного гиалинового хряща при остеоартрите // Медицинская наука Армении НАН РА. 2014. Т. LIV, № 1. С. 23–37.

8. *Behrens P.*, *Ehlers E.M.*, *Kochermann K.U.*, *Rohvedel J.*, *Russlies M.*, *Plotz W.* New therapy procedure for localized cartilage defects. Encouraging results with autologous chondrocyte implantation // MMW Fortschr. Med. 1999. V. 141. P. 49–51.

9. *Копелев П.В.*, *Нащекина Ю.А.*, *Александрова С.А.* Оценка жизнеспособности хондроцитов кролика при культивировании на полилактидных скаффолдах, предназначенных для тканевой инженерии хрящевой ткани // Бюллетень инновационных технологий (БИТ). 2017. Т. 1, № 2. С. 31–35.

10. *Советников Н.Н.*, *Кальсин В.А.*, *Конопляников М.А.*, *Муханов В.В.* Клеточные технологии и тканевая инженерия в лечении дефектов суставной поверхности. Клиническая практика. 2013. Т. 1. С. 52–66.

11. *Сергеева Н.С.*, *Комлев В.С.*, *Баринов С.М. и др.* Эволюция взглядов на материалы, предназначенные для замещения костно-хрящевых дефектов. Биотехнология: состояние и перспективы развития // Материалы VIII Московского международного конгресса. ЗАО «Экспо-биохимтехнологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева. 2015.

12. *Pallante A.L.*, *Chen A.C.*, *Ball S.T. et al.* The *in vivo* performance of osteochondral allografts in the goat is diminished with extended storage and decreased cartilage cellularity // Am. J. Sports Med. 2012. V. 40, No 8. P. 1814–1823. doi: 10.1177/0363546512449321

13. *Деев Р.В.*, *Цупкина Н.В.*, *Бозо И.Я. и др.* Тканеинженерный эквивалент кости: методологические основы создания и биологические свойства. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011. Т. 6, № 1б. С. 62–67.

# 11. ОЦЕНКА *IN VITRO* ВЛИЯНИЯ АЛЛОГЕННОЙ КОСТНОЙ МАТРИЦЫ НА ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ПРИ СОЗДАНИИ КОМБИНИРОВАННЫХ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ

*Л.А. Черданцева, Е.А. Анастасиева, Д.Я. Алейник, М.Н. Егорихина, И.А. Кирилова*

Травматология и ортопедия России. 2021. Т. 27, № 1. С. 53–65

**Цель исследования** — оценка *in vitro* влияния нативной и депротеинизированной компактной и губчатой аллогенных костных матриц на характеристики мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани (МСК ЖТ) для создания эффективной комбинированной тканеинженерной конструкции.

**Материал и методы.** Исследовали 24 образца нативной и депротеинизированной компактной и губчатой костной ткани, которые подвергали механической обработке, моделированию с последующей стерилизацией образцов ионизирующим излучением и бактериологическим контролем стерилизации. Часть образцов проходила процедуру депротеинизации. В качестве тестовых культур для оценки взаимодействия с исследуемыми образцами костной ткани использовали охарактеризованные культуры МСК ЖТ человека. Для характеристики выраженности адгезии, миграции и жизнеспособности МСК на образцах костного матрикса использовали флуоресцентный имиджер Cytation-5 и флуорохромы Hoechst 3334 (BD Pharmingen™) и кальцеин (Calcein AM, BD Pharmingen™). Цитотоксичность матриц оценивали с помощью МТТ-теста после 1 и 7 сут. экстракции. Результаты. Образцы исследуемых костных матриц характеризуются отсутствием цитотоксичности (ранг 1). Это сопровождается хорошей адгезией и миграцией МСК ЖТ на любой поверхности костного матрикса и сохранением жизнеспособности клеток в течение 7 сут. Наблюдения. В большей степени изменения касаются увеличения размеров ядер клеток, адгезированных на депротеинизированной костной матрице губчатой структуры, на 25–30 % по сравнению с величиной аналогичного параметра на других образцах. При этом размеры клеток на депротеинизированной костной матрице несколько больше (величина ядер клеток с 8,8 до 11,5 мкм, средняя площадь ядер клеток от 86,3 мкм до 129,0 мкм, средний периметр ядер клеток с 30,7 мкм до 40,7 мкм), чем на образцах нативной костной матрицы. Заключение. Результаты исследования различных аллогенных костных матриц

демонстрируют, что глубокая степень очистки костной матрицы определяет отсутствие цитотоксичности и наиболее благоприятные условия для адгезии, миграции, пролиферации и жизнеспособности МСК ЖТ. Это обусловливает возможность создания тканеинженерных конструкций на основе матриц из костной ткани различной структуры. Наилучшим образом для этой цели подходят депротеинизированные губчатые костные матрицы.

**Ключевые слова:** тканеинженерные конструкции, депротеинизированная и нативная костная матрица, губчатая и компактная структура, мезенхимальные стромальные клетки, адгезия, миграция клеток, жизнеспособность, ядра клеток.

**Источник финансирования:** грант Российского фонда фундаментальных исследований № 15-29-04875.

## 11. *IN VITRO* EVALUATION OF THE ALLOGENEIC BONE MATRIX EFFECT ON THE ADIPOSE MESENCHYMAL STROMAL CELLS CHARACTERISTICS IN COMBINED TISSUE ENGINEERING

*L.A. Cherdantseva, E.A. Anastasieva, D.Ya. Aleinik, M.N. Egorikhina, I.A. Kirilova*

The aim of the study was to evaluate *in vitro* the effect of native and deproteinized compact and spongy allogenic bone matrices on the characteristics of adipose mesenchymal stromal cells (ASC) in combined tissue engineering.

**Material and Methods.** 24 samples of native and deproteinized compact and spongy bone were examined, which were exposed to mechanical treatment, modeling, followed by sterilization of the samples by ionizing radiation and bacteriological control of sterilization. Some of the samples underwent deproteinization. The characterized cultures of human ASC were used as test cultures to assess the interaction with the bone samples. The Cytation-5 fluorescent imager and Hoechst 3334 fluorochromes (BD Pharmingen™) and calcein (Calcein AM, BD Pharmingen™) were used to characterize the degree of adhesion, migration, and viability of ASC on bone matrix samples. Matrix cytotoxicity was evaluated by MTT assay on days 1 and 7 of extraction.

**Results.** The bone matrix samples are characterized by the absence of cytotoxicity (rank 1). ASC demonstrated good adhesion and migration on any surface of the bone matrix and preservation of cell viability during 7 days of observation. Nuclei sizes of the cells adhered to the deproteinized bone matrix of the spongy structure increased by 25–30 % compared to other samples. The cells on deproteinized bone matrix had greater size (the size of the cells from nuclei 8.8 to 11.5 $\mu$m, the average size of cells nuclei from an 86.3 $\mu$m to 129,0 $\mu$m, the average perimeter of the cells nuclei from 30.7 $\mu$m to 40.7 $\mu$m) than in the native bone matrix samples.

**Conclusion.** The results of the study of various allogeneic bone matrices demonstrate that deep purification of the bone matrix determines the absence

of cytotoxicity and the most favorable conditions for the adhesion, migration, proliferation and viability of ASC. Also makes it possible to use tissue engineering based on bone matrices of different structures. Deproteinized spongy bone matrices are best suited for this purpose.

**Keywords:** tissue engineering, deproteinized and native bone matrix, spongy and compact bone, mesenchymal stromal cells, adhesion, cell migration, viability, cells nuclei.

**Funding:** grant of the Russian Foundation for Basic Research No 15-29-04875.

## Введение

В настоящее время увеличивается потребность в костнопластических материалах для оказания высокотехнологичной медицинской помощи в травматологии, ортопедии и челюстно-лицевой хирургии пациентам, нуждающимся в замещении костных дефектов и восполнении участков атрофии костной ткани разного этиопатогенеза [1, 2, 3, 4]. Характер регенеративных процессов костной ткани при замещении костного дефекта в значительной мере определяется свойствами самого костнозамещающего материала [1, 3, 5]. Существующие искусственные костнозамещающие материалы не обладают необходимыми характеристиками, в полной мере отвечающими свойствам костной ткани [1, 6, 7]. Несмотря на то, что «золотым стандартом» при замещении патологически измененных участков костной ткани в рамках реконструктивно-пластического хирургического лечения является аутотрансплантат, в качестве альтернативы, оптимально соответствующей по своим структурно-функциональным характеристикам аутокости, применяются аллотрансплантаты [7–10]. В качестве терапевтически эффективных можно рассматривать аллотрансплантаты из губчатого вещества костной ткани, использование которых обеспечивает адекватную васкуляризацию как одно из основополагающих условий для реализации органотипического репаративного остеогенеза. Однако наиболее перспективным направлением можно считать разработку и использование комбинированных тканеинженерных конструкций на основе аллокости в качестве матрицы для мезенхимальных стромальных клеток (МСК) с целью активации репаративного остеогенеза патологически измененной костной ткани [2, 11–13].

**Цель исследования** — оценка *in vitro* влияния нативной и депротеинизированной компактной и губчатой аллогенных костных матриц на характеристики МСК из жировой ткани для создания эффективной комбинированной тканеинженерной конструкции.

Задачи исследования:

1) изучение с использованием цифрового имиджера Cytation 5 адгезии МСК к костному матриксу;

2) изучение миграции МСК в межбалочные пространства;

3) изучение жизнеспособности МСК на костном матриксе.

Заявленные цели исследования сформулированы на основе нашего понимания механизмов реализации процесса заселения костных матриц МСК при создании тканеинженерных конструкций, а именно:

- заселение костных матриц мезенхимальными стромальными клетками — результат миграции, пролиферации и дифференцировки данных клеток;
- процесс миграции мезенхимальных стромальных клеток вглубь костной матрицы зависит от подвижности самих клеток и свойств матрицы (механика, геометрия, химический состав поверхностей и др.);
- пролиферация и дифференцировка мезенхимальных стромальных клеток на костной матрице зависят от концентрации питательных и регуляторных компонентов среды на которую, в свою очередь, в определенной степени влияет химический состав матрицы;
- распределение уровня концентраций компонентов среды определяется диффузией молекул и потреблением их клетками на костной матрице.

## Материалы и методы

*Обработка и стерилизация образцов аллогенного костнопластического материала.* Изготовление опытных и контрольных образцов костнопластического материала осуществляли из губчатой костной ткани головок бедренной кости, полученных от пациентов-доноров в ходе выполнения артропластики тазобедренного сустава. В работе использовали костную ткань от доноров с отрицательными результатами исследований на гемотрансмиссивные инфекции (RW, гепатиты В и С, ВИЧ-инфекция). Депротеинизированный костнопластический материал заданного размера с необходимыми характеристиками изготавливали экспериментальным многоэтапным модифицированным способом обработки (патент на изобретение RU 2223104 C2 от 10.02.2004) с последующей стерилизацией ионизирующим излучением. На 1-м этапе осуществляли механическое моделирование губчатой костной ткани для получения образцов необходимой формы и размеров — кубические блоки $1{,}0 \times 1{,}0 \times 1{,}0$ см. На 2-м этапе подготовки выполняли последовательную химическую децеллюляризацию образцов от органических компонентов до следового уровня содержания альбумина в фрагментах костной ткани [7]. В последующем осуществляли просушивание образцов и упаковку в индивидуальные промаркированные двойные полиэтиленовые упаковки. На 3-м этапе осуществляли стерилизацию гото-

вых образцов костнопластического материала на установке линейного ускорителя электронов ИЛУ-10 (свидетельство №4/411-0314-18) дозой облучения 25 кГц с последующим бактериологическим контролем стерилизации [13].

Исследование *in vitro* выполнено на 24 образцах (по 6 образцов в каждой группе исследования): нативной аллогенной губчатой; нативной аллогенной компактной; депротеинизированной аллогенной губчатой и депротеинизированной аллогенной компактной костной ткани.

В качестве тестовых культур в работе использовали стерильные культуры дермальных фибробластов (ДФЧ) и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани (МСК-ЖТ) человека.

*Методика выделения и культивирования культуры дермальных фибробластов человека.* Для получения клеточной культуры ДФЧ использовали метод тканевых эксплантатов [14]. Использовали биоптаты патологически неизмененной кожи (фрагменты невостребованной после косметических операций кожи размером до 1 $см^2$) от пациентов с отрицательными результатами исследований на RW, гепатиты В и С, и ВИЧ-инфекцию и отсутствием в анамнезе онкологических заболеваний, туберкулеза и заболеваний кожи. Биоптаты кожи забирали в стерильных условиях операционной во флаконы со стерильной ростовой средой 199 с добавлением 1 %-го раствора антибиотиков (пенициллин/стрептомицин). Работа с исходным материалом и клеточными культурами проходила в культуральном боксе в условиях ламинара. Образцы кожи тщательно промывали средой с антибиотиками (среда 199,1 % пенициллина/стрептомицина для культур клеток), очищали от подкожно-жировой клетчатки и подвергали ферментативной обработке. Использовали холодовую трипсинизацию (трипсин 0,25 %) в течение 18 часов при температуре 4 °С. После ферментативной обработки кусочки кожи механически измельчали до размеров 0,1 $см^2$ и в шахматном порядке раскладывали в культуральные флаконы Costar 25 $см^2$. В качестве культуральной среды использовали среду ДМЕМ с добавлением 1 % антибиотиков, 2 % глутамина и 10 % телячьей эмбриональной сыворотки. Все реактивы и среды, использованные в работе, фирмы ООО «НПО ПанЭко», Россия; разовый стерильный культуральный пластик Costar, США.

Культивирование проходило в условиях $CO_2$-инкубатора при 5 % $CO_2$, температуре 37 °С, абсолютной влажности. По достижении субконфлюэнтного монослоя (80 %) осуществляли пересев клеток. Ежедневный контроль формирования монослоя и стерильности культуры клеток осуществляли с помощью инвертированного микроскопа

Leica DMI 3000 B (Германия). Контрольное исследование культуры клеток на микоплазменную и вирусную контаминацию (вирусы герпеса, цитомегаловирус, вирус Эпштейна–Барр) осуществляли методом полимеразой цепной реакции (ПЦР) с использованием системы Rotor-Gene 6000 (Австралия) и наборов реагентов ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора. Для исследований *in vitro* использовали культуры ДФЧ на 4–6 пассаже. Культура фибробластов использовалась для проведения МТТ-теста.

*Методика выделения и культивирования мультипотентных МСК ЖТ человека.* Образцы подкожно-жировой клетчатки получали в стерильных условиях с последующей тщательной многократной обработкой стерильным раствором Хенкса с антибиотиками (100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина) для удаления примеси крови и помещали в стерильные пробирки объемом 50 мл. В качестве транспортной среды использовали фосфатно-солевой буфер (PSB, Gibco) и при температуре +4 °C. Клетки из жировой ткани выделяли с помощью механической дезагрегации и тепловой ферментативной обработки 0,2 % раствором коллагеназы 1 типа (Sigma) в течение 1 ч. Культивирование проводили в атмосфере 5 % $CO_2$ при 37 °C и абсолютной влажности. В качестве ростовой среды использовали среду $\alpha$-MEM (Sigma, США), с добавлением антибиотиков (100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина), 2 % глутамина и 20 % ТЭС (Gibco), культуральные флаконы Costar, США. После формирования субконфлюэнтного монослоя (70–80 %) культуру пересевали. В экспериментах для исследования взаимодействия с образцами использовали культуру клеток 3–4 пассажа.

*Методика визуализации нативной культуры.* Визуализацию нативной и окрашенной культуры проводили с помощью инвертированного микроскопа Leica DMI 3000B с программным обеспечением визуализации изображений LAZ. V. 3.4 и возможностью фотофиксации и видеоархивирования. Для оценки характера монослоя использовали увеличение 5 × 10 ×. Для исследования морфофункционального состояния клеток использовали увеличение × 100, × 200 и метод фазового контраста.

*Определение концентрации клеток и количества жизнеспособных клеток в культуре.* Количество клеток подсчитывали в камере Горяева. В каждой серии использовали данные, полученные при подсчете не менее чем в четырех камерах. Кроме того, подсчет концентрации клеток дублировали с помощью счетчика клеток Countess. Долю мертвых клеток в культуре определяли с использованием исключающей окраски трипановым синим.

**Оценка дифференцировочного потенциала МСК**

Дифференцировочный потенциал клеток оценивали на культурах клеток 3-го пассажа. Для проведения дифференцировки применяли набор Hyman Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit (R and D systems, USA). В качестве специфических красителей использовали: Oil Red (Sigma, США) — для окраски липидных вакуолей; ализариновый красный (Sigma, США) — для выявления солей кальция в процессе дифференцировки в остеобласты; хондрогенную дифференцировку оценивали по образованию в среде специфических шариков (pellet) и отложению коллагена 2-го типа с помощью антител к коллагену 2-го типа (polyclonal antibody to Collagen II, Abcam, ab34712).

*Определение фенотипа МСК и ДФЧ.* Фенотип клеток определяли с использованием панели моноклональных антител CD 90Fitc, CD 105PE, CD 73PE, CD 44 Fitc , CD 10 PC7, CD 45 PC5, CD 14PC5, CD HLA-DRPC7 (Becman Coulter, USA) с соответствующими изотипическими контролями. Исследования проводили на цитофлуориметре BD FACS CANTO II, (Betman Dickinson, USA). Результаты выражали в процентах, как долю клеток, экспрессирующих соответствующий маркер от общего количества клеток.

*Определение адгезии клеток и жизнеспособности МСК-ЖТ при культивировании на образцах костной матрицы.* Для оценки адгезии и жизнеспособности клеток на поверхности образцов суспензию МСК-ЖТ 3-го пассажа в концентрации $2 \cdot 10^6$/мл засевали на поверхность образцов в небольшом объеме среды. Через 2–3 мин после введения клеточной суспензии добавляли ростовую среду до общего объема 2 мл с целью полного погружения образцов с клетками в среду и инкубировали в $CO_2$-инкубаторе при стандартных условиях. Контроль роста культуры осуществляли в течение 96 ч с видеоархивированием каждые 24 ч. Смену ростовой среды проводили каждые 48 ч. Культивирование и контроль роста культуры клеток осуществляли в течение 96 ч с видеоархивированием каждые 24 ч. Через 24, 48 и 96 ч культивирования часть образцов отбирали для исследования методом флуоресцентной микроскопии, который был реализован на многофункциональном фотометре-имиджере Cytation 5 (BioTek, USA), позволяющем визуализировать клетки не только на гладкой поверхности, но и в структуре пористого материала.

Прижизненное окрашивание ядер клеток и маркировку живых клеток, адгезировавшихся на образцах, характеристику их морфологии проводили с применением флуорохрома Hoechst 3334 (BD Pharmingen™) и кальцеина (Calcein AM, BD Pharmingen™) в соответствии с протоколами производителя.

*Для оценки цитотоксичности материала использовали стандартный МТТ-тест* [15]. В качестве тестовой культуры использовали культуру дермальных фибробластов человека 4–5-го пассажа, полученную в лаборатории биотехнологий университетской клиники ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России. Культура был стерильна, микоплазмами и вирусами не контаминирована. Жизнеспособность клеток в культуре перед вводом в эксперимент составляла 97 %.

Испытуемые образцы заливали средой DMEM с 1 % антибиотиков (пенициллин/стрептомицин) и 2 % телячьей эмбриональной сыворотки на 1 сут и 7 сут для получения экстракта и помещали в $CO_2$ инкубатор при стандартных условиях. Через сутки или через 7 суток экстракт над образцами отбирали. Клетки в концентрации $1 \cdot 10^5$/мл засевали на лунки плоскодонного 96-луночного планшета в среде DMEM с 1 % антибиотиков и 10 % инактивированной телячьей эмбриональной сыворотки и культивировали при 37 °C, 5 % $CO_2$ и абсолютной влажности в течение 3 дней. После 3 дней культивирования ростовая среда над клетками заменялась экстрактом от образцов в различной концентрации (1 : 1; 1 : 2; 1 : 4). Через 24 ч культивирования с экстрактом среда в лунках заменялась раствором МТТ и клетки инкубировались с МТТ еще 4 ч. Раствор МТТ готовился в концентрации 1 мг/мл в сбалансированном растворе Хенкса. Через 4 ч инкубации супернатант осторожно отбирали, добавляли ДМСО (200 $\mu$l), после чего регистрировали оптическую плотность (ОП) при 540 нм на анализаторе Sunrise (Австрия).

Относительную интенсивность роста клеток (ОИР) определяли по следующей формуле:

$$\text{ОИР}\ (\%) = \frac{\text{Средняя ОП в тестовой культуре}}{\text{Средняя ОП в контроле}} \cdot 100,$$

где ОП — оптическая плотность.

Полученные данные выражали в условных единицах ОП, ОИР в процентах, а затем оценивали, ориентируясь на ранговую шкалу оценки цитотоксичности [16].

*Статистический анализ.* Результаты исследований обрабатывали методами непараметрической статистики с применением критерия парных сравнений Вилкоксона при помощи пакета программ STATISTICA 6.0.

## Результаты

*Обработка и стерилизация образцов аллогенного костнопластического материала.* Весь обработанный материал был представлен нативной и депротеинизированной аллогенной костной тканью

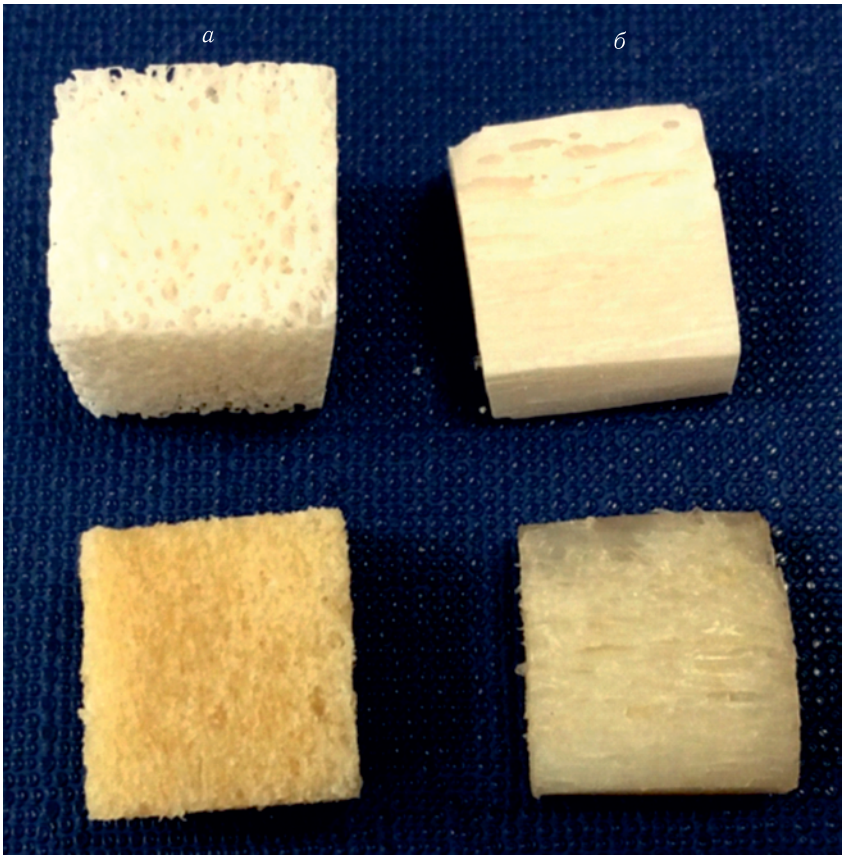


Рис. 11.1. Костные блоки: *а* — губчатой структуры; *б* — компактной структуры; верхний ряд — депротеинизированные; нижний ряд — нативные

губчатой и компактной структуры в форме кубических блоков размером 1,0 × 1,0 × 1,0 см (рис. 11.1).

Готовые образцы после стерилизации и маркировки использовали для запланированных исследований.

*Определение адгезии клеток и жизнеспособности МСК-ЖТ при культивировании на образцах костной матрицы.* Перед началом исследования клетки были охарактеризованы. Морфологически в течение всего времени наблюдения клетки представляли собой типичные фибробластоподобные клетки, с выраженными отростками, четкими контурами, гомогенной цитоплазмой. Жизнеспособность клеток в культуре составляла 97–98 %. Фенотип был характерен для мезенхимальных клеток: CD90+, CD105+, CD73+, CD44+, CD10+, CD45–, CD14–,

CD34–, CD HLA DR–. Клетки были способны дифференцироваться в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлениях.

Изучали возможность заселения мезенхимальными стромальными клетками из жировой ткани (МСК-ЖТ) костного матрикса разной структуры (компактной и губчатой) и разной степенью физико-химической обработки (нативный — минимальная обработка и депротеи-

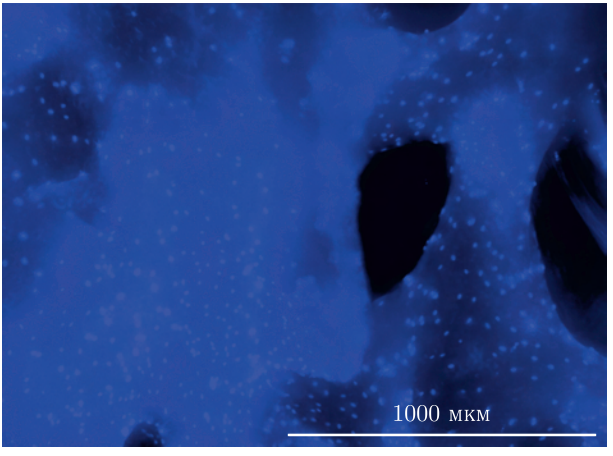


Рис. 11.2. Ядра клеток на образце депротеинизированной костной матрицы губчатой структуры (костнопластический материал «Депротекс»). Сшитая Z-stack фотография. Флуорохром Hoechst 33342. Ув. × 40

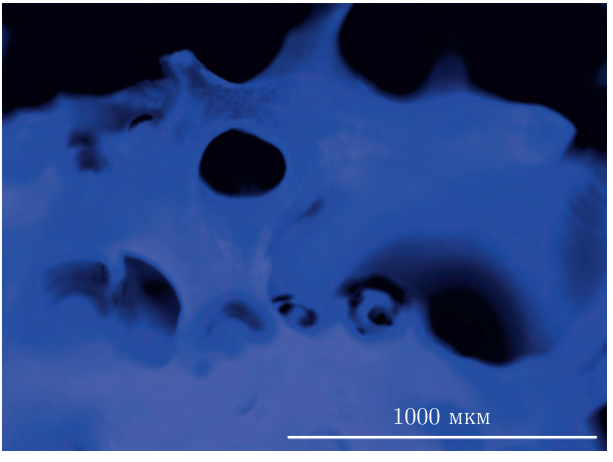


Рис. 11.3. Образец депротеинизированной костной матрицы губчатой структуры (костнопластический материал «Депротекс») без клеток. Флуоресцентная микроскопия. Флуорохром Hoechst 33342. Ув. × 40

низированный, т. е. практически полностью лишенный органического компонента кости).

Исследование характера адгезии МСК ЖТ на образцах костных матриц в полях зрения при разном увеличении выявили отчетливую визуализацию ядер клеток как через 48 ч, так и через 144 ч (рис. 11.2). В то же время на образцах контрольных серий (только костная матрица) клетки отсутствовали (рис. 11.3).

При изучении образцов нативной компактной костной ткани (кортикальный фрагмент) с увеличением $\times 40$ было проанализировано

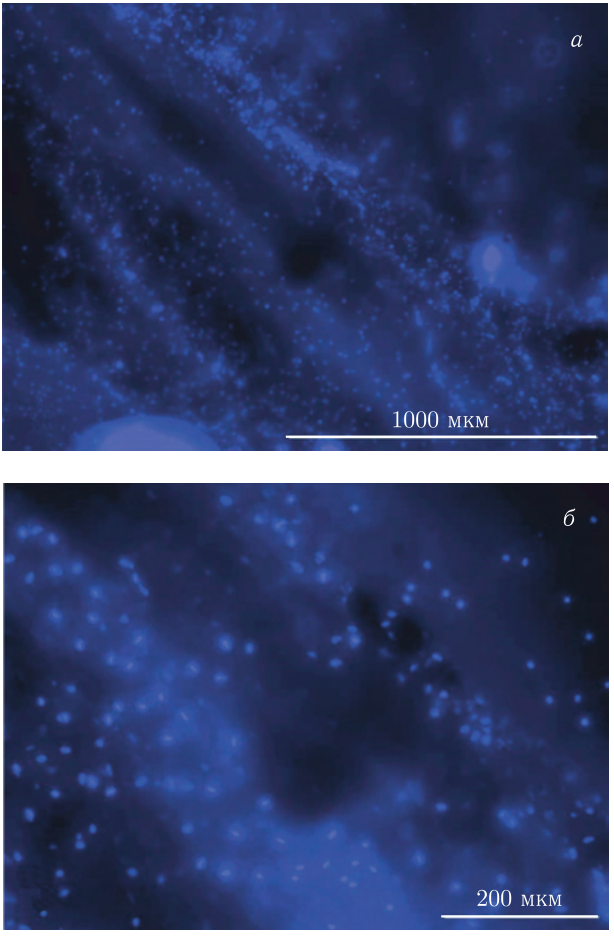


Рис. 11.4. Адгезия клеток на нативном костном матриксе компактной структуры (внутренняя поверхность распила): *а* — ув. $\times 40$; *б* — ув. $\times 100$. Синим цветом окрашены ядра клеток. Флуорохром Hoechst 33342

по 886 ядер клеток со средним размером ядер 8,8 мкм (от 5,0 до 23 мкм) (рис. 11.4). При этом средняя площадь ядер клеточных элементов составляла 86,3 мкм (от 13 до 408 мкм), а средний периметр ядер — 30,7 мкм (от 14,6 до 91,3 мкм).

Отмечена равномерная адгезия клеток на поверхности образцов нативной компактной костной ткани, соответствующая архитектонике образцов: на выпуклых поверхностях ядра клеток визуализировались более компактно и скученно, в зонах гаверсовых каналов визуализация

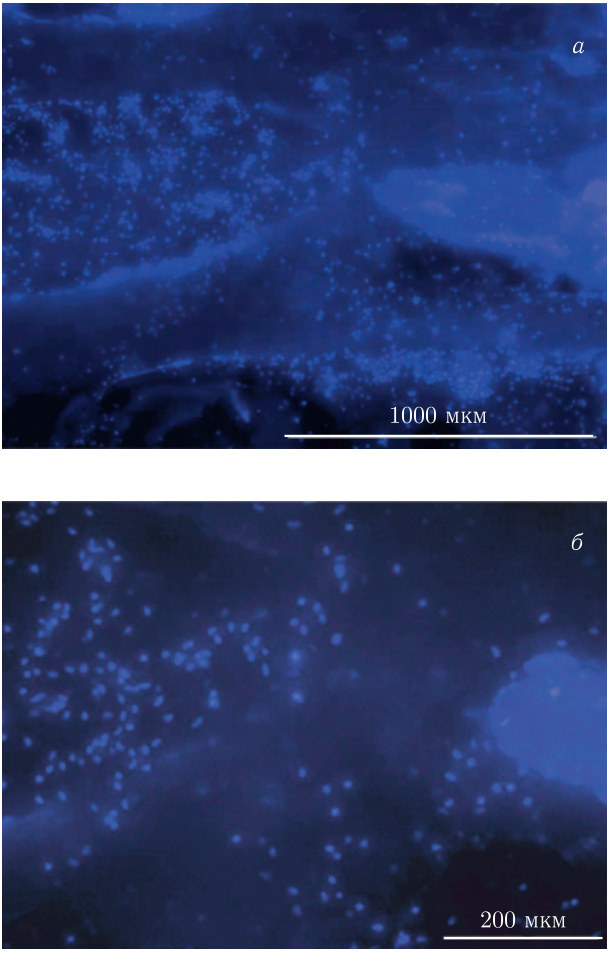


Рис. 11.5. Адгезия клеток на депротеинизированных костных матрицах компактной структуры (внутренняя поверхность распила): *а* — ув. × 40; *б* — ув. × 100. Флуорохром Hoechst 33342

ядер была меньшей и затруднена за счет изменения плоскости поверхностей для адгезии клеток.

На следующем этапе исследования изучили миграцию клеток в толщу костного матрикса с 1-х по 7-е сут. Местами ядра клеток располагаются очень скученно, что может служить косвенным признаком процессов деления.

При изучении депротеинизированного кортикального фрагмента при увеличении $\times 40$ было проанализировано 1056 ядер клеток

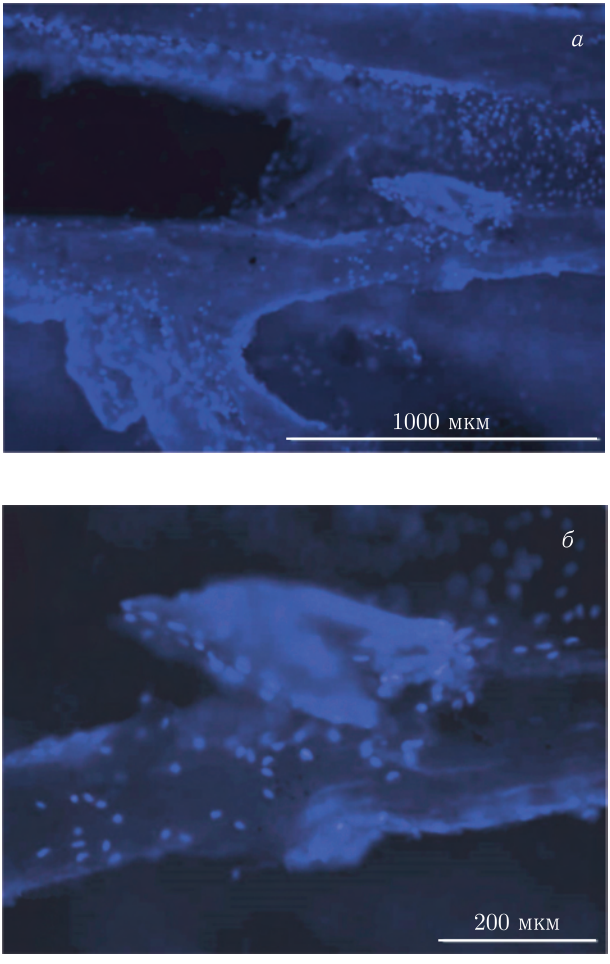


Рис. 11.6. Адгезия клеток на депротеинизированных костных матрицах губчатой структуры (внутренняя поверхность распила): *а* — ув. $\times 40$; *б* — ув. $\times 100$. Флуорохром Hoechst 33342

со средним размером ядер 9,1 мкм (от 5,2 до 28,2 мкм) (рис. 11.5). Средняя площадь ядер клеточных элементов 88,9 мкм (от 18,2 до 520 мкм), средний периметр ядер 32,1 мкм (от 15,6 до 109,2 мкм). Следует отметить некоторое увеличение размеров ядер клеток, что может быть связано с более глубокой степенью очистки костного матрикса от белкового компонента. При этом плотность распределения адгезировавшихся клеток не отличается и распределение клеток

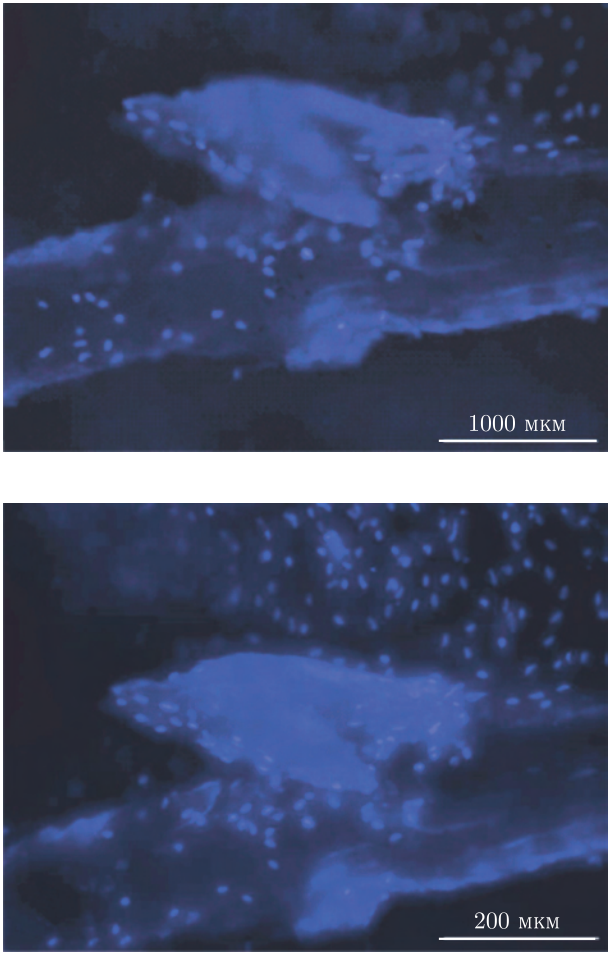


Рис. 11.7. Миграция клеток в толщу депротеинизированного костного матрикса губчатой структуры (внутренняя поверхность распила): *а* — до сшивки; *б* — после сшивки изображений. Флуорохром Hoechst 33342. Ув. × 100

по поверхности депротеинизированных костных матриц аналогично показателям для нативных костных матриц.

При исследовании депротеинизированных губчатых костных фрагментов при увеличении × 40 было проанализировано 413 ядер клеток со средним размером ядер 11,5 мкм (от 5,2 до 29,2 мкм) (рис. 11.6). Средняя площадь ядер клеточных элементов при этом составила 129 мкм (от 13,0 до 600 мкм), средний периметр ядер соответствовал 40,7 мкм (от 15,6 до 120,9 мкм).

Следующим этапом изучали миграцию клеток в толщу образцов костной матрицы с 1-х по 3-и сут (рис. 11.7). При этом выявили смещение ядер клеток по плоскости, что при сшивке изображений, выполненных в разных плоскостях, сопровождалось увеличением количества ядер в одном поле зрения.

Для подтверждения жизнеспособности клеток на образцах исследуемого материала образцы были докрашены флуорохромом (Calcein AM, BD Pharmingen$^{TM}$), который специфически окрашивает цитоплазму только жизнеспособных клеток. На поверхности материала хорошо визуализировались клетки с зеленым сигналом свечения в цитоплазме (рис. 11.8).

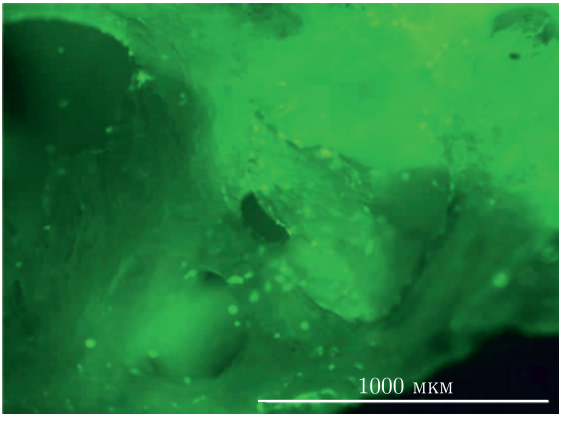


Рис. 11.8. Жизнеспособные клетки на образцах материала «Депротекс». Флуоресцентная микроскопия. Флуорохром Calcein AM. Ув. × 40

Это свидетельствует о сохранении МСК жизнеспособности на образцах материала на протяжении всего срока наблюдения (144 ч/6 сут).

*Для оценки цитотоксичности материала использовали стандартный МТТ-тест.* Для оценки цитотоксичности материала использовали стандартный МТТ-тест (табл. 11.1). Анализ результатов

Таблица 11.1. Выраженность цитотоксичности депротеинизированной костной матрицы (костнопластический материал «Депротекс»)

| Группа | Единицы измерения | Период экстракции «Депротекс» | |
|---|---|---|---|
| | | 1 день | 7 дней |
| Контроль ($n = 8$) | ОП, $M \pm m$ | $0{,}345 \pm 0{,}016$ | $0{,}563 \pm 0{,}146$ |
| | ОИР, % | 100 | 100 |
| | Ранг цитотоксичности | 0 | 0 |
| Экстракт ($n = 8$) | ОП, $M \pm m$ | $0{,}332 \pm 0{,}032$ | $0{,}459 \pm 0{,}177$ |
| | ОИР, % | 96 | 81 |
| | Ранг цитотоксичности | 1 | 1 |
| Экстракт 1 : 1 ($n = 8$) | ОП, $M \pm m$ | $0{,}326 \pm 0{,}021$ | $0{,}544 \pm 0{,}189$ |
| | ОИР, % | 94 | 97 |
| | Ранг цитотоксичности | 1 | 1 |
| Экстракт 1 : 2 ($n = 8$) | ОП, $M \pm m$ | $0{,}315 \pm 0{,}039$ | $0{,}554 \pm 0{,}189$ |
| | ОИР, % | 91 | 98 |
| | Ранг цитотоксичности | 1 | 1 |
| Экстракт 1 : 4 ($n = 8$) | ОП, $M \pm m$ | $0{,}341 \pm 0{,}045$ | $0{,}551 \pm 0{,}19$ |
| | ОИР, % | 99 | 98 |
| | Ранг цитотоксичности | 1 | 1 |

исследования абсорбции гранул формазана при проведении МТТ-теста не выявил статистически значимых отличий величин данного параметра взаимодействия фибробластов дермы человека с экстрактами образцов модифицированной ДПГК, полученных после 1-х и 7-х сут экстракции в сравнении с показателем соответствующего контроля, что свидетельствовало об отсутствии снижения жизнеспособности клеток выбранной для исследования клеточной линии.

Таблица 11.2. Шкала оценки цитотоксичности [16]

| Относительная интенсивность роста (ОИР) | Уровень цитотоксичности |
|---|---|
| 100 | 0 |
| 75–99 | 1 |
| 50–74 | 2 |
| 25–49 | 3 |
| 1–24 | 4 |
| 0 | 5 |

Из представленных данных видно, что экстракты аллогенного материала «Депротекс» не токсичны, так как уровень (ранг) цитотоксичности соответствует 1 согласно ранговой шале оценки цитотоксичности (табл. 11.2).

Уровень цитотоксичности — 0 и 1 соответствует нетоксичным материалам, 2–5 — цитотоксичным [16].

## Обсуждение

Одной из перспективных современных стратегий лечения массивных и осложненных дефектов костной ткани стало использование сложных конструктов (тканеинженерных конструкций) на основе матриц-носителей и культивированных клеток [17]. В качестве носителей-скаффолдов (каркасов) для тканеинженерных конструкций используются как искусственные, так и биологические материалы. Носитель (каркас) для МСК должен обладать остеоиндуктивностью, остеокондуктивностью [18], обеспечивать адгезию и функционирование клеток. Важнейшая характеристика такого каркаса — биосовместимость, что включает отсутствие цитотоксичности и способность поддерживать нормальный клеточный метаболизм [19]. Еще одним важным критерием для создания каркасов/носителей являются механические свойства, которые должны максимально соответствовать механическим свойствам костей хозяина [20]. Кроме того, для обеспечения диффузии кислорода, питательных веществ и удаления продуктов метаболизма необходимой особенностью носителей является наличие системы взаимосвязанных пор различного размера [21], что потенциально обеспечивает и условия для формирования мелких кровеносных сосудов. Таким образом, каркасы (носители-скаффолды) должны служить проводящим и индуктивным микроокружением для поддержания пролиферации и дифференцировки стволовых клеток в остеобласты и остеоциты, т. е. становиться нишей для стволовых клеток и быть направленными на имитацию свойств естественной костной ткани [22, 23]. Всем перечисленным требованиям соответствуют продукты из аллогенной кости. Они являются практически идеальным материалом для получения каркасов для сложных конструктов, так как по своей архитектонике и физико-механическим свойствам соответствуют характеристикам кости реципиента и обладают остеоиндуктивностью и остеокондуктивностью. Одним из недостатков аллогенного костного материала является сложность получения исходной донорской костной ткани. В качестве наиболее перспективного клеточного компонента для регенерации костной ткани на протяжении двух последних десятилетий активно изучаются МСК. Они могут быть получены из самых различных источников:

костного мозга, надкостницы, пульпы зуба, плаценты, пуповины, жировой ткани и т. д. [24]. Все виды МСК, независимо от источника получения, должны соответствовать трем основным критериям, выработанным Международным обществом клеточной терапии (ISCT): адгезия к пластику, экспрессия специфических маркеров, способность к дифференцировке в остеобласты, адипоциты и хондробласты в условиях *in vitro* [25]. Для восстановления костной ткани основное значение имеет остеогенный потенциал клеточных культур. По данным одних специалистов, остеогенный потенциал МСК КМ и МСК ЖТ не отличается [26, 27], по данным других, остеогенный потенциал МСК КМ и МСК надкостницы выражены значительнее, чем МСК ЖТ [28, 29]. При этом в сравнительном исследовании было показано, что выход стволовых клеток и способность к пролиферации у МСК ЖТ выше, чем у МСК КМ [30]. Указанные особенности МСК ЖТ, а также легкая доступность при получении и относительное изобилие МСК ЖТ по сравнению с МСК КМ, позволяющие получить необходимое для терапевтических целей количество клеточной массы, делают жировую ткань наиболее перспективным источником МСК для практического применения [31, 32]. Чаще всего большое количество аллогенной жировой ткани может быть получено во время стандартных операций липосакции, которые проводятся в клиниках всего мира. Кроме того, важно подчеркнуть, что использование жировой ткани позволяет получать и в ряде ситуаций применять не только аллогенные, но и аутологичные МСК ЖТ, что снимает массу юридических, этических и даже психологических проблем, возникающих у некоторых пациентов при лечении сложных патологических процессов. Все вышеперечисленное послужило основанием для выбора в качестве клеточного материала для исследования МСК ЖТ человека.

Заселение костных матриц клетками (дермальные фибробласты и МСК) происходит равномерно, что подтверждено количественными данными — количество адгезированных клеток на 1 поле зрения. Однако нельзя не отметить факт, что осуществление депротеинизации (децеллюляризации) костной матрицы изменяет характеристики адгезированных клеток. Так, наиболее выраженные изменения касаются увеличения размеров ядер клеток, адгезированных на депротеинизированной костной матрице губчатой структуры на 25–30 % по сравнению с величиной аналогичного параметра на образцах нативной или депротеинизированной костной матрицы компактной структуры. Это может быть обусловлено более глубокой степенью очистки и освобождением костного матрикса от органических компонентов до следового уровня содержания альбумина в образцах костной ткани с формированием большей площади поверхности матрицы [7]. При этом показатели

плотности адгезии клеток и распределение клеток по поверхности депротеинизированной костной матрицы губчатой структуры аналогичны показателям нативной костной матрицы и депротеинизированной костной матрицы компактной структуры. Поскольку губчатая структура костной ткани предполагает достаточно выраженную пористость материала матрицы, то ядра клеток располагаются по внутренним и внешним поверхностям трабекул (периметрам пор), подчеркивая архитектонику костной матрицы.

Более глубокая степень очистки костной матрицы способствует более выраженной адгезии, миграции и, вероятно, пролиферации клеточных элементов, о чем косвенно свидетельствует увеличение размеров ядер клеток (от 8,8 до 11,5 мкм), средняя площадь ядер клеточных элементов (от 86,3 до 129,0 мкм) и средний периметр ядер (от 30,7 до 40,7 мкм). Клетки хорошо адгезируются на поверхности и в глубоких структурах образцов губчатого костного материала, проникая в его поры. Это сопровождается сохранением жизнеспособности клеток до 7 сут исследования. Матрицы, изготовленные из различных по структуре и различными способами технологической обработки образцов костной ткани, используемые в нашей работе, нетоксичны для живых клеток. Наши данные подтверждаются данными других исследователей (патент на изобретение RU 2715238 C1 от 26.02.2020).

## Заключение

Полученные *in vitro* результаты исследования влияния нативной и депротеинизированной компактной и губчатой аллогенных костных матриц свидетельствуют о том, что глубокая степень очистки костной матрицы определяет отсутствие цитотоксического влияния и формирование наиболее благоприятных условий для реализации свойств и характеристик (адгезия, миграция, пролиферация клеточных элементов, жизнеспособность) МСК ЖТ. Полученные результаты демонстрируют возможность создания тканеинженерных конструкций на основе матриц из костной ткани различной структуры. Наиболее подходят для этой цели депротеинизированные костные матрицы, особенно губчатые по структуре.

## Этическая экспертиза

Все процедуры и манипуляции, выполняемые в ходе данного исследования, рассмотрены и утверждены этическим комитетом ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России на предмет соответствия этическим принципам, а протокол исследования *in vitro*

одобрен локальным этическим комитетом и утвержден Ученым советом ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России.

## Информированное согласие

Каждый пациент, предоставивший свой материал для получения клеточных культур, дал информированное добровольное согласие на участие в исследовании и был предварительно обследован и осмотрен специалистами.

## Список литературы

1. *Воробьев К.А.*, *Божкова С.А.*, *Анисимова Л.И.*, *Нетылько Г.И.* Влияние методов заготовки костнопластического материала на процессы ремоделирования в модели костного дефекта в эксперименте *in vivo* // Практическая медицина. 2019. Т. 17, № 1. С. 67–72; doi:10.32000/2072-1757-2019-1-67-72

2. *Живцов О.П.*, *Алейник Д.Я.*, *Орлинская Н.Ю.*, *Митрофанов В.Н.* Особенности регенерации костной ткани в условиях применения клеточно-инженерной конструкции для восстановления костного дефекта у кроликов // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2019. Т. 11. С. 54–59; doi.org/10.17513/ mjpfi.12931

3. *Кирилова И.А.*, *Садовой М.А.*, *Подорожная В.Т.* Сравнительная характеристика материалов для костной пластики: состав и свойства // Хирургия позвоночника. 2012. Т. 3. С. 72–83; doi.org/10.14531/ ss2012.3.72-83

4. *Мухаметов У.Ф.*, *Мухаметов Ф.Ф.*, *Сулейманов Я.Н.*, *Нагаев Р.Я.*, *Нигматуллин Р.Т.*, *Шангина О.Р.* Некоторые аспекты ревизионного эндопротезирования тазобедренного сустава. Пластика костных дефектов губчатыми аллоплантами // Гений ортопедии. 2016. Т. 4. С. 29–35; doi.org/10.18019/ 1028-4427-2016-4-29-35

5. *de Grado G.F.*, *Keller L.*, *Idoux-Gillet Y.*, *Wagner Q.*, *Musset A.M.*, *Benkirane-Jessel N. et al.* Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management // J. Tissue Engineering. 2018. V. 9. P. 1–18; doi:org/10.1177/ 2041731418776819

6. *Воробьев К.А.*, *Божкова С.А.*, *Тихилов Р.М.*, *Черный А.Ж.* Современные способы обработки и стерилизации аллогенных костных тканей (обзор литературы) // Травматология и ортопедия России. 2017. Т. 23, № 3. С. 134–147; doi:10.21823/2311-2905-2017-23-3-134-147.

7. *Кирилова И.А.* Анатомо-функциональные свойства кости как основа создания костно-пластических материалов для травматологии и ортопедии. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2019. 256 с.

8. *Gharedaghi M., Peivandi M.T., Mazloomi M., Shoorin H.R., Hasani M., Seyf P., Khazaee F.* Evaluation of clinical results and complications of structural allograft reconstruction after bone tumor surgery // Archives of Bone and Joint Surgery. 2016. V. 4, No 3. P. 236–242.

9. *Qu H., Guo W., Yang R., Li D., Tang S., Yang Y. et al.* Reconstruction of segmental bone defect of long bones after tumor resection by devitalized tumor-bearing bone // World J. Surgery Oncology. 2015. V. 13. P. 282; doi:10.1186/s12957-015-0694-3

10. *Avril P., Le Nail L.-R., Brennan M.A., Rosset P., De Pinieux G., Layrolle P. et al.* Mesenchymal stem cells increase proliferation but do not change quiescent state of osteosarcoma cells: Potential implications according to the tumor resection status. J. Bone Oncology. 201. V. 65, No 1. P. 5–14; doi:10.1016/j.Jbo.2015.11.002

11. *Perrot P., Rousseau J., Bouffaut A.-L., Rédini F., Cassagnau E., Deschaseaux F. et al.* Safety Concern between Autologous Fat Graft, Mesenchymal Stem Cell and Osteosarcoma Recurrence // PLoS ONE. 2010. V. 5, No 6. P. e10999; doi:10.1371/journal.pone.0010999

12. *Caplan A.I., Hariri R.* Body management: Mesenchymal stem cell the internal regenerator // Stem Cells Translational Medicin. 2015. V. 4, No 7. P. 695–700; doi:10.5966/sctm.2014-0291

13. *Кирилова И.А., Подорожная В.Т., Павлов В.В., Бедорева И.Ю.* Организация донорства головок бедренных костей в Новосибирском НИИТО // Успехи современного естествознания. 2015. Т. 9. С. 49–52; https://natural-sciences.ru/ru/article/view?id=35524

14. *Хэм А., Кормак Д.* Костная ткань // Гистология. 1983. Т. 3. С. 19–131. [*Ham A., Cormack D.* Bone tissue // Histology. 1983. V. 3. P. 19–131.]

15. *Mossman T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // J. Immunol Met. 1983. V. 65. P. 55–63.

16. *Shanmugam S., Gopal B.* Antimicrobial and cytotoxicity evaluation of aliovalent substituted hydroxyapatite // App/ Surf/ Sci. 2014. V. 303. P. 277–281; doi:10.1016/j.apsusc.2014.02.166

17. *Ho-Shui-Ling A., Bolander J., Rustom L.E., Johnson A.W., Luyten F.P., Picart C.* Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives // Biomaterials. 2018. V. 180. P. 143–162; doi:10.1016/j.biomaterials.2018.07.017

18. *Oryan A.*, *Alidadi S.*, *Moshiri A.*, *Maffulli N.* Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions // J. Orthop. Surg. Res. 2014. V. 9, No 1. P. 18; doi:10.1186/1749-799X-9-18

19. *Amini A.R.*, *Laurencin C.T.*, *Nukavarapu S.P.* Bone tissue engineering: recent advances and challenges // Crit. Rev. Biomed Eng. 2012. V. 40. P. 363–408; doi:10.1615/CritRevBiomedEng.v40.i5.10

20. *Mallick K.K.*, *Cox S.C.* Biomaterial scaffolds for tissue engineering // Front Biosci. 2013. V. 5. P. 341–360; doi:10.2741/e620

21. *Bose S.*, *Roy M.*, *Bandyopadhyay A.* Recent advances in bone tissue engineering scaffolds // Trends Biotechnol. 2012. V. 30, No 10. P. 546–554; doi:10.1016/j.tibtech.2012.07.005

22. *Dawson E.*, *Mapili G.*, *Ericson K.*, *Taqvi S.*, *Roy K.* Biomaterials for stem cell differentiation // Adv. Drug. Deliv. Rev. 2008. V. 60. P. 215–228; doi:10.1016/j.addr.2007.08.037

23. *Reichert J.C.*, *Nöth U.*, *Berner A.*, *Hutmacher D.W.* Bone / Steinhoff G. (ed.) Regenerative Medicine — from Protocol to Patient. Switzerland: Springer, Cham; 2016; doi:10.1007/978-3-319-28386-9_9

24. *Mushahary D.*, *Spittler A.*, *Kasper C.*, *Weber V.*, *Charwat V.* Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells // Cytometry A. 2018. V. 93, No 1. P. 19–31; doi:10.1002/cyto.a.23242

25. *Dominici M.*, *Le Blanc K.*, *Mueller I.*, *Slaper-Cortenbach I.*, *Marini F.*, *Krause D. et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal cells. The international Society for cellular Therapy position stratement // Cytotherapy. 2006. V. 8, No 4. P. 315–317; doi:10.1080/14653240600855905

26. *Ugarte D.A.*, *Morizono K.*, *Elabarbary A.*, *Alfonso Z.*, *Zuk P.A.*, *Zhu M. et al.* Comparison of multilineage cells from human adipose tissue and bone marrow // Cells Tissues Organs. 2003. V. 174. P. 101–109; doi:10.1159/000071150

27. *Mizuno H.*, *Tobita M.*, *Uysal A.C.* Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine // Stem. Cells. 2012. V. 30, No 5. P. 804–810; doi:10.1002/stem.1076

28. *Im G.I.*, *Shin Y.W.*, *Lee K.B.* Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? // Osteoarthritis Cartilage. 2005. V. 13, No 10. P. 845–853; doi:10.1016/j.joca.2005.05.005

29. *Hayashi O.*, *Katsube Y.*, *Hirose M.*, *Ohgushi H.*, *Ito H.* Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue // Calcif. Tissue Int. 2008. V. 82, No 3. P. 238–247; doi:10.1007/s00223-008-9112-y

30. *Kern S.*, *Eichler H.*, *Stoeve J.*, *Klüter H.*, *Bieback K.* Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue // Stem. Cells. 2006. V. 24, No 5. P. 1294–1301; doi:10.1634/stemcells.2005-0342

31. *Lendeckel S.*, *Jodicke A.*, *Christophis P.*, *Heidinger K.*, *Wolff J.*, *Fraser J.K. et al.* Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report // J. Craniomaxillofac Surg. 2004. V. 32, No 6. P. 370–373; doi:10.1016/j.jcms.2004.06.002

32. *Mesimäki K.*, *Lindroos B.*, *Törnwall J.*, *Mauno J.*, *Lindqvist C.*, *Kontio R. et al.* Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells // Intern. J. Oral Maxillofac. Surg. 2009. V. 38, No 3. P. 201–209; doi:10.1016/j.ijom.2009.01.001

# 12. АЛЛОГЕННЫЕ КОСТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ: СТРУКТУРА, СВОЙСТВА, ПРИМЕНЕНИЕ

*В.Т. Подорожная, И.А. Кирилова, Ю.П. Шаркеев, Е.В. Легостаева*

Известия высших учебных заведений. Физика.
2013. Т. 56, № 12–3. С. 14–20.

Дано определение костно-пластического материала (КПМ), приведены данные о морфологии поверхности и механических свойствах КПМ из аллокости, подвергнутой различным видам технологической обработки. Изучено влияние процесса депротеинизации на физико-механические свойства костной «соломки».

## 12. ALLOGENIC BONE MATERIALS: STRUCTURE, PROPERTIES, APPLICATION

*V.T. Podorozhnaya, I.A. Kirilova, Yu.P. Sharkeev, E.V. Legostaeva*

The definition of Bone-Plastic material (BOM) is given, data on the surface morphology and mechanical properties of BOM from allograft bone subjected to various types of technological processing are given. The influence of the process of deproteinization on the physical and mechanical properties of bone «straw» was studied.

### Введение

Мечта человека использовать биологические ткани для восстановления целостности организма родилась в давние времена. Первой процедурой костной пересадки традиционно считается выполненная Св. Домианом и Св. Козьмой в III столетии пересадка кадаверного аллотрансплантата нижней конечности пациенту с опухолью ноги. Понятно, что эта попытка осталась на страницах описаний как историческое событие, не имевшее какого-либо целебного успеха. Но все это говорит о стремлении медицины к подбору биологических «запасных» частей для человека [1]. Прогресс человеческой мысли, развитие различных областей науки, таких как физика, химия, биология, фармакология, анестезиология, хирургия и др., позволили в наше

время вернуться к проблеме пересадки тканей. Для восстановления структурной целостности опорно-двигательного аппарата используются различные костно-пластические материалы (КПМ) [1–6].

Костно-пластический или остеопластический материал — это материал, предназначенный для реконструктивно-восстановительных операций на костной ткани в различных областях хирургии: травматологии и ортопедии, челюстно-лицевой хирургии, костной онкологии и т. д. И закономерно, что такой материал готовят из костной ткани донора, которая, в свою очередь, может быть различной по строению: губчатой, кортикальной, губчато-кортикальной [1, 3, 5].

В зависимости от способа предварительной химической обработки кость может быть:

1) нативной — с сохраненными структурой и соотношением органического и минерального компонентов;
2) деминерализованной — лишенной минерального компонента и являющейся органической матрицей кости;
3) депротеинизированной — лишенной органического компонента и содержащей гидроксиапатит биологического происхождения.

Фрагменты кости также отличаются по размерам и форме, которые придаются материалу в ходе моделирования. Так, фрагменты кортикальной кости в зависимости от моделирования могут представлять собой (рис. 12.1): а) фрагменты диафизов малоберцовой, локтевой, большеберцовой и др. костей; б) кортикальные фрагменты — пластины из большеберцовой кости различных плоскостных размеров (например, $10 \times 2$ см или $3 \times 2$ см), толщина которых изменяется в зависимости от толщины кортикальной кости донора от 0,2 до 0,5 см; в) костная «соломка» — это продольные распилы кортикальных фрагментов различной длины, чаще всего 10–12 см, шириной от 0,1 до 0,3 см и толщиной от 0,2 до 0,5 см.

Материалы с различными свойствами и характеристиками необходимо использовать только в тех условиях, в которых эти характеристики являются самыми востребованными.

Наиболее частой причиной использования КПМ являются опухоли и опухолеподобные заболевания [2, 6]. Однако и при лечении, казалось бы, одной нозологии виды и способы использования костных материалов различны. И связано это не только с величиной очага поражения, но и с расположением в сегментах скелета и с учетом биомеханической нагрузки, которую испытывает тот или иной сегмент опорно-двигательного аппарата.

В монографии [2] М.В. Волков и В.А. Бизер впервые описали методику костной пластики аллокостью при замещении дефектов костей.

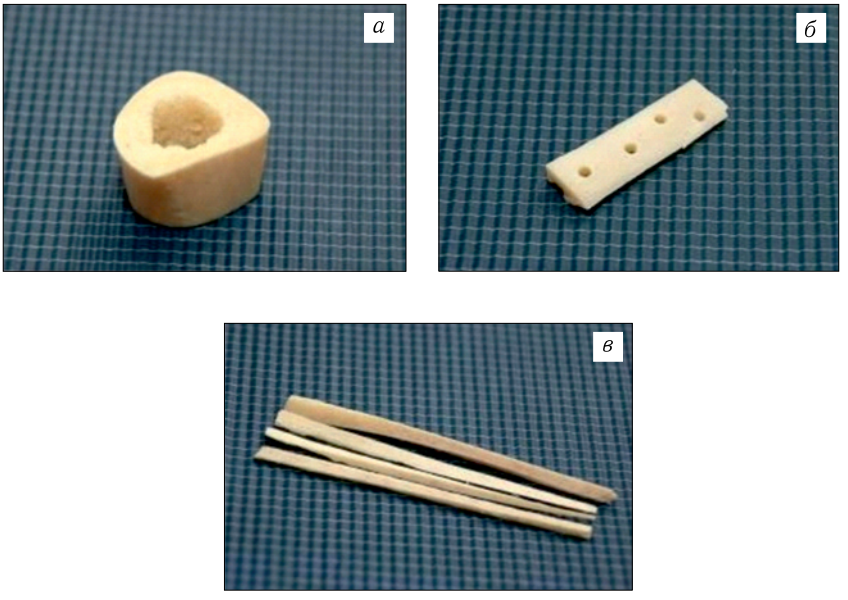


Рис. 12.1. Внешний вид КПМ: *а*) фрагмент диафиза большеберцовой кости, *б*) кортикальный фрагмент, *в*) костная «соломка»

В качестве КПМ авторы использовали продольно расщепленные фрагменты кортикальной кости (современное название кортикальная «соломка» или костная «соломка») по типу «вязанки хвороста». С использованием данной методики было пролечено большое количество пациентов детского возраста. Наличие небольшого количества неудовлетворительных результатов в виде рецидивов подтолкнуло нас к разработке нового способа обработки компактной кости.

Наличие литературных данных о влиянии формы и топографии поверхности КПМ на реакцию тканей [7–9] привело нас к идее сравнить данные показатели у широко используемой нативной костной «соломки» и материала, полученного новым способом [4]. При условии биосовместимости материала местная реакция на инородное тело зависит от поверхностных свойств материала, формы имплантата, соотношения между площадью поверхности биоматериала и объемом имплантата.

В связи с вышесказанным целью настоящей работы являлось разработка и исследование КПМ со сниженными антигенными и сохраненными прочностными свойствами. При решении поставленной цели решались следующие задачи.

1. Изучить морфологию поверхности и элементный состав КПМ, подвергнутых различной технологической обработке.

2. Исследовать механические свойства нативной и депротеинизированной (деорганифицированной) аллокости: предел пропорциональности, предел прочности, относительную деформацию образца при растяжении и модуль Юнга.
3. Изучить влияние процессов депротеинизации на физико-химические свойства костной «соломки».

## Методика эксперимента

Материалом для исследования служили образцы нативной и депротеинизированной костной (ДПК) ткани в виде «соломки». Образцы нативной костной «соломки» и ДПК «соломки» готовили из диафизарной части большеберцовой кости путем радиального распиливания на кортикальные пластины. Образцы нативной костной «соломки» в процессе предварительной подготовки претерпели обезжиривание и высушивание, а образцы ДПК «соломки» — обезжиривание, депротеинизацию и высушивание [3]. Количество образцов — 6 единиц каждого вида.

Морфология поверхности костных материалов была исследована методом растровой электронной микроскопии (РЭМ, Phillips SEM 515) с приставкой для микроанализа EDAX, которая также была использована для элементного анализа состава костной ткани. Исследуемые образцы костной ткани помещались на специальный углеродный токопроводящий скотч для обеспечения их хорошего электрического контакта с предметным столиком микроскопа и для фиксации образцов при наклоне столика. Затем на исследуемую поверхность костной ткани наносилась тонкая электропроводящая пленка путем распыления графита в вакуумном посту. Элементный состав костных материалов был изучен путем анализа характеристических спектров рентгеновского излучения с учетом ZAF-коррекции.

Измерение габаритных размеров (длина, толщина и ширина) образцов нативной костной «соломки» и ДПК «соломки» осуществляли штангенциркулем. Измерения сухого веса образцов осуществляли взвешиванием на электронных лабораторных весах ADVENTURER-TM фирмы OHAUS Europe, Швейцария. Полученные результаты измерений обрабатывались статистически с помощью программы Statistica.

Определение белка в КПМ проводили биохимическим биуретовым методом. Пробы были разделены на 2 серии. КПМ предварительно измельчали и готовили одинаковые навески массой 0,1 г. Навески КПМ помещали в пробирки Эппендорфа емкостью по 1,5 мл. Для экстракции белка использовали 0,6М HCl и шейкер ELMI с режимом 150 движений в минуту при температуре +4 °С в течение 24 ч. После

предварительного центрифугирования в надосадочной жидкости определяли содержание альбумина.

Одноосное статическое растяжение образцов костной ткани проводили на установке INSTRON-1185 с автоматической записью кривых нагружения по ГОСТ 1497-84. Испытания проводили при комнатной температуре со скоростью нагружения 0,5 мм/мин. Из кривых растяжения были рассчитаны следующие механические характеристики: предел пропорциональности $\sigma_{\text{пц}}$ — наибольшее напряжение, при котором выполняется закон Гука; предел прочности $\sigma_B$ — напряжение, соответствующее наибольшему значению нагрузки, предшествующей разрушению образца; относительная суммарная деформация $\varepsilon$ и модуль Юнга $E$ [8].

Относительная деформация рассчитывалась по формуле:

$$\varepsilon = \frac{l_{\text{к}} - l_0}{l_0} \times 100\,\%,$$

где $l_0$ — начальная длина образца, $l_{\text{к}}$ — конечная длина после деформации.

Модуль Юнга рассчитывался графическим способом в упругой области на диаграмме по формуле:

$$E = \frac{\Delta P \cdot l_0}{\Delta l_{\text{ср}} \cdot S_0},$$

где $\Delta P = P - P_0$, $P_0$ — начальное усилие ($H$); $P$ — нагрузка, равная 70 % от предела пропорциональности $\sigma_{\text{пц}}$; $\Delta l = l_{\text{к}} - l_0$ — удлинение образца вызванное приложенной нагрузкой $P$; $\Delta l_{\text{ср}}$ — среднее значение удлинения образца при нагружении, которое определяется на упругом участке; $S_0$ — площадь поперечного сечения исходного образца, измеренная перед испытанием; а $l_0$ — его начальная длина и $l_{\text{к}}$ — конечная длина.

## Результаты эксперимента и обсуждение

Биологические твердые ткани являются минерально-органическими композитами со сложной микроструктурой [1, 5, 7, 11]. Кортикальная кость (плотная и компактная) составляет внешнюю часть всех скелетных структур и является минерально-органическим композиционным материалом, главными составляющими которого являются органический матрикс (20 %), минеральный компонент (70 %) и вода (9 %), а также клеточные элементы (1 %). Другие органические составляющие (белки, полисахариды, липиды и др.) представлены в малых количествах [7, 11]. Кортикальная кость является композиционным материалом, на наноструктурном уровне представляющим собой

взаимопроникающий каркас, состоящий из минералов на основе гидроксиапатита и волокон коллагена. Данный каркас формирует слоистую микроструктуру, являющуюся основной для ориентированных цилиндрических образований на макроуровне. Форма и топография поверхности КПМ влияют на реакцию тканей и определяют, как протекает реакция на инородное тело [12].

На рис. 12.2 приведены типичные РЭМ — изображения поверхности костной ткани до (*а*, *б*) и после депротеинизации (*в*, *г*). Видно, что поверхность костной ткани неровная с выступами и углублениями. Местами встречаются участки с шероховатой поверхностью, что характерно для опилов кости (рис. 12.2, *б*). Продольные полосы соответствуют линиям склеивания между остеонами. Небольшие углубления в поверхности кортикального слоя после депротеинизации, вероятно, являются остеоцитарными лакунами. Отверстия в относительно ровной поверхности могут соответствовать местам выхода сосудов. На внутренней поверхности ДПК «соломки» структура кости ближе к губчатой, о чем свидетельствует трабекулярная структура поверхности, сочетающая гребнеобразные выступы и углубления (рис. 12.2, *г*).

Таким образом, форма и топография нативной и ДПК костной «соломки» подобна и соответствует структуре костной ткани: компактной с наружной стороны и губчатой со стороны костномозгового канала. Однако рельефность более выражена у ДПК «соломки», что связано с коагуляцией и экстракцией органического компонента кости.

На рис. 12.3 представлены кривые растяжения костной ткани до (*1*) и после депротеинизации (*2*), а в табл. 12.1 — основные механические характеристики, полученные из кривых растяжения. Из полученных данных видно, что образцы костной ткани имеют малую величину степени предельной деформации $\varepsilon$, не более 1 %, что характерно для хрупких материалов. Область упругой деформации составляет 0,05 %, а предел пропорциональности не превышает 30 МПа. Он равен для исходной костной ткани 27 МПа, а для ДПК ткани — 29 МПа. Предел прочности также не зависит от присутствия коллагена в костной ткани и равен 80–90 МПа. Наличие коллагена влияет на модуль Юнга, который для ДПК ткани снижается в 2 раза по сравнению с костной

Таблица 12.1. Механические характеристики образцов костной ткани

| Материал | $E$, МПа | $\sigma_{пц}$, МПа | $\sigma$, МПа | $\varepsilon$, % |
|---|---|---|---|---|
| Нативная костная ткань | 230 | 29 | 90 | 0,91 |
| Депротеинизированная костная ткань | 110 | 27 | 83 | 0,96 |

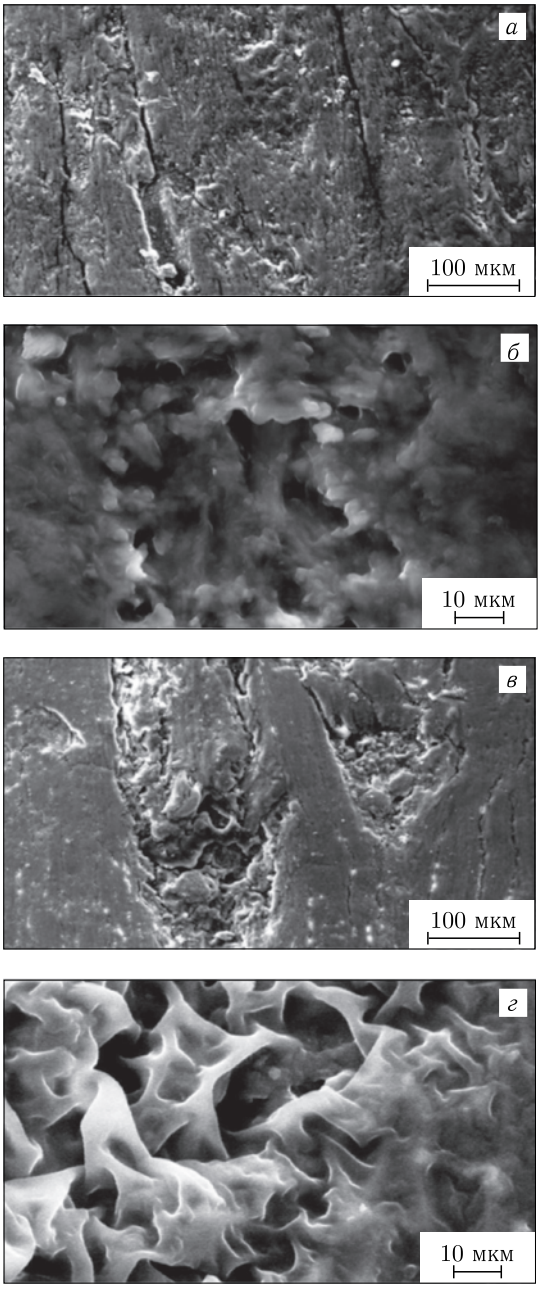


Рис. 12.2. РЭМ-изображения нативной костной «соломки» (*а*, *б*) и ДПК «соломки» (*в*, *г*)

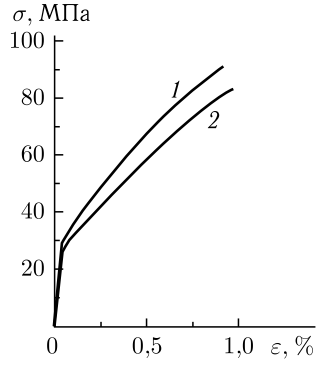


Рис. 12.3. Кривые растяжения нативной костной «соломки» (*1*) и ДПК «соломки» (*2*)

тканью в исходном состоянии (230 МПа) и равен 110 МПа. Это можно объяснить тем, что в процессе депротеинизации происходит коагуляция и экстракция органического компонента кости, отвечающего за упруго-эластические свойства костной ткани.

Механические характеристики образцов нативной и ДПК костной «соломки» сопоставимы с литературными данными, полученными для различных костных тканей. По данным разных авторов [8, 13, 14], указанные характеристики варьируют в широком диапазоне, а именно: предел прочности $\sigma_B = 50$–$200$ МПа, относительная деформация $\varepsilon = 1$–$2\,\%$, модуль Юнга $E = 200$ МПа — 20 ГПа. Варьирование прочностных характеристик в широком диапазоне связано с тем, что различные авторы [8, 13, 14], во-первых, испытывают разные участки кости и, во-вторых, механические испытания образцов осуществляют в различных условиях. Необходимо отметить, что в работе был исследован не цельный фрагмент диафиза трубчатой кости, а радиальный распил в виде кортикальной «соломки», что заведомо снижает прочностные свойства костной ткани, и в первую очередь предел упругости. Кроме того, нами были изучены прочностные свойства фрагментов кости именно в том виде, в каком ее используют для органосохраняющих операций на различных сегментах скелета человека [2, 6].

Полученные данные характеризуют кость как структуру твердую и жесткую и в то же время хрупкую, о чем также свидетельствует морфология излома различных видов костной «соломки» (рис. 12.4). Анализ поверхности изломов нативной и ДПК костной «соломки» не выявил каких-либо значительных морфологических отличий и подтвердил механизм хрупкого разрушения материала до и после депротеинизации.

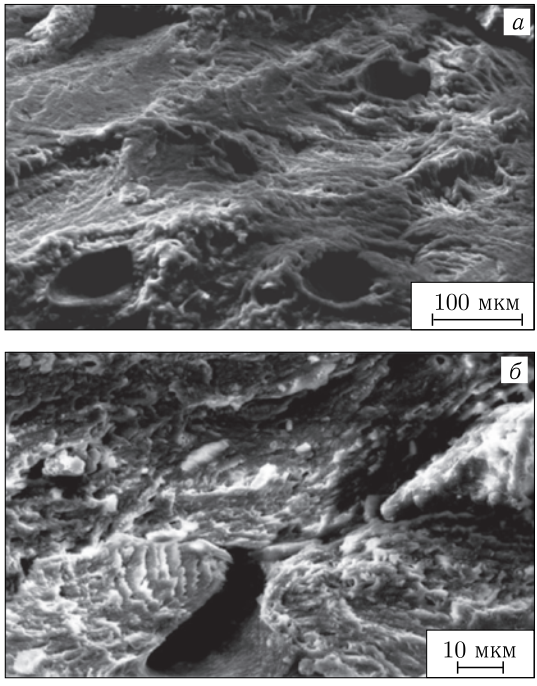


Рис. 12.4. РЭМ-изображения поверхности излома нативной костной «соломки» (*а*) и ДПК «соломки» (*б*)

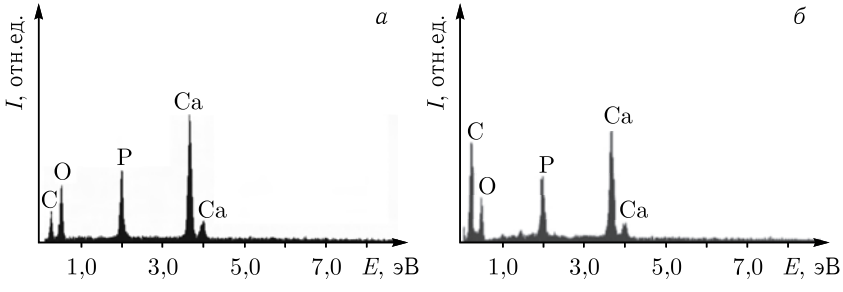


Рис. 12.5. Энергодисперсионные рентгеновские спектры нативной костной ткани (*а*) и ДПК «соломки» (*б*)

На рис. 12.5 приведены энергодисперсионные рентгеновские спектры нативной и ДПК кости. Основные элементы — это кальций (Ca), фосфор (P) и кислород (O). Наличие линии углерода (C) обусловлено тонкой пленкой, нанесенной путем напыления на образцы. При определении легких элементов, таких как углерод и кислород, существует

значительная погрешность, что не позволяет установить точное количество каждого элемента. Из полученных результатов по элементному составу была проведена оценка соотношения кальция к фосфору (Ca/P). Оказалось, что атомное соотношение кальция к фосфору составляет 2,0 для образцов нативной костной ткани и 2,8 для ДПК «соломки», что несколько необычно для нормальной костной ткани.

По литературным данным, соотношение Ca/P в кристаллическом апатите варьирует от 1,37 до стехиометрического соотношения 1,67 [7, 8, 13]. Отклонение, полученное при анализе нативной и ДПК «соломки», можно объяснить предварительным способом обработки костной ткани в виде химического обезжиривания. Кроме того, в технологическом процессе депротеинизации присутствует этап ферментативной обработки, в процессе которой происходит коагуляция и экстрагирование белков, доля которых, по литературным данным [5, 11], составляет до 25 % массы костной ткани. Поскольку минеральный

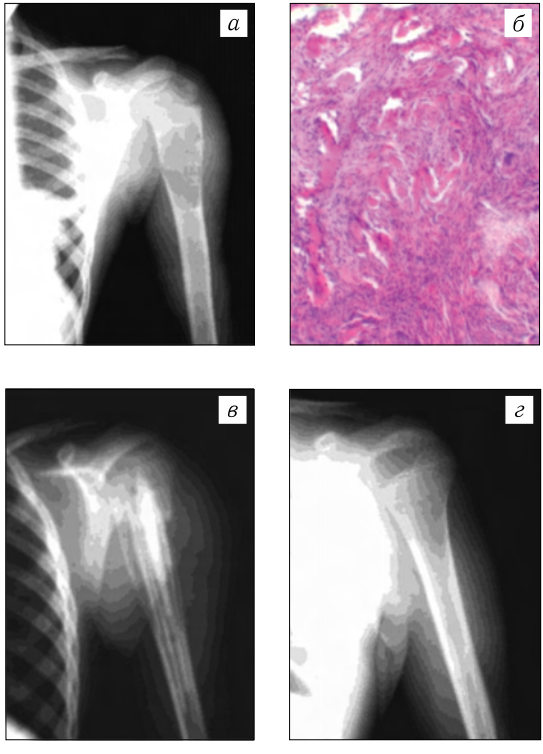


Рис. 12.6. Рентгенограммы и микропрепарат пациента С., 10 лет: *а*, *б*) до операции; *в*) сразу после операции; *г*) через 3 года после операции

компонент костной ткани представлен закристаллизованным или частично закристаллизованным гидроксиапатитом — $Ca_{10}(PO_4)(OH)_2$, а также аморфным фосфатом кальция (АФК) — $Ca_3(PO_4)_2$, легко поддающимся растворению, то происходит частичная потеря микроэлементов и изменение Ca/P соотношения. Часть белков прочно соединена с минеральным компонентом, и в процессе обработки происходит бóльшая, чем в предыдущем случае, потеря микроэлементов и изменение Ca/P соотношения [11].

Подтверждением эффективности ферментативной обработки кости может служить изменение массы костной «соломки» в процессе депротеинизации и биохимическое определение белка в одном миллилитре надосадочной жидкости. Масса нативной и ДПК «соломки» одинаковых размеров статистически достоверно отличается. ДПК «соломка» в процессе депротеинизации теряет 19,4 % своего веса. ДПК «соломка» и нативная костная «соломка» одного веса отличаются по длине на 24,1 %. При определении альбумина максимальное значение в нативной костной «соломке» составило 24 мкг/мл, а в ДПК «соломке» — 2 мкг/мл. Полученные данные свидетельствуют о том, что коагуляция и экстракция органического компонента осуществлена в достаточном объеме.

Клинический пример использования костной «соломки» приведен на рис. 12.6. Пациент С., 10 лет. Клинический диагноз: фиброзная дисплазия метадиафизарной части плечевой кости (рис. 12.6, *а*).

Диагноз подтвержден морфологически (рис. 12.6, *б*). Выполнено оперативное лечение. Пристеночная резекция и пластика депротеинизированной костной «соломкой» (ДПК-«соломкой») по типу «вязанки хвороста» (рис. 12.6, *в*). Через 3 года рентгенологически наблюдают полное восстановление целостности и толщины кортикального слоя плечевой кости и органотипической структуры костной ткани (рис. 12.6, *г*).

## Заключение

Морфология поверхности и поверхности излома нативной и ДПК костной «соломки» идентична, но более выражена после депротеинизации. В процессе обработки кости [4] атомное соотношение кальция к фосфору (Ca/P) изменяется от 2,0 до 2,8, а потеря веса составляет 19,4 % за счет коагуляции и экстракции органического компонента. Кость является твердой и жесткой, о чем свидетельствует величина упругой деформации 0,05 %, предел пропорциональности (менее 30 МПа), а также предел прочности — 80–90 МПа, и не зависит от присутствия коллагена. Депротеинизация в 2 раза снижает модуль Юнга и увеличивает хрупкость КПМ.

## Список литературы


1. *Имамалиев А.С.* Биологическая оценка трансплантируемых тканей. М.: Наука, 1975. 184 с.
2. *Волков М.В.*, *Бизер В.А.* Гомотрансплантация костной ткани у детей. М.: Медицина, 1969. 219 с.
3. *Kirilova I.A.* , *Fomichev N.G.*, *Podorozhnaya V.T.* New materials for bone grafting in view of current concepts // Spine Surgery: Digest No 1. 2013. No 1; http://www.spinesurgery.ru/Digest
4. *Кирилова И.А.*, *Подорожная В.Т.* Способ приготовления костного трансплантата. Патент РФ на изобретение № 2223104 // Изобретения, полезные модели. 2004. № 4. С. 464.
5. *Кирилова И.А.* Костная ткань как основа остеопластических материалов для восстановления кости // Хирургия позвоночника. 2011. № 1. С. 68–74.
6. *Садовой М.А.*, *Мацук С.А.*, *Сагдеев Д.О.*, *Подорожная В.Т.*, *Кирилова И.А.*, *Мацук К.С.* Хирургическое лечение костных опухолей у детей // Травматология и ортопедия. 2007. Т. 2. С. 134–137.
7. *Баринов С.М.*, *Комлев В.С.* Биокерамика на основе фосфатов кальция. М.: Наука, 2005. 204 с.
8. *Эппле Матиас.* Биоматериалы и биоменерализация / Перевод с нем. Под ред. В.Ф. Пичугина, Ю.П. Шаркеева, И.А. Хлусова. Томск: Ветер, 2007. 137 с.
9. *Севастьянов В.И.*, *Васин С.Л.*, *Перова Н.В.* Методы исследования биоматериалов и медицинских изделий // Биосовместимость / Под ред. В.И. Севастьянова. М.: ИЦ ВНИИгеосистем, 1999. С. 47–87.
10. *Золотаревский С.М.* Механические свойства металлов. Учеб. для вузов. М.: Металлургия, 1983. 352 с.
11. *Слуцкий Л.И.*, *Севастьянова Н.А.* Органический матрикс кости: новые биохимические данные // Ортопедия, травматология. 1986. № 8. С. 82–87.
12. *Шехтер А.Б. Розанова И.Б.* Тканевая реакция на имплантат // Биосовместимость / Под ред. В.И. Севастьянова. М.: ИЦ ВНИИгеосистем, 1999. С. 174–211.
13. *Карлов А.В.*, *Шахов В.П.* Системы внешней фиксации и регуляторные механизмы оптимальной биомеханики. Томск: STT, 2001. 478 с.
14. *Хлусов И.А.*, *Пичугин В.Ф.*, *Рябцева М.А.* Основы биомеханики биосовместимых материалов и биологических тканей. Учеб. пособие. Томск: ТПУ, 2007. 149 с.

# 13. ДВУХЭТАПНОЕ РЕЭНДОПРОТЕЗИРОВАНИЕ ТАЗОБЕДРЕННОГО СУСТАВА ПРИ ОБШИРНОМ ДЕФЕКТЕ КОСТНОЙ ТКАНИ ВЕРТЛУЖНОЙ ВПАДИНЫ

*В.В. Павлов, И.А. Кирилова, М.В. Ефименко, В.А. Базлов, Т.З. Мамуладзе*

Травматология и ортопедия России. 2017. Т. 23, № 4. С. 125–133

Краткосрочные благоприятные результаты эндопротезирования суставов отмечаются в 80–90 % случаев, однако с увеличением сроков наблюдения процент положительных исходов постепенно снижается. Пропорционально давности операции возрастает потребность в замене эндопротеза или его компонентов. При этом нередко возникает необходимость замещения костного дефекта вертлужной впадины. Для решения этой проблемы авторы предлагают устранять дефекты костей таза в два этапа. В качестве примера в статье представлено клиническое наблюдение пациентки с асептической ацетабулярной нестабильностью эндопротеза ЭСИ правого тазобедренного сустава, несостоятельностью функции сустава (НФС) 2 ст., укорочением правой нижней конечности на 2 см. В ходе первого оперативного вмешательства выполняли заполнение дефекта аллотрансплантатом с аутологичными тромбоцитами, обогащенными фибрином (аллопластика дефекта с применением PRF-технологии). После перестройки аллотрансплантата производили реэндопротезирование с имплантацией стандартных конструкций эндопротеза. Выполнение аллопластики костной тканью в сочетании с PRF-технологией является альтернативой установке массивных металлоконструкций в области вертлужной впадины, поскольку снижает связанный с внедрением объемного имплантата риск инфицирования, возникновения металлоза окружающих тканей и расширяет возможности дальнейшего реэндопротезирования.

## 13. TWO-STAGE REPEATED HIP ARTHROPLASTY WITH EXTENSIVE BONE DEFECT OF THE ACETABULUM

*V.V. Pavlov, I.V. Kirilova, M.V. Efimenko, V.A. Bazlov, T.Z. Mamuladze*

Favorable short-term results of arthroplasty are observed in 80–90 % of cases, however, with increasing periods of observation the percentage of positive outcomes is gradually reduced. In proportion to the limitation of the operation

increases the need for replacement of the prosthesis or its components. In addition, it is often necessary replacement of the bone defect of the acetabulum. As a solution to the problem, proposes the removal of defects of bones of pelvis in two stages. During the first surgical intervention performed filling of the defect with bone allograft with platelet-rich fibrin (alloplasty with the use of PRF technology). After the reorganization of the allograft is re-arthroplasty with implantation of standard structures of the prosthesis. We present the clinical sample, confirming the effectiveness and rationality of the proposed option of bone grafting. The conclusion is that the implementation of alloplasty bone tissue in combination with the PRF technology is an alternative to the installation of massive steel structures in the acetabulum reduces the risk of infection associated with the introduction of the volume of the implant, the occurrence of metallosis surrounding tissues and extends further re-arthroplasty.

## Введение

Положительный результат реэндопротезирования тазобедренного сустава (ТБС) во многом зависит от правильного решения целого ряда предварительных задач. Одной из наиболее серьезных проблем при эндопротезировании ТБС является дефицит костной ткани, в подавляющем большинстве случаев — дефицит костной ткани вертлужной впадины. Выбор тактики хирургического лечения значительно облегчается, если известна величина дефекта вертлужной впадины и его локализация [1].

Для определения этих параметров W.G. Paprosky с соавторами была предложена простая в воспроизведении и отличающаяся практической направленностью классификация [2]. Одним из самых тяжелых является массивный дефект вертлужной впадины с полной потерей опоры для всех ее структур — тип III B по классификации Paprosky. То есть происходит разрушение надацетабулярного массива и имплантат смещается более чем на 3 см выше верхнего края запирательного отверстия. Кроме того, наблюдается медиальное смещение ацетабулярного компонента в полость малого таза с захождением его за линию Келера, вплоть до крестцово-подвздошного сочленения. Задняя колонна также имеет признаки повреждения и теряет свою опороспособность. Рентгенологически это проявляется распространением зоны остеолиза ниже 15 мм от верхнего края запирательного отверстия. Таким образом, при этом типе дефекта поражаются крыша вертлужной впадины, обе колонны и дно. Менее 40 % костной ткани сохраняет свою способность фиксировать вертлужный компонент с пористым покрытием [3].

На начальных этапах ревизионной артропластики традиционно применяется установка вертлужных компонентов цементной фиксации с использованием большого количества костного цемента, однако

это зачастую приводит к развитию ранней нестабильности чашки, прогрессу дефицита костной ткани. По наблюдениям H.C. Amstutz с соавторами, нестабильность вертлужного компонента появилась у 9,1 % больных в течение 2 лет после операции [4]. Для восполнения костного дефицита J. Meehan и A.A. Jamali предлагают использовать массивные аллотрансплантаты и ацетабулярные компоненты бесцементной фиксации. Однако их применение повышает риск ранних и поздних осложнений, включая инфекционные [5]. Частота неудовлетворительных результатов при данной методике составляет от 17 % до 60 % через 2–14 лет после операции [6]. Поэтому для реконструкции при больших дефектах вертлужной впадины многие хирурги рекомендуют использовать либо пересадку всей вертлужной впадины и установку чашки цементной фиксации (преимущественно у лиц молодого возраста), либо опорное антипротрузионное кольцо (АПК) и чашку цементной фиксации (у больных старших возрастных групп) [4, 5]. Во всех предлагаемых методиках замещение дефекта и имплантация ацетабулярного компонента выполняются одномоментно. Расчет делается на опорность костной пластики и первичную «press-fit» фиксацию ацетабулярного компонента, а также на то, что последующая перестройка костного пластического материала позволит достичь вторичной фиксации компонента [6].

**Цель исследования:** демонстрация возможности двухэтапного реэндопротезирования тазобедренного сустава при наличии обширного костного дефекта с высоким риском развития ИОХВ, возникшего после проведенного ранее реэндопротезирования с замещением дефекта большим количеством костного цемента.

## Материал и методы

В работе использовались:

- клинические методы — сбор анамнеза, осмотр, пальпация;
- рентгенологические методы — рентгенодиагностика (серия снимков костей таза в прямой проекции), мультисрезовая компьютерная томография (МСКТ) — толщина слоя 0,5 мм, лучевая нагрузка $2{,}0 \pm 0{,}9$ мЗв, 32-срезовый аппарат PHILIPS;
- PRF-технология — метод получения тромбоцитов с высоким содержанием фибрина [7];
- депротеинизированные костные аллотрансплантаты в виде продольных распилов, изготовленные из прижизненно резецированных головок бедренных костей. Аллотрансплантаты готовили по авторской методике [*]. Важным свойством данного материала

является сохранение необходимого уровня физико-механических характеристик, морфологических особенностей и элементного состава аллогенной кости [8, 9].

В качестве примера мы представляем клинический случай. В работе с пациентом соблюдались этические принципы, предписанные Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki) пересмотра 2013 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Пациент дал добровольное письменное согласие на публикацию данного клинического наблюдения.

Пациентка в возрасте 71 года поступила для лечения 21.04.2016 г. с диагнозом: асептическая ацетабулярная нестабильность эндопротеза ЭСИ правого тазобедренного сустава, несостоятельность функции сустава (НФС) 2 ст., укорочение правой нижней конечности на 2 см. Синдром коксалгии справа. При поступлении предъявляла жалобы на боли в области паха справа, в правой ягодичной области и пояснице, укорочение правой нижней конечности. В параклинических анализах признаков системного воспаления не найдено.

В анамнезе пациентки в 1992 г. закрытый перелом вертлужной впадины справа в результате дорожно-транспортного происшествия, по поводу которого было выполнено эндопротезирование тазобедренного сустава. В 2000 г. была выявлена асептическая нестабильность эндопротеза, вследствие чего проведено реэндопротезирование правого тазобедренного сустава. В 2005 г. по поводу тотальной асептической нестабильности проведено второе реэндопротезирование тазобедренного сустава справа. С момента проведения повторного реэндопротезирования пациентку беспокоили боли в области правого ТБС, усиливающиеся при ходьбе. С сентября 2015 г. боли носили постоянный характер. Пациентка поступила в нашу клинику для проведения реэндопротезирования правого тазобедренного сустава.

По результатам дополнительных исследований признаков системного воспаления не отмечено. По данным рентгенологических методов исследования (рентгенограмма таза в прямой проекции, рентгенограмма правого тазобедренного сустава в 2 проекциях, МСКТ с последующей 3D-реконструкцией) у пациентки выявлен дефект вертлужной впадины типа 3В по классификации Paprosky. Отмечено увеличение размеров вертлужной впадины до 70 на 47 мм. Дно вертлужной впадины истончено, с наличием дефектов и фрагментаций костной ткани, пролабирует в полость малого таза на 25 мм и до крестцово-подвздошного сочленения (рис. 13.1–13.3).

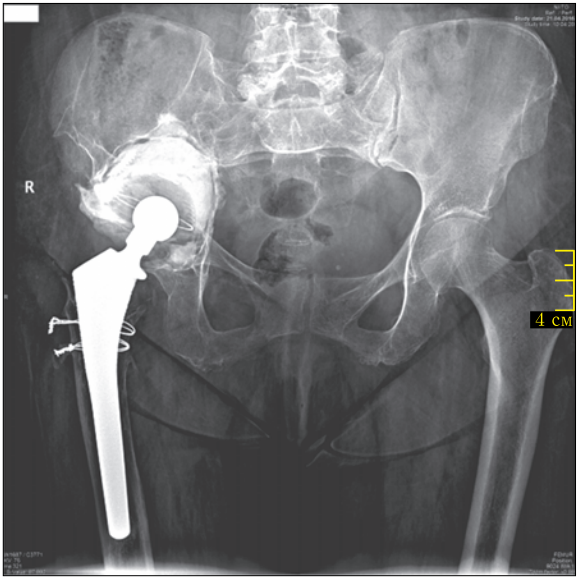


Рис. 13.1. Рентгенограмма таза в прямой проекции: нестабильность эндопротеза ЭСИ (цементный вариант) справа. Массивная цементная мантия сформирована в результате попыток компенсировать дефект костной ткани

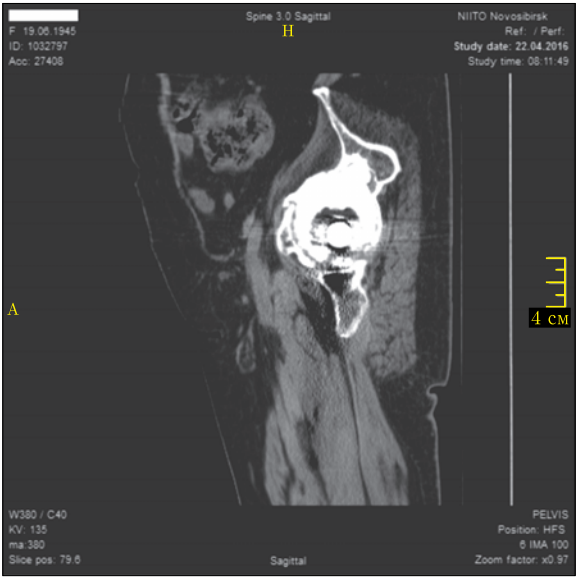


Рис. 13.2. МСКТ костей таза: обширный дефект костной ткани в области вертлужной впадины, массивная цементная мантия с признаками нестабильности

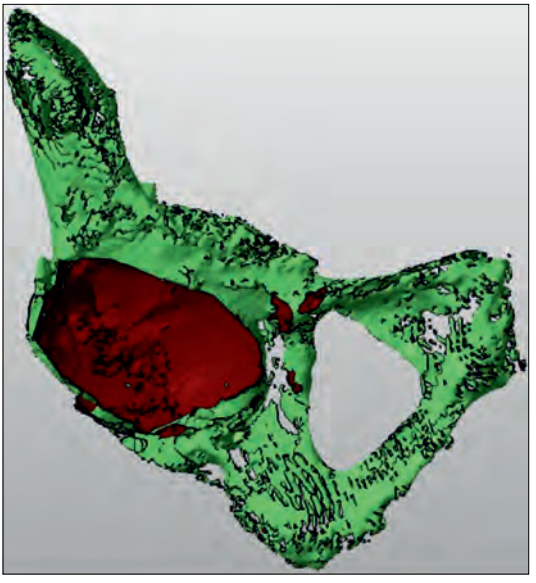

Рис. 13.3. 3D-реконструкция костей таза справа. Красным выделен дефект при виртуальном удалении чашки и цементной мантии. Объем дефекта по данным 3D-реконструкции оставил 203,1 см$^3$

Учитывая многократность (1992, 2000, 2005 гг.) оперативного лечения, для исключения парапротезной инфекции выполнена пункция области протеза. Результат бактериологического исследования отрицательный. При анализе по шкале ASA (Американское общество анестезиологов) соматический статус и операционные риски определялись как III (1 балл), прогнозируемый объем операции и время превышали значение 75 перцентилей (1 балл), а класс раны соответствовал условно чистой ране (учитывая многократность ранее выполненных операций) [10].

Таким образом, риск развития инфекции по шкале NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance), согласно рекомендациям CDC (Centers for Disease and Prevention), оценивался в 3 балла [11]. Это соответствовало вероятности развития инфекции в области хирургического вмешательства (ИОХВ) в 15–18 % случаев [12, 13].

Это обстоятельство побудило принять решение о проведении двухэтапного эндопротезировании. Первым этапом планировалось удаление эндопротеза и костная аллопластика дефекта с применением PRF-технологии. Для предотвращения смещения аллотрансплантата предусматривалась установка металлической сетки Flexible wire mesh (X-change Revision Surgical Protocol Stryker Exeter), закрепленной

шестью винтами Stryker, ввинченными по периметру дефекта. Одновременно во время операции планировалось провести забор биоптатов (не менее 6) для снятия вопроса о латентной парапротезной инфекции. В дальнейшем, при отсутствии в послеоперационном периоде ИОХВ и при сформированной опорной костной пластике, планировалось провести второй этап лечения с имплантацией ревизионных ацетабулярных конструкций.

27.04.2016 г. было выполнено оперативное вмешательство — удаление эндопротеза ЭСИ с костной пластикой дефекта. Доступ был дугообразный по наружной поверхности проксимальной трети бедра по старому послеоперационному рубцу. Был остро мобилизован большой вертел и область шейки бедренного компонента эндопротеза. В результате иссечения рубцов идентифицированы измененные стенки вертлужной впадины с костным цементом. Головка эндопротеза выведена в рану и удалена. Бедренный компонент эндопротеза был стабилен, проксимальная часть бедренной кости имела признаки костного лизиса: большой вертел отсутствовал, в области малого вертела имелись костные дефекты, заполненные детритом белого цвета. Бедренный компонент ножки ЭСИ с конусом 11/13 был удален путем тракции с небольшим усилием. В области ранее установленных серкляжей произошел линейный перелом бедренной кости, что потребовало его фиксации канатом.

Цементная ацетабулярная впадина ЭСИ оказалась нестабильной, подвижной. Удалить ее единым с цементной мантией конгломератом, без повреждения сформированных вокруг нее костных структур, не представлялось возможным. Поэтому ацетабулярная впадина была сначала последовательно высверлена фрезами, а затем цементная мантия была фрагментирована остеотомами и удалена.

Дефект вертлужной впадины был идентифицирован как III B по Paprosky. Передняя колонна отсутствовала, вместо нее имелась вздутая измененная костная ткань — утолщенная костная пластина по типу арки. Дно впадины имело вид тонкой изогнутой вовнутрь костной пластинки, которая простиралась вверх и медиально вплоть до крестцово-подвздошного сочленения. Надацетабулярный массив отсутствовал, задняя колонна была изменена, но сохранна. Задний край вертлужной впадины отсутствовал. Седалищная кость на протяжении 15 мм была заполнена белым детритом. Контур кости сохранился в виде тонких пластинок по периферии. Видимая лонная кость была сохранной и кровоточила. На внутренней поверхности костного дефекта отмечалось большое количество грануляций цианотичного оттенка, которые были взяты для проведения бактериологического исследования.

Из периферической вены пациентки осуществили забор 42 мл крови (с добавлением Z-активатора) в 6 пробирок, по 7 мл в каждую и по 1 мл 10 % раствора хлорида кальция. Центрифугирование пробирок осуществлялось с ускорением 4g в течение 10 минут. Полученные фибриновые сгустки были уложены в костный дефект впадины поочередно с депротеинизированными костными аллотрансплантатами в виде пластин толщиной до 3–5 мм, изготовленными из головок бедренных костей (рис. 13.4).

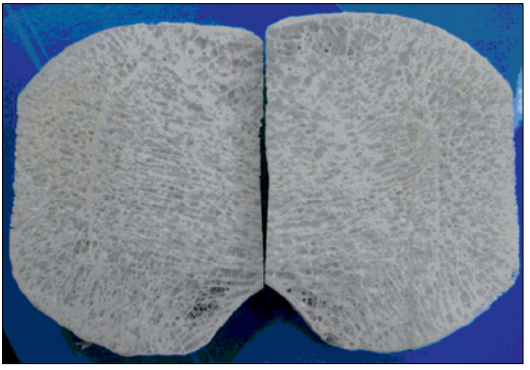

Рис. 13.4. Макрофотография смежных срединных распилов депротеинизированного костного аллотрансплантата толщиной 5 мм

Укладка производилась с импакцией. После полного заполнения дефекта, для предотвращения смещения аллотрансплантата при вертикализации пациентки была произведена фиксация перфорированной мягкой пластиной Flexible wire mesh (X-change Revision Surgical Protocol Stryker Exeter), закрепленной шестью винтами (Stryker) (рис. 13.5).

Дренаж не ставили в связи с необходимостью формирования гематомы для пропитывания трансплантата тромбоцитами. В завершение были наложены послойные швы на рану викрилом, внутрикожные швы, асептическая повязка.

Послеоперационный период протекал без особенностей, проводилась антибактериальная терапия Цефазолином 2 г 3 раза в сутки, до получения результатов бактериологических исследований. Отрицательные результаты были получены на 5-е сутки, после чего антибиотики были отменены. Больная была обучена ходьбе при помощи костылей и выписана домой на 14-е сутки после операции.

Учитывая выявленные у пациентки системную остеопению с Т-критерием $= -1{,}5$, вторичный распространенный остеопороз правой нижней конечности, выраженный регионарный остеопороз в области

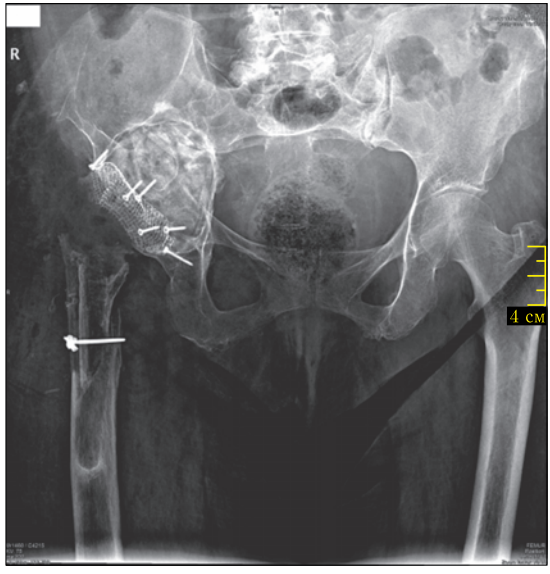


Рис. 13.5. Рентгенограмма таза в прямой проекции: удален цементный эндопротез справа, образовавшийся дефект костной ткани области вертлужной впадины замещен депротеинизированным костным аллотрансплантатом с применением PRF-технологии, аллотрансплантаты фиксированы сеткой Flexible wire mesh (X-change Revision Surgical Protocol Stryker Exeter), закрепленной шестью винтами (Stryker)

правого ТБС на фоне грубых склеротических изменений смежных отделов сочленяющихся костей, срок ожидания второго этапа был сокращен до 4 месяцев. Отсутствие признаков ИОХВ в этот период подтвердило асептический характер нестабильности, что, в свою очередь, повысило вероятность сохранения опороспособности костно-пластического материала в дефекте. Также имелась вероятность сохранения приемлемого качества костной ткани в области правой бедренной кости.

Больная поступила на второй этап лечения 09.09.2016 г. При поступлении был поставлен диагноз: дефект правого тазобедренного сустава после удаления эндопротеза ЭСИ, состояние после костной пластики обширного дефекта правой вертлужной впадины III B, неопорная правая нижняя конечность. В ОАК отмечался лейкоцитоз с дегенеративным правым сдвигом, тромбоцитоз, СОЭ 66 мм/ч, СРБ — 8,97 мг/л.

Отсутствие системного воспаления позволило выполнить этапное оперативное лечение. На 17-й неделе после удаления протеза и про-

ведения костной аллопластики было выполнено реэндопротезирование правого тазобедренного сустава эндопротезом Zimmer Wagner 225/Continuum + аугмент.

Доступом по прежнему операционному рубцу в проксимальной трети правого бедра были рассечены кожа, подкожная клетчатка, фасция, мобилизованы рубцы. Остро мобилизована область вертлужной впадины. Визуализированы металлическая сетка и винты.

Конструкции были удалены без технических трудностей. Под сеткой определялся плотно спаянный с костным ложем массив костного аллотрансплантата с ровной поверхностью. Кусачками были взяты фрагменты из данной зоны для гистологического исследования. Затем визуализирована седалищная кость как нижняя точка опоры. Верхняя точка опоры верифицирована в области крыла подвздошной кости на расстоянии 76–78 мм от седалищной кости. Вертлужная впадина была обработана последовательно с 54 мм, ориентируясь на истинный центр ротации, с периодическим включением режима реверса, до 62 мм. При этом избегали медиализации, максимально сохраняя костную пластику.

Ацетабулярная впадина Continuum 62 с аугментом 62/20 тестирована, причем аугмент на половину длины имплантировали в верхнюю сферу дефекта с импакцией костной ткани. Расклинивание между точками опоры расценено как достаточное. Аугмент был последовательно фиксирован тремя шурупами: одним диаметром 50 мм и двумя диаметром 60 мм, после чего в промежуток между седалищной костью и аугментом имплантирован ацетабулярный компонент Zimmer Continuum размером 62 мм с фиксацией к аугменту цементом и дополнительной фиксацией одним винтом 50 мм. Погружение впадины достаточное. Фиксация удовлетворительная. Установлен полиэтиленовый вкладыш 36 мм под головку бедренной кости.

Далее проксимальный конец бедренной кости был выведен в рану. Визуализирован бедренный канал, иссечены рубцы. Костная ткань в верхней трети была оценена как достаточно плотная, кровоточила. Сверлами был расширен бедренный канал и произведена имплантация бедренной ножки размером 14/225. Головка эндопротеза — 3,5/36 зафиксирована на бедренном компоненте. Эндопротез собран в ране, проверен объем движений. Объем движений признан достаточным. Через контрапертуру к ложу эндопротеза подведена хлорвиниловая дренажная трубка. Были наложены послойные швы на рану викрилом, внутрикожные швы, асептическая повязка. Сделаны послеоперационные контрольные рентгенограммы (рис. 13.6).

Ближайший отдаленный результат был оценен спустя 10 месяцев по заочной консультации, больная отказалась проходить очный осмотр,

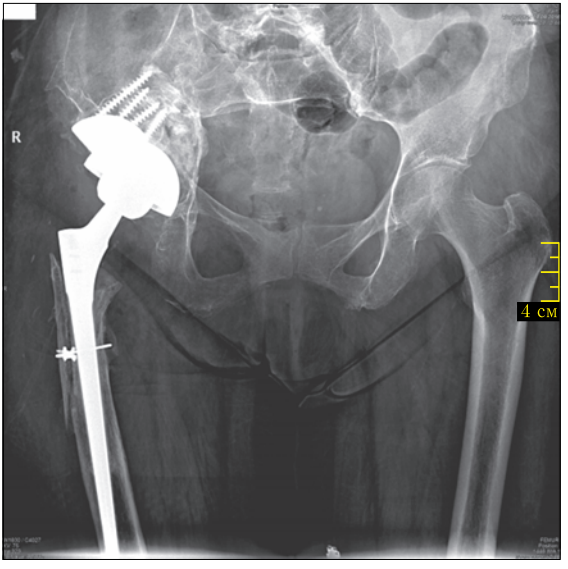


Рис. 13.6. Контрольная рентгенограмма таза после выполнения операции в прямой проекции: тотально замещенный эндопротезом тазобедренный сустав с использованием одного стандартного аугмента Zimmer, фиксированного тремя винтами. Чашка Continuum имплантирована по технологии «press-fit», дополнительно фиксирована одним винтом. Ножка Zimmer Wagner 225

мотивируя отсутствием болевого синдрома. При опросе по телефону выяснено, что пациентка ходит при помощи костыля с полной нагрузкой на правую нижнюю конечность, используя компенсатор длины конечности высотой 2 см. При ходьбе болевой синдром в области правого тазобедренного сустава оценен пациенткой по ВАШ в 3 балла. При заполнении опросника Харрисона привлекался врач — ортопед-травматолог по месту жительства, исход оценен как удовлетворительный (78 баллов).

## Обсуждение

Серия выполненных оперативных вмешательств была направлена на сохранение костной ткани, а также уменьшение количества металлоконструкций.

В данной ситуации были возможны следующие варианты.

А. Реэндопротезирование с использованием стандартных аугментов Zimmer. Минусы: пришлось бы использовать некую сборную конструкцию без гарантий какой-либо стабильности при опоре на конечность.

Б. Изготовление с использованием 3D-технологий индивидуальной конструкции для заполнения дефекта. Минусы: риск инфицирования, а при микроподвижности конструкции — массивный металлоз [14].

Выбранная методика представляется в данном случае как вариант решения проблемы. При сохранении опоры удалось свести к минимуму использование металлических компонентов для замещения дефекта костной ткани вертлужной впадины. Это является весомым прогностически положительным фактором, поскольку минимизирует риск развития металлоза, снижает вероятность инфицирования и расширяет возможности при последующих реэндопротезированиях.

Следует отметить, что недостатки есть и у выбранной методики. Прежде всего, это отсутствие уверенности на первом этапе, что аллокость полноценно и полностью перестроится. Из литературных источников известно, что в случае, если объем пересаженной аллокости превышает 6 $см^3$, то перестройка трансплантата протекает медленнее, чем при меньших объемах имплантированной аллокости [15]. Прочностные свойства аллокости в этом периоде времени имеют большое значение, поскольку основной механизм замещения в случае крупного дефекта — остеокондуктивный остеогенез, при котором замещение вновь образованной костью идет от периферии к центру дефекта, за счет оппозиционного роста костной ткани. По данным Т.А. Кулябы с соавторами, «на границе с аллокостью происходит поверхностное врастание соединительной ткани и сосудов в костную ткань трансплантата с частичной его перестройкой в костную ткань. Основная масса губчатого аллотрансплантата остается без изменений даже спустя 54 месяца после операции» [16]. Для оптимизации процесса перестройки аллотрансплантатов используется сочетание их с тромбоцитами, обогащенными фибрином (PRF). PRF-технологии позволяют получить в концентрированной форме аутологичные факторы роста, которые способствуют формированию очагов остеогенеза не только на периферии, но и по всему массиву аллотрансплантата. В результате при данной комбинации происходит более полная перестройка аллотрансплантата на всем протяжении [17, 18].

Кроме вопросов, связанных с перестройкой аллокости, при данной методике возникают серьезные неудобства для пациента: от 3 до 12 месяцев нижняя конечность не является опорной и передвижение возможно только с костылями либо с ходунками [19]. Однако у пациентов более молодого возраста (до 55 лет) данная тактика реэндопротезирования оптимальна [20, 21]. В неосложненных клинических ситуациях, например при первичном эндопротезировании с замещением дефекта костной ткани, оперативное вмешательство возможно в один этап [22, 23].

## Заключение

Существующие методики реэндопротезирования дают хорошие результаты при относительно небольших сроках наблюдения. Однако в среднесрочной перспективе вновь появляются зоны остеолиза вокруг имплантата, что ведет к утрате его стабильности и повторным ревизионным операциям. К сожалению, каждое последующее вмешательство неизбежно влечет за собой нарастание дефицита костной ткани, развитие рубцово-дистрофических изменений в мышцах области оперированного сустава и повышает риск инфекционных осложнений. Представленный клинический пример свидетельствует о том, что выполнение аллопластики костной тканью в сочетании с PRF-технологией является альтернативой установке массивных металлоконструкций области вертлужной впадины. При использовании сочетания аллопластики и PRF-технологии снижается риск инфицирования объемного имплантата, возникновения металлоза окружающих тканей, а также расширяются возможности дальнейшего реэндопротезирования.

## Список литературы

1. *Lachiewicz P.F.*, *Soileau E.S.* Tantalum components in difficult acetabular revisions // Clin. Orthop. relat res. 2009. No 2. P. 454–458.
2. *Paprosky W.G.*, *Perona P.G.*, *Lawrence J.M.* Acetabular defect classification and surgical reconstruction in revision arthroplasty. A 6-year follow-up evaluation // J. Arthroplasty. 1994. V. 9. P. 33–44.
3. *Тихилов Р.М.*, *Цыбин А.В.*, *Сивков В.С.*, *Гончаров М.Ю.*, *Сементковский А.В.*, *Малыгин Р.В.* Сравнительная характеристика различных методик ревизионной артропластики при асептической нестабильности вертлужного компонента эндопротезов тазобедренного сустава // Травматология и ортопедия России. 2007. Т. 1. С. 5–11.
4. *Amstutz H.C.*, *Le Duff M.J.*, *Johnson A.J.* Socket position determines hip resurfacing 10-year survivorship. Clinical Orthopaedics and Related Research. 2012. V. 470, No 11. P. 3127–3133; DOI: 10.1007/s11999-012-2347-y
5. *Meehan J.*, *Jamali A.A.*, *Hien Nguyen* Prophylactic Antibiotics in hip and Knee Arthroplasty // J. Bone Joint Surg Am. 2009. V. 91. P. 2480–2490.
6. *Uchiyama K.*, *Takahira N.*, *Fukushima K.*, *Moriya M.*, *Yamamoto T.*, *Minegishi Y.*, *Sakai R.*, *Itoman M.*, *Takaso M.* Two-stage revision total hip arthroplasty for periprosthetic infections using antibiotic-impregnated cement spacers of various types and materials // E Scienti C World J. 2013; Article ID 147248.
7. *Ehrenfest D.M.*, *Bielecki T.*, *Mishra A. et al.* In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: plateletrich

plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes // Curr Pharm Biotechnol. 2012. V. 13, No 7. P. 1131–1137.

8. *Kirilova I.A.*, *Sharkeev Yu.P.*, *Podorozhnaya V.T.*, *Popova K.S.*, *Uvarkin P.V.* Structural and functional studies of bioobjects prepared from femoral heads // AIP Conf. Proc. V. 5. Cep. «New Operational Technologies, NEWOT 2015: Proc. of the 5th Intern. Sci. Conf. "New Operational Technologies"» 2015. P. 030005; DOI: 10.1063/1.4936000
9. *Кирилова И.А.*, *Шаркеев Ю.П.*, *Подорожная В.Т.*, *Попова К.С.*, *Уваркин П.В.*, *Фомичев Н.Г.* Изучение морфологии срединных распилов головки бедренной кости. Успехи современного естествознания. 2015. Т. 8. С. 58–61. https://elibrary.ru/download/elibrary_24171677_34436013.pdf
10. Физический статус пациентов по классификации ASA (американского общества анестезиологов). http://anest-rean.ru/asa/ (Дата обращения 10.11.2017.)
11. *Morgan G.E.*, *Michail M.S.*, *Murray M.J.* Clinical Anesthesiology / 4th ed. // Lange Medical Books. McCraw-Hill, 2006.
12. CDC NNIS System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992 to June 2003, issued August 2003 // Am. J. Infect. Control. 2003. V. 31. P. 481–498.
13. *Jeong M.*, *Kim H.J.*, *Lim S.J.*, *Moon Y.W.*, *Park Y.S.* Revision Total Hip Arthroplasty Using Tantalum Augment in Patients with Paprosky III or IV Acetabular Bone Defects: A Minimum 2-year follow Up Study // Hip and pelvis. 2016. No 2. P. 98–103.
14. *George D.A.*, *Gant V.*, *Haddad F.S.* The management of periprosthetic infections in the future: A review of new forms of treatment // Bone Joint J. 2015. V. 97-B, No 9. P. 1162–1169; doi: 10.1302/0301-620x.97b9.35295
15. *Анастасиева Е.А.*, *Садовой М.А.*, *Воропаева А.А.*, *Кирилова И.А.* Использование ауто- и аллотрансплантатов для замещения костных дефектов при резекциях опухолей костей // Травматология и ортопедия России. 2017. Т. 23, № 3. С. 148–155.
16. *Куляба Т.А.*, *Корнилов Н.Н.*, *Бовкис Г.Ю.*, *Кроитору И.И.*, *Румакин В.П.* Костная аллопластика при ревизионном эндопротезировании коленного сустава: гистологическая характеристика структурного трансплантата через 54 месяца после имплантации // Травматология и ортопедия России. 2016. Т. 22, № 4. С. 122–130.
17. *Attar Bijan Movahedian*, *Naghdi Navid*, *Sh. Milad Etemadi et al.* Chin Symphysis Bone, Allograft, and Platelet-Rich Fibrin: Is the Combination Effective in Repair of Alveolar Cleft? // J. Oral and Maxillofacial Surgery. 2017. V. 5, No 75. P. 1026–1035.
18. *Коротких Д.В.*, *Парфенова А.А.* A — PRF. Практика // Имплантология. 2015. Т. 9, № 141. С. 60–63.

19. *Duncan W.W.*, *Hubble M.J.*, *Howell J.R.*, *Whitehouse S.L.*, *Timperley A.J.*, *Gie G.A.* Revision of the cemented femoral stem using a cement-in-cement technique: a five- to 15-year review // J Bone Joint Surg Br. 2009. V. 91, No 5. P. 577–582.

20. *Carpenter M.G.*, *Frank J.S.*, *Adkin A.L.*, *Paton A.*, *Allum J.H.* Influence of postural anxiety on postural reactions to multi-directional surface rotations // J. Neurophysiol. 2004. V. 92, No 6. P. 3255–3265.

21. *Haidukewych G.J.*, *Rothwell W.S.*, *Jacofsky D.J.*, *Torchia M.E.*, *Berry D.J.* Operative treatment of femoral neck fractures in patients between the ages of fifteen and fifty years // J. Bone Joint Surg Am. 2004. V. 86-A, No 8. P. 1711–1716.

22. *Macnicol M.F.*, *Lo H.K.*, *Yong K.F.* Pelvic remodelling after the Chiari osteotomy. A long-term review // J. Bone Joint Surg Br. 2004. V. 86, No 5. P. 648–654.

23. *Чарчян А.Г.*, *Арутюнян Г.Р.*, *Гюлзадян Г.Г.*, *Бахтамян Г.А.*, *Бдоян Г.А.*, *Маргарян А.С.* Пластика обширных костных дефектов вертлужной впадины при ревизионных артропластиках. http://www.med-practic.com/rus/163/1804/article.more.html

24. Патент 2223104 Российской Федерации, МПК A61K35/32, A61F2/28, A61L27/00, A61L27/54, A61P19/00. Способ получения костного трансплантата / И.А. Кирилова, В.Т. Подорожная; патентообладатель: Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии (RU). № 2001126472/15, заявл. 28.09.2001; опубл. 10.02.2004. http://bd.patent.su/2223000-2223999/pat/servl/servleteb6f.html

# 14. ХИРУРГИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ ОСТЕОИД-ОСТЕОМ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ (КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ)

*Е.В. Губина, Д.В. Рыжиков, В.Т. Подорожная, И.А. Кирилова, А.В. Андреев, М.А. Садовой, Н.Г. Фомичев, А.В. Бондаренко, Л.М. Афанасьев, А.С. Ревкович, Е.В. Сенченко*

Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2018. Т. 97, № 2. С. 117–121

Раздел посвящен обзору клинических случаев лечения пациентов с доброкачественной опухолью (остеоид-остеома) различной локализации. Пациенты оперировались в детской клинике № 2 Новосибирского НИИТО в период с 2009 по 2017 гг. Всего было пролечено 7 пациентов: 3 мальчика и 4 девочки в возрасте 3–15 лет. Ни у одного из пациентов остеоид-остеома не была диагностирована первично на амбулаторном этапе. Во всех наблюдениях поражение носило монооссальный характер: 1 — седалищная кость, 1 — полудужка позвонка, 1 — шейка бедренной кости, 1 — межвертельная зона бедренной кости, 3 — большеберцовая кость. Объем хирургического лечения включал резекцию патологического очага вместе с зоной склероза (в 2 случаях выполнялась ауто- и аллокостная пластика дефекта, в 2 случаях хирургическое лечение было повторным после попытки лечения по месту жительства). Ни в одном из наблюдений не было расхождений клинического и послеоперационного гистологического диагнозов, послеоперационных осложнений зафиксировано не было. Излечение достигнуто в 100 %, срок послеоперационного наблюдения до 7 лет. Статья будет полезна «детским» специалистам: ортопедам, педиатрам, хирургам, неврологам.

## 14. SURGICAL TREATMENT OF OSTEOID-OSTEOMAS IN CHILDREN AND ADOLESCENTS (CLINICAL OBSERVATION)

*E.V. Gubina, D.V. Ryzhikov, V.T. Podorozhnaya, I.A. Kirilova, A.V. Andreev, M.A. Sadovoi, N.G. Fomichev, A.V. Bondarenko, L.M. Afanasiev, A.S. Revkovic, E.V. Senchenko*

The paper describes the clinical cases of treatment of patients with benign tumor (osteoid osteoma) of different localization. Patients operated on at the children's hospital No. 2, Novosibirsk NIITO in the period from 2009 to 2017 were

treated Only 7 patients: 3 boys and 4 girls aged 3–15 years. None of the patients with osteoid osteoma was diagnosed primarily on the outpatient basis. In all cases the lesion was wearing monoaxially character: 1 — ischium, 1 — polutorka vertebra, 1 is the neck of the femur, 1 — intertrochanteric area of the femur, 3-tibia. The volume of surgical treatment included the resection of the pathological focus, together with the area of sclerosis (in 2 cases was performed by auto — and alcosta plastic defect, 2 cases of surgical treatment was repeated after an attempt of treatment by place of residence). None of the observations were not differences in clinical and postoperative histological diagnosis, postoperative complications were recorded. A cure was achieved in 100 %, postoperative follow-up period to 7 years. This article «child» specialists: orthopedists, pediatricians, surgeons, neurologists.

Остеоид-остеома (ОО) — доброкачественная опухоль, состоящая из активных остеобластов без атипии (9191/0 по 4-му изданию WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone, 2013) [1, 2, 3]. ОО встречаются в 4–11 % среди всех доброкачественных опухолей кости, до 80 % случаев приходятся на возраст до 25 лет, у мужчин диагностируется в 4 раза чаще [2, 4, 1, 5, 6, 7].

Обычно размеры опухоли не превышают 1 см в диаметре. Классификация ОО по расположению выделяет три вида: кортикальная (80 %); внутрисуставная или околосуставная (преимущественно шейка бедренной кости, кости кистей и стоп, позвоночник); поднадкостничная (преимущественно межвертельная область бедренной кости, кости кистей, стоп, особенно шейка таранной кости). Мультицентрическая, или многоочаговая ОО возникает крайне редко. Располагается преимущественно диафизарно/метафизарно в длинных трубчатых костях (65 %), фалангах (20 %) или позвоночнике (10 %) [1, 8].

Опухоль с высокой степенью оссификации, в центральной части — высоковаскуляризированное ядро (при наличии кальцификации — «зрелая» остеоид-остеома). Вокруг очага поражения происходит реактивное формирование новой костной ткани. Окружающая склерозированная костная ткань не имеет опухолевой природы и является реакцией реактивного периостального/эндостального костеобразования [1, 9].

Для ОО нехарактерна безболевая форма [9, 10]. Наибольшую диагностическую ценность в клинической картине представляет постепенно нарастающий (до интенсивного) болевой синдром, усиливающийся в ночное время (Fowles, 1964), а прием небольших доз аспирина значительно уменьшает боль (Freiberg с соавторами, 1959) [8]. В этиологии болевого синдрома участвуют вырабатываемые простагландины и постоянное растяжение надкостницы с раздражением ее нервных окончаний [10, 11]. Боль может носить иррадиирующий характер в соседний

сустав. При околосуставной локализации диагностируется синовиит, нарушение походки, контрактура сустава, а при длительном течении возможны вторичные нейротрофические нарушения в виде гипотрофии мягких тканей [10]. Поражения позвонков проявляются ограничением движений в позвоночнике на фоне болевого синдрома, защитным напряжением мышц на стороне, противоположной пораженной, с формированием вынужденной позы, могут иметь место невралгии и плексит [2, 8, 12].

При подозрении на ОО проводится дифференциальная диагностика остеомиелитом, туберкулезом, остеогенной саркомой, абсцессом Броди, юкстакортикальной хондромой, остеомой, метафизарным фиброзным кортикальным дефектом, инфарктом кости [1, 2, 8, 9]. Определяющим в дифференциальной диагностике является морфологическое исследование.

Рентгенография пораженного сегмента — первичный метод инструментального обледования, применяемый на амбулаторном этапе. Определяется очаг остеолиза в кортикальном слое кости размером с рисовое зерно, окруженный зоной склероза. Нередко кортикальный слой значительно утолщен. При внутрисуставной локализации склероз может отсутствовать. МСКТ-обследование показано случаях, когда клиническая картина ОО не подтверждена рентгенологически, а при недостаточной информативности МСКТ показано проведение сцинтиграфии. Диагностическая ценность МРТ при ОО рассматривается не всеми авторами [1, 13, 14].

Рентгенография пораженного сегмента — первичный метод инструментального обследования, применяемый на амбулаторном этапе при подозрении на любой костный опухолевый процесс и на остеоид-остеому в частности. При подозрении на остеоид-остеому выполняется рентгенография соответствующего сегмента конечности (сустава, участка тела) в двух стандартных проекциях, дополняемых по показаниям рентгенографией в специальной укладке, позволяющей вывести очаг поражения в краевое положение. При рентгенологическом исследовании при локализации в губчатом веществе остеоид-остеома проявляется очагом литической деструкции круглой или овальной формы размером 1–2 см. Структура очага просветления однородная, иногда в центре определяется интенсивное включение — «секвестроподобная» тень (по образному выражению С.А. Рейберга, картина становится похожа на «гнездо с яйцом» [13]. Вокруг очага деструкции располагается зона реактивного склероза (происходит реактивное формирование новой костной ткани). Окружающая склерозированная костная ткань не имеет опухолевой природы и является реакцией реактивного

периостального/эндостального костеобразования [1, 9, 13, 14]. При внутрисуставной локализации склероз может отсутствовать.

При ангиографии констатируется повышенная васкуляризация остеоид-остеомы за счет расширения приводящих и отводящих сосудов без нарушения обычной архитектоники сосудистого рисунка [14].

Вероятность диагностики остеоид-остеомы по плоскостным рентгенограммам достаточно высока при расположении патологического очага в диафизарном и метадиафизарном отделах длинных и коротких трубчатых костей. Однако первичная рентгенологическая диагностика остеоид-остеомы имеет низкую информативность у пациентов с локализацией опухоли в костях таза, в области ямки локтевого отростка плечевой кости, в таранной кости и у части детей с поражением проксимального метафиза бедренной кости [1, 13, 14].

МСКТ-обследование показано в случаях, когда клиническая картина остеоид-остеомы не подтверждена рентгенологически, а при недостаточной информативности МСКТ показано проведение сцинтиграфии. Диагностическая ценность МРТ при остеоид-остеоме рассматривается не всеми авторами [2, 14].

Дифференциальная диагностика остеоид-остеомы проводится с остеомиелитом, туберкулезом, остеогенной саркомой, абсцессом Броди, юкстакортикальной хондромой, остеомой, метафизарным фиброзным кортикальным дефектом, инфарктом кости [1, 2, 3, 9]. Определяющим в дифференциальной диагностике является морфологическое исследование.

Для остеоид-остеомы характерно медленное прогрессирование, гипотрофия мышц пораженного сегмента, болевой синдром постоянный и нарастающий со временем до интесивного, признаки локальных изменений (гипертермия, гиперемия, усиление сосудистого рисунка и т. д.) неотчетливые или отсутвуют, не описано случаев озлокачествления, гипероостоз формируется уже в ранней стадии процесса, остетосклероз — ведущий рентгенологический симптом с начала заболевания, деструкция определяется не всегда [13].

Ниже мы приводим собственный опыт в лечения пациентов с ОО. Ни в одном из случаев диагноз ОО не был установлен первично на амбулаторном этапе. У всех пациентов в объеме предоперационного обследования проводилось МСКТ-обследование (мультипланарные реконструкции в сагиттальной, аксиальной, фронтальной проекциях, 3D-реконструкции), интраоперационно выполняется ЭОП-маркировка очага поражения, а при «сложных» локализациях имеется возможность применения компьютерной навигации.

**Клинический пример 1**

Пациент 13 лет. При спортивной травме диагностирован «ушиб мягких тканей голени», рентгенологическое исследование не проводилось. Несмотря на проводимое консервативное лечение (охранительный режим, физио, компрессы и противоспалительные мази), болевой синдром (усиливающийся ночью) и отек голени сохранялись. В ортопедическом статусе: правая голень увеличена в объеме в средней и верхней трети, кожные покровы не изменены, сосудистый рисунок не усилен,

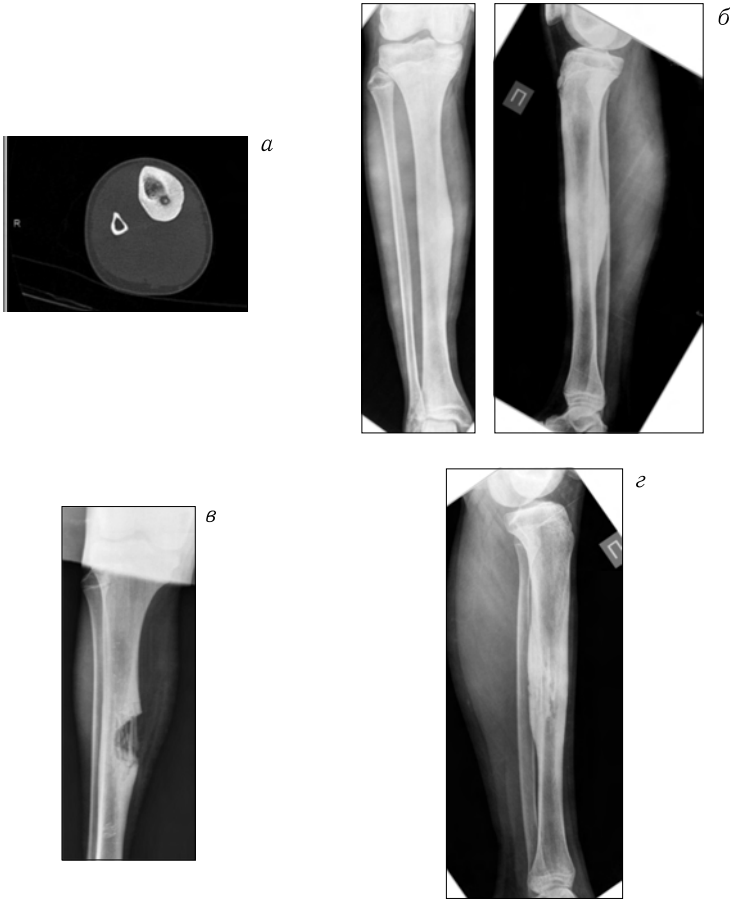


Рис. 14.1. *а*) МСКТ голени до операции; *б*) рентгенография голени дооперации; *в*) рентгенография интраоперационно после пластики аллокостными трансплантатами дефекта большеберцовой кости; *г*) рентген-контроль через 12 мес после операции

периферические лимфоузлы не увеличены. При пальпации и перкуссии легкий болевой синдром в средней и верхней трети большеберцовой кости. Функция смежных суставов не нарушена. Периферических неврологических, двигательных расстройств нет. Рентгенологически: по заднелатеральному контуру большеберцовой кости веретенообразное утолщение кортикального слоя протяженностью $\sim$ 13 см, с наличием участка просветления в центральном отделе утолщения. По МСКТ: в структуре утолщенной кортикальной кости во внутреннем слое, ближе к костномозговому каналу имеется очаг деструкции. В структуре утолщенного кортикального слоя определяется сосудистая ветвь, просматривается до эндоста. В остальном структура кортикальной кости гомогенная, наружный контур диафиза четкий, ровный. Эндост неравномерно утолщен, уплотнен, контур его неровный бахромчатый. Параосального мягкотканного компонента не выявлено. Структура мягких тканей голени не изменена. На этапе предоперационного обследования отмечена положительная динамика по болевому синдрому на прием аспирина.

Предоперационный диагноз: остеоид-остеома средней трети правой большеберцовой кости, болевой синдром. Интраоперационно выполнена резекция одним блоком патологического очага и зоны склероза, дефект замещен аллокостными трансплантатами. Макроскопически: «гнездо» остеоид-остеомы с участком гиперостоза и склероза костно-мозгового канала. Выполнено рассверливание склерозированного костно-мозгового канала в обоих направлениях, пластика кортикального дефекта аллокостной «соломкой», гипсовая повязка. Пациент наблюдается в течение 3 лет — излечение (рис. 14.1).

### Клинический пример 2

Пациент 9 лет. С 6-летнего возраста появились эпизодические боли в левом тазобедренном суставе (ТБС), постепенно сформировался стойкий болевой синдром, не зависящий от времени суток и физической нагрузки, кратковременно купировавшийся приемом нестероидных противовоспалительных препаратов. По месту жительства проводилась дифференциальная диагностика между остеохондропатией головки бедренной кости (болезнь Пертеса) и ювенильным артритом ТБС. Рентгенологически данных за болезнь Пертеса не выявлено. На фоне проводимого консервативного лечения (охранительный режим, физиопроцедуры, медикаментозная терапия) болевой синдром не купировался.

В ортопедическом статусе: ребенок хромает на левую ногу, стоит со сгибанием левого коленного сустава, фиксированный перекос таза влево. Посегментная длина нижних конечностей симметрична. Болез-

ненность при перкуссии и пальпации области левого ТБС, ограничение ротационных движений. Периферических сосудистых и неврологических нарушений не определяется, периферические лимфоузлы интактны.

На рентгенограммах определяется: перекос таза влево. В проекции левой седалищной кости на фоне уплотнения костной ткани определяется участок просветления овальной формы размерами $\sim 10 \times 4$ мм; тени секвестров не визаулизируются. Высота суставной щели тазобедренных суставов симметричная. В легких и органах средостения видимых патологических изменений не выявлено. По МСКТ: на стороне поражения (слева) бедренная кость ротирована кнаружи. Структура боковых отделов головки и шейки бедренной кости порозна. Количество синовиальной жидкости в полости сустава увеличено, капсула сустава растянута. Структура медиального отдела вертлужной впадины на уровне тела седалищной кости неоднородная, контуры неровные. Тело седалищной кости склерозировано, в его медиальном отделе

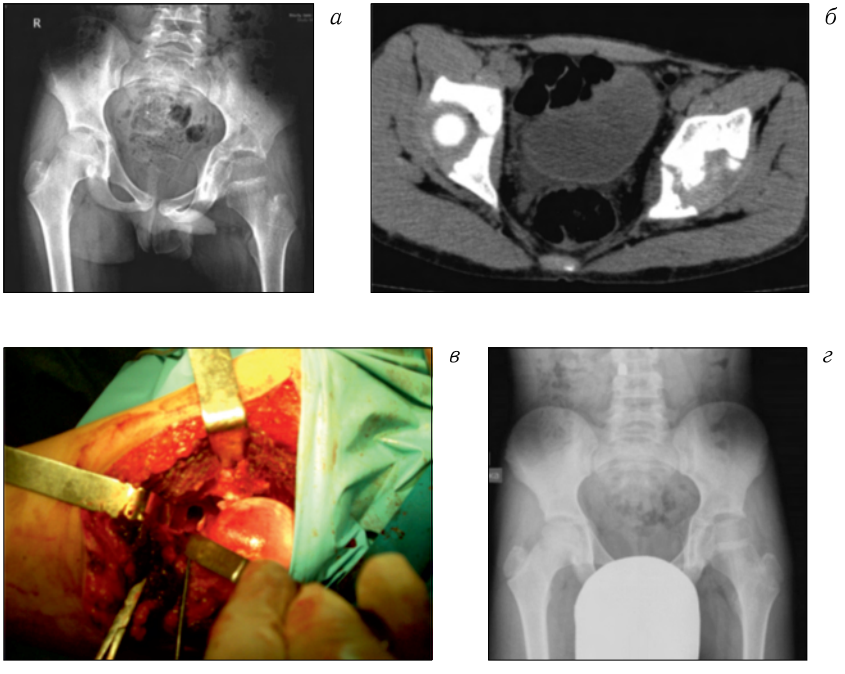


Рис. 14.2. *а*) Рентгенография таза в прямой проекции до операции; *б*) МСКТ предоперационно; *в*) интраоперационно дефект в вертлужной впадине — перфорация опухоли в полость сустава; *г*) рентген-контроль через 12 мес после операции

определяется нидус размерами $8{,}2 \times 6{,}7$ мм, открывающийся в полость сустава, с костным ядром размерами $6{,}8 \times 3{,}0 \times 7{,}8$ мм внутри. Параартикулярные мягкие ткани не изменены. Справа существенных морфологических изменений тазобедренного сустава не выявлено.

Предоперационный диагноз: остеоид-остеома левой седалищной кости. Симптом коксалгии слева. Ротационная контрактура левого ТБС. Интраоперационно при артротомии тазобедренного сустава явления синовиита, в дне вертлужной впадины выявлен дефект до 5 мм в диаметре, зона дефекта совпадает с предоперационным МСКТ-обследованием. Выполнена резекция очага поражения (макроскопически: губчатое вещество красноватого цвета, с элементами склероза стенок), дефект замещен аутокостью. Послеоперационно ведение с разгрузкой оперированной конечности до 8 нед осложнений не было. Пациент заочно наблюдется в течение 7 лет — излечение (рис. 14.2).

### Клинический пример 3

Пациентка 8 лет. С 3-летнего возраста амбулаторное лечение по поводу реактивного синовиита правого ТБС. Отягощенный соматический анамнез: вторичный двухсторонний пиелонефрит, стадия ремиссии. Пузырно-мочеточниковый рефлюкс слева I–II степени, состояние после эндоскопической коррекции справа (ноябрь 2007 г.). С 2002 года состоит на учете у кардиолога: идиопатическая предсердная экстрасистолия, НК-0 и у дерматолога: атопический дерматит, ремиссия. Вирусный гепатит, туберкулез, венерические заболевания, сахарный диабет отрицает. Пищевая и медикаментозная аллергия.

В ортопедическом статусе: походка не изменена. Область правого ТБС обычной формы. Нагрузка по оси бедра, пальпация области правого ТБС незначительно болезненны, умеренно выраженная ротационная контрактура. Периферических сосудистых и неврологических нарушений не определяется, периферические лимфоузлы интактны. Рентгенологически: в наружном отделе шейки правой бедренной кости локализуется дефект овальной формы, размерами $1{,}1 \times 0{,}7$ см, с четким ровным контуром с пояском склероза по периферии. Не исключено наличие включения (секвестра) в дефекте. Соотношения костей, образующих тазобедренные суставы, не нарушены. МСКТ предоперационно: в области верхнего края шейки правой бедренной кости определяется дефект костной ткани овальной формы с неровными, четкими контурами, окруженной зоной остеосклероза размерами $10 \times 7$ мм, плотностью $+118 - +277$ HU. В полости правого ТБС определяется умеренное скопление жидкости, плотностью $+26 - +30$ HU. Контуры головок бедренных костей ровные, четкие, структура не изменена.

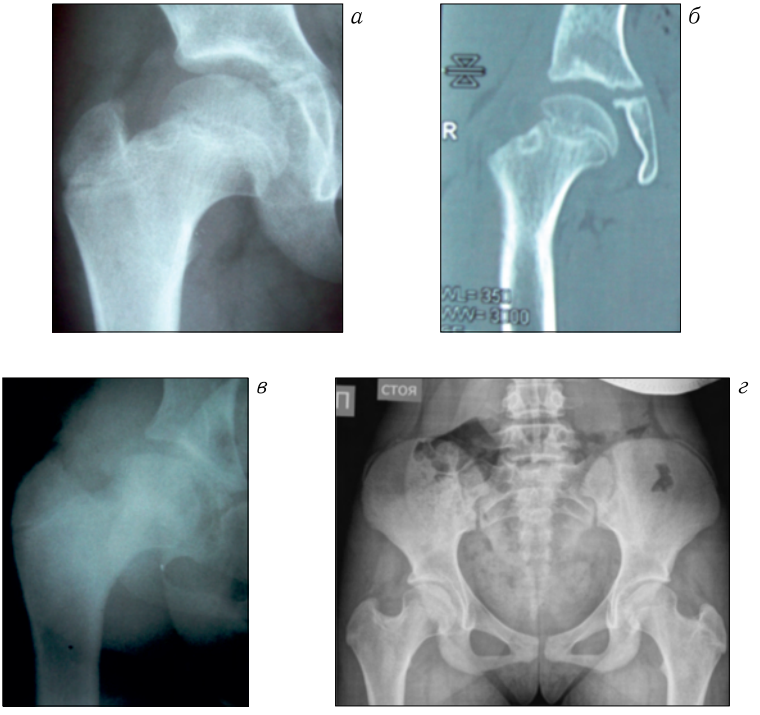


Рис. 14.3. *а*) Рентгенография предоперационно; *б*) МСКТ предоперационно; *в*) интраоперационно дефект без пластики; *г*) рентген-контроль через 6 лет после операции

Предоперационный диагноз: остеоид-остеома шейки правой бедренной кости. Реактивный синовиит, синдром коксалгии справа. Интраоперационно при артротомии ТБС выделилось около 10 мл синовиальной жидкости вязкой консистенции, желтого цвета. Синовиальная капсула с признаками хронического воспаления, темного цвета, «ворсинчатая». Удаление образования (макроскопически: «гнездо» в толще кости со склерозированным ободком и желеподобное содержимым соломенного цвета в центре). Охранительный режим с разгрузкой на шине Беллера. Пациентка наблюдается очно в течение 4 лет — излечение (рис. 14.3).

### Клинический пример 4

Пациентка 7 лет. Пациентка в течение нескольких месяцев безрезультатно лечилась по поводу «ночных» болей в левом ТБС, которые связывали со «спортивной» травмой. Соматически здорова, частые

простудные заболевания. Аллергологический анамнез не отягощен. Профилактические прививки провдены по возрасту, реакций не было.

В ортопедическом статусе: астеничное телосложение, ось позвоночника правильная, пальпация остистых отростков и паравертебральных точек безболезненна. Болевая комбинированная контрактура ТБС. Периферичеких сосудистых и неврологических нарушений не определяется. В период дообследования рекомендовано проведение «аспириновой пробы», которая оказалась положительной. На рентгенограммах

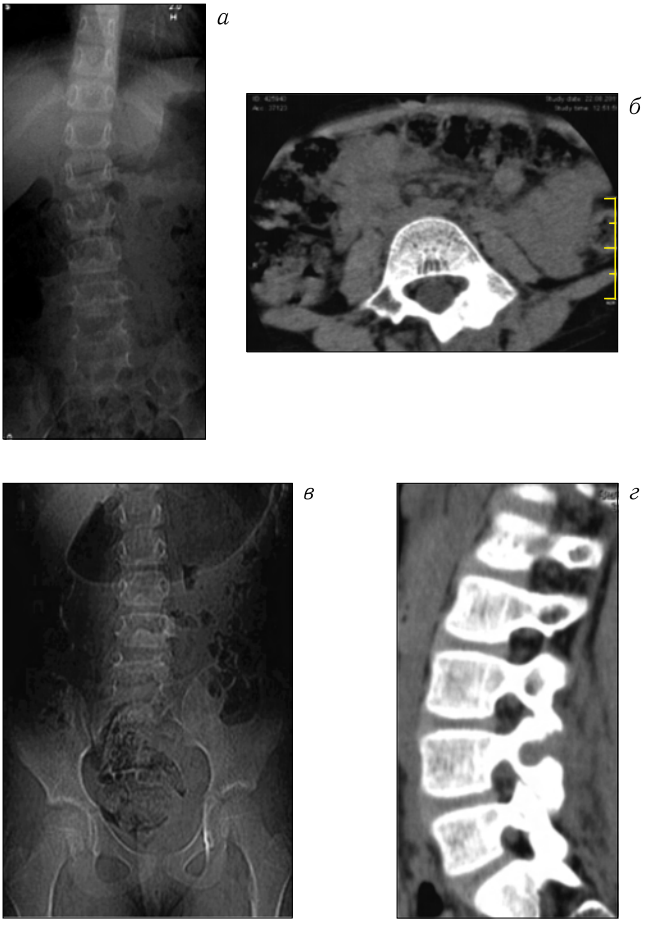


Рис. 14.4. *а*) Рентгенография предоперационно: рефлекторно-болевая сколиотическая дуга (анталгический сколиоз); *б*) МСКТ предоперационно; *в*) восстановление оси позвоночника после операции; *г*) МСКТ-контроль через 10 дней после операции

грудного и поясничного отделов позвоночника видимых костных травматических повреждений позвоночника не выявлено. На рентгенограммах таза в прямой проекции значимых отклонений от нормы также не выявлено. По результатам МСКТ-исследования поясничного отдела позвоночника определяется: высота тел позвонков не снижена, структура однородная, ядра окостенения апофизов не определяются (возрастная норма). Взаимоотношение суставных отростков не нарушено, суставные щели межпозвонковых суставов и межпозвонковые отверстия не сужены. Межпозвонковые диски имеют однородную структуру, локально не изменены. Позвоночный канал не сужен. В левой половине ламинарной части дужки L4 по ее дорзальной поверхности, в кортикальном и губчатом веществе, на фоне локального склерозирования имеется округлое включение (нидус) костной плотности (485 HU) размерами $4{,}7 \times 5{,}4 \times 5{,}7$ мм с четкими контурами.

Предоперационный диагноз: остеоид-остеома дужки L4 позвонка слева. Комбинированная контрактура левого тазобедренного сустава, синдром коксалгии слева. При первичной операции болевой синдром купирован кратковременно, по результатам контрольного МСКТ-обследования артифициальный дефект проходит по границе с патологическим образованием, которое не было резецировано. При реоперации из дорсального доступа выполнено обнажение задних структур, декортикация межсуставной части полудужки L4 слева, выявлено образование (полость, заполненная мягкой тканью красного цвета). Выполнена резекция образования с латеральной стенкой позвоночного канала в зоне полости, обработка электрофрезой, аутокостная пластика зоны дефекта. Послеоперационный охранительный режим с применением спинодержателя. Пациентка очно наблюдается в течение 7 лет — излечение (рис. 14.4).

### Клинический пример 5

Пациентка Х., 15 лет. Обратилась в клинику с жалобами на боли в левой стопе. Из анамнеза известно, что дебют болевого синдрома около года назад. Факт травмы отрицает, по месту жительства предположена травма на уроке физкультуры, рентгенологически патологии костей стопы не выявлено, дальнейшее лечение назначалось с диагнозом «ушиб стопы, остеохондропатия основания 5 плюсневой кости (?)». На фоне назначенного лечения: охранительный режим (включая период гипсовой иммобилизации лонгетой 4 нед.), подбор удобной обуви, физиопроцедуры на стопу (магнит, электрофорез с новокаином), прием нестероидных противовоспалительных (в сочетании с гастропротекторами). Со слов пациентки прием противовоспалительных препаратов

незначительно снижал интенсивность болевого синдрома, в остальном лечение было неэффективно.

При осмотре в клинике пациентка жалуется на боли в левой стопе в покое и при физической нагрузке (по ВАШ 7–8). Ночные боли не зафиксированы. Боль точечной локализации по тыльной поверхности основания 5 плюсневой кости. В ортопедическом статусе: нормостеник. Ходит самостоятельно, хромает на левую ногу. Положение головы правильное. Верхние конечности без пороков развития, функция без дефицита, правша. Перекос надплечий и таза. Ось нижних конечностей правильная, функция крупных суставов без дефицита. При осмотре стоп в нагрузке имеется клинически незначимое снижение продольного свода стоп. Область основания 5 плюсневой кости контурируется симметрично на обеих стопах, кожные покровы не изменены, сосудистый рисунок не усилен, отек мягких тканей не выражен. Пальпация и перкуссия локально болезненны в зоне основания 5 плюсневой кости левой стопы. Периферических сосудистых и неврологических нарушений не выявлено.

Наследственность не отягощена. Вирусный гепатит, туберкулез, сахарный диабет, венерические заболевания отрицает. На учете по поводу костной патологии не состоит. Простудные заболевания 1–2 раза в год. Календарь профилактических прививок соблюден, патологических реакций не отмечено. Аппендэктомия 3 года назад без осложнений.

Выполнено инструментальное дообследование.

При УЗИ мягких тканей латеральной поверхности левой стопы: контуры смежных отделов кубовидной и 5 плюсневой костей несколько неровные, четкие, патологического выпота убедительно не определяется, в режиме ЦДК (цветное допплеровское картирование) васкуляризация не усилена. Сухожилия малоберцовых мышц слева без видимых структурных изменений.

Рентгенография обеих стоп в нагрузке: угол продольного свода стоп $D = 136°$; $S = 137°$; высота продольного свода стоп $D = S = 30$ мм; угол, образованный осями 1-й и 2-й плюсневых костей $D = 8°$; $S = 5°$; угол отклонения 1-го пальца стоп кнаружи $D = S = 14°$; угол отклонения 1-й плюсневой кости кнутри $D = S = 19°$. Достоверно патологических образований в зоне основания 5-й плюсневой кости левой стопы по обзорным рентгенограммам не выявлено (проекционное наслоение смежных костей).

По данным МСКТ стопы: в субхондральном отделе основания 5 плюсневой кости мелкий участок разрежения (краевая деструкция или узурация) диаметром 2,5 мм, окруженный зоной равномерного остеосклероза шириной до 4–5 мм. Контуры сочленяющихся

поверхностей 5-й плюсневой кости и кубовидной кости неотчетливые. Локального скопления жидкости, уплотнения окружающих тканей достоверно не определяется. КТ-картина может соответствовать остеоид-остеоме. Дифференциальный диагноз проводился с рассекающим остеохондритом основания 5 плюсневой кости.

Предоперационный диагноз: объемное образование (остеоид-остеома?) основания 5 плюсневой кости левой стопы; симптом метарзалгии, хроническое течение, неполная ремиссия.

Проведено плановое оперативное лечение в условиях сочетанной анестезии. Под кровоостанавливающим жгутом из продольного доступа выделено основание пятой плюсневой кости. При капсулотомии и ревизии плюсне-кубовидного сустава определялись интактные суставные поверхности. Выполнена ЭОП-маркировка образования в метафизе, его субхондральная резекция с зоной прилежащего склероза. Резецированный материал направлен для гистологического исследования. С учетом риска нестабильности основания проведен биодеградируемый остеосинтез винтом. Остеосинтез стабилен. Рана ушита послойно наглухо интрадермально нитью ПГА 3,0. Асептическая спиртовая повязка. Гипсовая иммобилизация.

Гистологическая картина: в микрофрагментах костной ткани определяются слабо обызвествленные балочки и бесформенные остеоидные глыбки, хаотично расположенные среди клеток пролиферирующего эндоста с остеобластами. Проводилась дифференциальная диагностика с остеобластомой.

В послеоперационном периоде пациентка уже в первые сутки отмечала изменение характера боли и снижение интенсивности болевого синдрома (ВАШ 3–4), который практически полностью купировался к моменту выписки (ВАШ 1).

Пациентка была выписана на 5 сут после операции. Течение послеоперационного периода на амбулаторном этапе без осложнений: гипсовая иммобилизация до 3 нед с момента операции, охранительный режим (ограничение нагрузки на оперированную стопу) до 3 мес с момента операции; в приеме анальгетиков или противовоспалительных препаратов не нуждалась. На контрольном осмотре через 6 мес после операции: болевой синдром купирован полностью, биомеханика походки не нарушена, местно зона хирургического вмешательства без изменений (рис. 14.5).

Пациенты, оперированные в Новосибирском НИИТО по поводу доброкачественных опухолей и пограничных с опухолями процессов, наблюдаются совместно с остеоонкологом. Для максимального сохранения макроскопической картины целесообразна резекция патологического очага осциллирующей пилой и остеотомами с обязательной

Рис. 14.5. Результаты лучевых методов диагностики пациентки Х.: *а*), *б*) рентгенограммы перед операцией (не выявлена костная патология); *в*), *г*) МСКТ перед операцией (дефект и зона склероза в основании 5 плюсневой кости)

гистологической верификацией диагноза. При микроскопии: среди реактивно склерозированных балок грубопетлистого и компактного строения определялось «гнездо» из слабо обызвествленных мелких примитивных и остеоидных балочек, беспорядочно расположенных в клеточной остеогенной ткани, обильно заполняющей пространства между балками; клетки находятся в разных стадиях дифференцировки. Ни у одного из пациентов не было расхождения предоперационного и патологоанатомического диагнозов. Все пациенты наблюдаются специалистами в динамике, для иногородних пациентов активно используется система заочных консультаций с привлечением интернет-ресурсов. Ни в одном случае ОО не локализовалась вблизи зоны роста и не извращала темпы роста пораженной кости.

## Заключение

Своевременное распознание костных опухолей — актуальная проблема в клинике костной патологии. На ранних стадиях остеоид-остеома может не иметь «четкой» клинической картины, что затрудняет диагностику и обусловливает неадекватное лечение. Диагностическую ценность на амбулаторном этапе представляет упорный болевой синдром (более чем у 2/3 пациентов с ОО), усиливающийся в ночное время и положительно отвечающий на прием малых доз аспирина. При неинформативности рентгенологического обследования у пациентов со стойким болевом синдромом показано расширение объема обследования (МСКТ, МРТ, сцинтиграфия). Несмотря на развитие малоинвазивных методик, радикальная резекция при точном определении патологического очага позволяет достичь излечения. Пациенты, оперированные по поводу доброкачественных опухолей и опухолеподобных заболеваний, должны наблюдаться ортопедом и остеоонкологом в динамике.

## Список литературы

1. *Reiser M.*, *Baur-Melnyk A.*, *Glaser C.* Direct Diagnosis in Radiology: Musculoskeletal Imaging // Thieme Stuttgart New-York, 2008. P. 384.
2. *Егоренков В.В.* Пограничные и доброкачественные опухоли костей // Практическая онкология. 2010. Т. 1. С. 37–44.
3. *Fletcher C.D.M.*, *Unni K.K.*, *Mertens F.* World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. Lyon: IARC Press, 2002.
4. *Spouge A.* Osteoid osteoma. Clin. Imaging. 2001. V. 24. P. 19–27.
5. *Вишневский А.А.*, *Тиходеев С.А.*, *Микелтадзе В.З.* К вопросу о диагностике и лечении остеоид-остеом позвоночника // Хирургия позвоночника. 2010. Т. 4. С. 65–67.
6. *Bahloul K.*, *Xhumari A.*, *Feydy A.*, *Kalamarides M.*, *Redondo A.*, *Rey A.* Thoracic spine osteoid osteoma // Eur. J. Radiol. Extra. 2003. V. 46. P. 74–77.
7. *Mazlout O.*, *Saudan M.*, *Ladeb M.F.*, *Garcia J.F.*, *Bianchi S.* Osteoid osteoma of the talar neck: a diagnostic challenge. Eur. J. Radiol. Extra. 2004. V. 49, No 2. P. 67–70.
8. *Мельников Р.А.*, *Сухарев В.Ф.* Комплексная диагностика опухолей костей. Л: Медицина, 1974.
9. *Поздеев А.П.*, *Чигвария Н.Г.* Диагностика и лечение остеоид-остеомы у детей // Детская хирургия. 2014. Т. 3. С. 14–18.
10. *Волков М.В.* Костная патология детского возраста. М.: Медицина, 1968.

11. *Greco F.*, *Tamburrelli F.*, *Ciabattoni G.* Prostaglandins in osteoid osteoma // Int. Orthop. 1991. V. 15, No 1. P. 35–37.

12. *Снетков А.И.*, *Франтов А.Р.*, *Батраков С.Ю.*, *Котляров Р.С.*, *Кесян О.Г.* Применение навигационных технологий в лечении остеоидной остеомы и остеобластомы позвоночника у детей // Гений ортопедии. 2014. Т. 1. С. 46–50.

13. *Кочергина Н.В.* Лучевая диагностика опухолей и опухолеподобных поражений костей и мягких тканей. М.: ООО «Фирма СТРОМ», 2005. 152 с.

14. *Карпенко А.К.*, *Магонов Е.П.* Роль МРТ в диагностике остеоид-остеомы // Лучевая диагностика. 2014. Т. 3. С. 50–52.

# 15. ОПЫТ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ АКТИВНЫХ КИСТ ПЯТОЧНОЙ КОСТИ НА ФОНЕ СФОРМИРОВАННОГО СКЕЛЕТА С ПРИМЕНЕНИЕМ МАТЕРИАЛА «КОСТНАЯ АЛЛОСОЛОМКА»

*И.Л. Пахомов, М.Л. Садовой, В.М. Прохоренко, И.А. Кирилова*

Травматология и ортопедия России. 2008. № 1 (47). С. 20–26

Кисты пяточной кости являются распространенной патологией, однако данные об их природе и тактике лечения противоречивы. Неактивные кисты пяточной кости склонны закрываться самостоятельно пи окончании формирования скелета, проблемой является лечение активных кист пяточных костей. Прогрессия кисты может быть подтверждена на МСКТ. Пункционный метод лечения не приводит к успеху, и пациентам показана операция экскохлеации кисты, заполнение возникшей полости костной аутокрошкой. Гистологическая картина активных кист свидетельствует об отсутствии признаков опухолевого поражения пяточной кости в пользу наличия патологических переломов стенки кисты пяточной кости. Радикальное оперативное вмешательство с аллопластикой позволяют восстановить анатомическое строение и опорную функцию пяточной кости, инициировать ремоделирование кости за счет стимулирования остеогенеза, купировать болевой синдром и улучшить качество жизни пациентов.

# 15. SURGICAL TREATMENT EXPERIENCE ACTIVE CALCANE CYSTALS IN THE BACKGROUND FORMED SKELETON USING THE MATERIAL «BONE ALLOSOLOMKA»

*I.A. Pakhomov, M.A. Sadovoi, V.M. Prokhorenko, I.A. Kirilova*

Calcaneal bone cysts are widespread, however, etiology, pathogenesis and choice of treatment are still controversial. From one hand, inactive calcaneal cysts tend to close while finishing of skeletal maturity, on the other hand, active cysts lead to serious patient's disability. We used to use MSCT (Multispiral computed tomography) to support cyst progression. Steroid cyst injections are low effective, so excohleation of the active cyst and fill of the cyst cave with «allogenic bone

chips» was much more preferable. Radical operation with osteoplasty resulted in anatomic restoration of the calcaneal bone structure and function, enhanced clinical results among patients, who suffered from active calcaneal cyst.

## Введение

Кисты пяточной кости описаны в 1878 г. Рудольфом Вирховом [30]. Данная нозологическая форма имеет синонимы: синус пяточной кости, внутрикостная липома пяточной кости, местная фиброзная остеодистрофия, остеобластокластома пяточной кости [2, 4, 5]. Для клинической практики активность кисты имеет большое значение. Для неактивных кист характерно бессимптомное течение, они являются случайной находкой во время рентгенологического обследования стопы по другим поводам; склонны к самопроизвольному закрытию после окончательного формирования скелета человека [2, 22]. Иного подхода требуют активные пяточные кисты, сопровождающиеся жалобами пациентов на выраженный болевой синдром в пяточной области, увеличение объема пяточной области, хромоту, неудобство при ношении обуви.

Некоторые исследователи объясняют описанную клиническую картину болей возникновением патологического перелома стенки пяточной кости в связи с увеличением кисты в объеме [9, 31].

Предложены 2 метода лечения пяточных кист:

1. Пункционный — характеризуется введением препаратов различных групп (антиферментных, гормональных, склерозирующих) в полость кисты [14, 27, 28]. В связи с риском осложнений и частыми рецидивами применение его ограничено.

2. Оперативный — экскохлеация кисты и пломбировка полости пяточной кости (аутокостью, аллокостью, различными пластическими материалами) [17–19, 21].

Возникает вопрос — какова должна быть тактика лечения пяточных кист и какой материал оптимален для заполнения полостей кисты пяточной кости, возникающих при их оперативном лечении?

**Цель** исследования — анализ результатов лечения активных кист пяточных костей, выявление достоинств пластического материала «костная аллосоломка» при заполнении полости кисты пяточной кости.

## Материал и методы

Проанализированы результаты лечения 16 пациентов с активными кистами пяточных костей (6 мужчин, 10 женщин). Средний возраст $26{,}6 \pm 2{,}6$ лет. Средний срок появления симптомов $3 \pm 2{,}2$ года. Все

пациенты предъявляли жалобы на боль в заднем отделе стопы, отек в области пяточной кости.

Им были сделаны рентгенограммы стоп в 2 проекциях, однако истинные признаки прогрессирования кисты пяточной кости удалось достоверно визуализировать лишь на СКТ, а именно: у 16 (100 %) пациентов истончение и вздутие стенок кист, у 6 (23,1 %) из которых — патологический перелом пяточной кости. Именно визуализация признаков прогрессии и активности кист позволила сформировать тактику лечения и показания к операции экскохлеации кисты, заполнению полости пяточной кости материалом «костная аллосоломка» в виде крошки.

На начальных этапах исследования двум пациентам пунктировали активные кисты пяточной кости, но в связи с сохранением рентгенологической симптоматики кисты, формированием внутрикостной гематомы и опасностью ее инфицирования от данного метода отказались. Этим пациентам впоследствии также была проведена экскохлеация полости кисты пяточной кости, ее пломбировка материалом «костная аллосоломка» в виде крошки.

Всем пациентам проведено следующее оперативное лечение: ревизия полости кисты, ее экскохлеация, пломбировка материалом «костная аллосоломка» (операционный материал, полученный во время экскохлеации, направлялся на гистологическое исследование).

После оперативного вмешательства пациентам проводилось следующее восстановительное лечение: дозированная нагрузка на оперированную ногу в течение 3–4 недель; реабилитационная программа, направленная на увеличение объема движений в суставах стопы, ЛФК, физиолечение, массаж.

## Результаты и обсуждение

Результаты лечения оценивались по клинико-рентгенологической анкете AOFAS до- и через 12 месяцев после операции.

В исследованной группе пациентов при оценке результатов лечения суммарная разница в набранных баллах составила 30,7 и статистически достоверна ($p < 0{,}05$).

Получено 15 (93,5 %) хороших результатов (85 баллов по AOFAS) после операции экскохлеации полости кисты пяточной кости, ее пломбировки материалом «костная аллосоломка»: купирован болевой синдром, прекратились отеки, рентенологически определялась перестройка аллотрансплантатов.

Получен 1 (6,5 %) удовлетворительный результат (65 баллов по AOFAS), который связан с ирритацией ветвей nervussuralis.

Гистологический анализ выстилки стенок активных кист во всех случаях показал отсутствие злокачественного перерождения компонентов выстилки стенок кист. Но везде имелись признаки, характерные либо для хронического воспаления в стенках кисты, либо для ее патологического перелома.

Клинический пример.

Пациентка П., 22 г., обратилась в Новосибирский НИИТО с жалобами на спонтанно возникшие, усиливающиеся при ходьбе боли, отек в области правой пятки, нарастающую хромоту, деформацию стопы справа.

Из анамнеза известно, что киста пяточной кости впервые диагностирована у пациентки в 14-летнем возрасте при рентгенологическом обследовании по поводу травмы стопы (рис. 15.1).

Рис. 15.1. Боковая рентгенограмма пациентки П., в 14 лет, — неактивная киста пяточной кости справа

При обследовании выявлены рентгенологические признаки «активизации» кисты: увеличение сагиттального размера кисты на 5 мм, исчезновение костных балок в проекции «треугольной тени» (рис. 15.2).

Для уточнения диагноза проведена КТ пяточной кости, на которой выявлена причина возникших болей и дополнительные признаки «активизации» кисты (рис. 15.3, 15.4).

Пациентке произведена экскохлеация кисты, обработка полости кисты 70% спиртом, пластика полости кисты костной «аллосоломкой» (рис. 15.5).

Послеоперационный период протекал без осложнений, оперированную конечность иммобилизировали ортезом, на 3 недели исключали

*а*

*б*

Рис. 15.2. Рентгенограммы пациентки П., 22 г., — сагиттальный размер кисты пяточной кости увеличился на 5 мм, исчезли костные балки в просвете кисты: *а*) боковая проекция, *б*) аксиальная

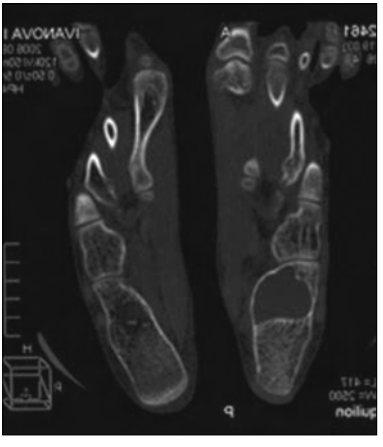

Рис. 15.3. Плантарная КТ пациентки П., 22 г., — выраженное вздутие стенки кисты правой стопы

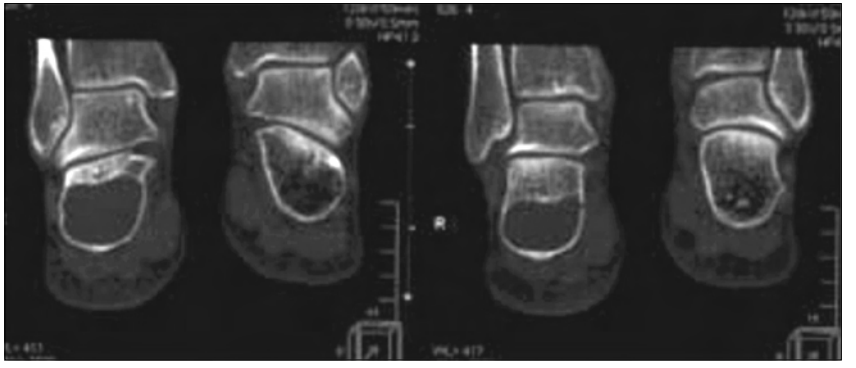

Рис. 15.4. Коронарная КТ пациентки П., 22 г., — выраженное вздутие стенки кисты справа, патологический перелом наружной и внутренней стенок кисты

Рис. 15.5. Интраоперационная рентгенография той же пациентки: полость кисты заполнена костной «аллосоломкой»

статическую нагрузку на оперированную ногу. С 3–4 дня после операции проводили ЛФК и массаж. Осмотр в динамике 1 раз в 3 месяца.

Проведен гистологический анализ содержимого кисты, в котором определяются хаотично расположенные фрагменты костных балок разной степени зрелости с признаками резорбции и слабо выраженными признаками перестройки и репарации на фоне микропереломов. Между костными балками присутствует разрастание клеточной эндостальной рыхловолокнистой и хрящевой тканей, фрагменты фиброзной капсулы с диффузно-очаговой воспалительной инфильтрацией лимфоидно-плазмоцитарными клетками с примесью лейкоцитов; отложения гемосидерина, щелевидные пустоты. Морфологический диагноз: микропереломы пяточной кости с признаками организации и формирования мозоли, хроническое воспаление (рис. 15.6).

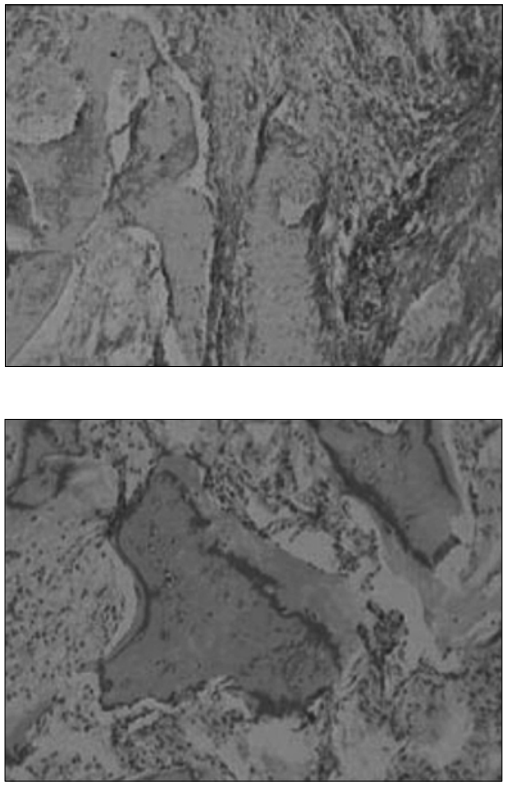


Рис. 15.6. Микрофото содержимого кисты пяточной кости: *а*) окраска по Ван Гизону; *б*) гематоксилином-эозином. Ув. × 100

Через 1,5 г. после операции оценены результаты лечения: пациентка жалоб не предъявляет; клинически признаков патологии пяточной кости нет; объем движений в суставах стопы полный, носит стандартную обувь, занимается рекреационным спортом; рентгенологически визуализируется зона костной пластики, вне ее структура пяточной кости сохранена, продолжается процесс ремоделирования аллотрансплантатов (рис. 15.7).

Таким образом, мы видим, что операция экскохлеации кисты пяточной кости с последующим заполнением дефекта костнопластическим материалом «костная аллосоломка» в виде крошки эффективна. При данной методике операции восстанавливается анатомическое строение пяточной кости, ее опорная функция, инициируется ремоделирование кости за счет использования аллотрансплантатов, купируется болевой синдром; улучшается качество жизни пациентов.

Рис. 15.7. Рентгенограммы пациентки П., 22 г., спустя 1,5 г. после оперативного лечения — продолжается ремоделирование «аллотрансплантатов»: *а*) боковая проекция, *б*) аксиальная

Существует много теорий, объясняющих появление и прогрессирование кист [5, 11, 17, 23]:

- кистозная дегенерация опухоли кости;
- организация воспалительного процесса слабой степени;
- местное нарушение роста кости на почве травмы и кистозного превращения гематомы [1].

В настоящее время наиболее популярны блокады венозного оттока крови из кости и, следовательно, повышение внутрикостного давления. Оно активизирует остеокласты, которые резорбируют костную ткань предположительно путем активации цитокинов, выделяемых эндотелиальными клетками стенок кисты [9]. Обычно диагноз «киста пяточной кости» устанавливается во время рентгенологического обследования по другому поводу, клинические симптомы кист появляются лишь при патологическом переломе пораженной кости. В клинической практике принципиальным является вопрос о степени активности кисты, что в современной литературе связывают с возрастом пациента. Существует мнение, что кисты, встречающиеся у пациентов в возрасте до десяти лет, максимально активны, а у пациентов старше десяти лет их степень

активности постепенно снижается вплоть до закрытия, которое обычно совпадает с завершением формирования скелета.

Костные кисты, не являясь опухолями, создают дефекты костей и опасны патологическими переломами пораженных костей при прогрессировании.

Для лечения кист предложены различные стратегические подходы и методы лечения. Современная стратегия трактуется как необходимость создания костной ткани на месте кисты для противостояния статическим и динамическим нагрузкам, а также для предотвращения патологического перелома кости, несущей вес, в результате роста кисты и истончения ее стенки.

Содержимое кист — серозная или кровянистая жидкость с элементами фиброзной капсулы и фрагментов кости. Микроскопически выстилка кист представлена фиброзной тканью, нередко богатой тонкостенными широкими сосудами и реактивными костными баночками примитивного строения. В ней также могут присутствовать многоядерные гигантские клетки остеокластического типа, частично по краям кистозных полостей, частично по краям костных баночек. Нередко в фиброзной оболочке присутствуют щелевидные пустоты-кисты, гистиоциты и хаотично расположенные воспалительные клетки. Обобщая собственный клинический опыт, авторы склонны предполагать травматический генез активных кист с нарушением кровообращения и, как следствие, с формированием гематом и признаками хронического воспаления.

Основным методом лечения считается открытый кюретаж полости и заполнение дефекта пластическим материалом.

Некоторые авторы применяли операцию субтотальной резекции кист без замещения костного дефекта костнопластическим материалом, но отмечено 9 % случаев рецидивов кист [12]. Другие перфорировали кость в области кисты, осуществляли эвакуацию ее содержимого, промывали физиологическим раствором, дефект кости заполняли ауто- и аллокостными трансплантатами, с частотой рецидивирования от 4 % до 45 % [21, 29]. Авторы установили, что большое количество неудач связано с неполным и неплотным выполнением полости кисты пластическим материалом после ее выскабливания. Сообщалось о получении 90 % случаев положительных результатов при кюретаже костной кисты и пластике стерильным гипсом [26].

Инъекционный метод лечения с введением в полость кисты стероидных, антиферментных препаратов был популярен в 70–80-х годах XX века. Однако отмечено, что данный метод наиболее благоприятен в отношении кист плечевой и бедренной костей, и наименее эффективен в отношении пяточной [25]. Сообщения о стероидных инъекциях

в кисты пяточной кости пока немногочисленны и противоречивы. Большинство исследователей отказываются от инъекционного метода при лечении подобных кист [15]. В то время как кюретаж и костная пластика солитарных кист пяточной кости, по отзывам авторов, неизменно успешны [22].

Интерес клиницистов и исследователей относится к веществам, использующимся для заполнения остаточной полости кисты пяточной кости [31]. По происхождению все материалы для костной пластики можно разделить на биологические, искусственные (синтетические) и композиционные (композиты). Биологические материалы — это полученные из тканей человека (ауто- и алло-), животных (ксено-) и биологически активные материалы белковой и небелковой природы, обладающие свойствами факторов роста [3, 13, 20].

Искусственные материалы создаются на основе $\beta$-трикальций фосфата, гидроксиапатита, различных типов керамики, сульфата кальция и др. [12–17, 20].

Несмотря на то, что компактно-спонгиозная аутокость является оптимальным пластическим материалом, у данного метода есть существенные недостатки — необходимость дополнительной операционной травмы и наличие проблемы болезненного донорского места при взятии аутотрансплантата из области гребня крыла подвздошной кости. Трудно произвести свободную костную аутопластику у детей (в связи с выраженностью хрящевой составляющей кости и возможностью повреждения зон роста), а также у пожилых людей из-за снижения регенераторной способности тканей и остеопороза [3, 13, 20].

В 60-х годах прошлого столетия отмечалась увлеченность аллопластикой, затем начали использовать керамические материалы, полиметилакрилаты, стекла, металлы. В последние десятилетия предпочитают биологически инертные материалы (т.е. нетоксичные и устойчивые в агрессивной среде организма), а именно: коррозийно-стойкие металлы (титан и его сплавы), керамику (корундовая, диоксидциркониевая керамика), пластмассы (полиметилакрилат, высокомолекулярный полиэтилен) [13, 20]. Однако из-за возникающих реакций отторжения, биологически инертные материалы в хирургии кист пяточной кости применяются ограниченно [2, 31]. Для реконструктивной хирургии активных кист пяточной кости оптимальным оказался аллогенный костный материал. Наиболее предпочтительна аллогенная костная соломка, так как:

- содержит органический и минеральный компоненты в идеальном соотношении, свойственном человеческой популяции;
- обладает достаточным запасом прочности, свойственным тканям скелета, испытывающим большие биомеханические нагрузки;

- измельченная форма оставляет промежутки для врастания сосудов и аппозиционного роста костной ткани со стороны материнского ложа;
- сохраняет формообразующую (функциональную) роль в течение всего периода аппозиционного роста губчатой кости, поскольку скорость ее ремоделирования значительно превышает скорость перестройки компактной костной соломки;
- стимулирует процесс регенерации костной ткани за счет остеокондуктивных и остеоиндуктивных свойств аллокости.

Ее достоинством является доступность и простота обработки в клиническом использовании.

Таким образом, использование костной аллосоломки в качестве пластического материала в хирургии активных кист пяточной кости благоприятно, так как позволяет оптимальным путем восстановить ее структуру.

## Заключение

Обобщая 5-летний опыт оперативного лечения кист пяточной кости, мы пришли к следующим выводам:

- показанием для оперативного лечения кист пяточной кости является прогрессирование клинических и рентгенологических признаков патологического процесса;
- методом выбора для диагностики признаков активности пяточных кист является СКТ;
- гистологическая картина активных кист свидетельствует о наличии микропереломов пяточной кости с признаками организации и формирования мозоли с проявлениями хронического воспаления;
- радикальное оперативное вмешательство с последующей аллопластикой позволяют восстановить анатомическое строение и опорную функцию пяточной кости, инициировать ремоделирование кости за счет стимуляции остеогенеза, купировать болевой синдром и улучшить качество жизни пациентов.

## Список литературы

1. *Виноградова Т.П.* Опухоли костей. М.: Медицина, 1973. 336 с.
2. *Волков М.В.* Костная патология детского возраста. Опухоли и диспластические заболевания костей. М.: Медицина, 1968. 495 с.
3. *Кирилова И.А.*, *Фомичев Н.Г.*, *Подорожная В.Т.*, *Трубников В.И.* Новые виды материалов для костной пластики в свете современных

представлений о костных трансплантатах // Хирургия позвоночника. 2007. № 2. С. 66–70.

4. *Новаченко М.П.* Оперативное лечение так называемой местной фиброзной остеодистрофии у детей // Тезисы докладов научной сессии, посвященной 100-летию со дня рождения Г.И. Турнера. Л., 1959. С. 335–344.
5. *Черкес-Заде Д.И., Каменев Ю.Ф.* Хирургия стопы. М.: Медицина, 1995. 288 с.
6. *Altermatt S., Schwobel M., Pochon J.P.* Operative treatment of solitary bone cysts with tricalcium phosphate ceramic. At 1 to 7 year follow-up // Eur. J. Pediatr. Surg. 1992. V. 5. P. 338–354.
7. *Cohen J.* Etiology of simple bone cyst // J. Bone Joint Surg. 1970. V. 52-A. P. 1493–1497.
8. *Cohen J.* Simple bone cysts. Studies of cyst fluid in six cases with a theory of pathogenesis // J. Bone Joint Surg. 1960. V. 42-A. P. 609–615.
9. *Conway W.F., Hayes C.W.* Miscellaneous lesions of bone // Radiol. Clin. North. Am. V. 31. P. 339–358.
10. *Ill Neer C.S. et al.* Current concepts on the treatment of solitary unicameral bone cyst // Clin. Orthop. 1973. No 97. P. 40–51.
11. *Dahlin D.C.* Bone Tumors. 3rd ed. Springfield: Charles C. Thomas, 1978. 371 p.
12. *Jahss M. et al.* Disorders of the foot and ankle. Philadelphia: W.D. Saunders Company, 1992. 2957 p.
13. *Enneking W.F.* Simple bone cysts // Clinical Musculoskeletal Pathology. 3rd ed. Gainesville, 1990. P. 281–287.
14. *Fahey J.J., O'Bnen E.T.* Subtotal resection and grafting in selected cases of solitary unicameral bone cyst // J. Bone Joint Surg. 1973. V. 55-A. P. 59–68.
15. *Finkemeier C.G.* Костные трансплантаты и трансплантаты-заменители // J. Bone Joint Surgery. 2002. V. 84-A, No 3. P. 454–464.
16. *Frankel S.L., Chioros P.D., Sidlov C.J.* Steroid injection of a unicameral bone cyst of the calcaneus: literature review and two case reports // J. Foot Surg. 1988. V. 27. P. 60–65.
17. *Goel A.R., Kriger J.* Unicameral bone cysts: treatment with methylprednisone acetate injections //J. Foot Ankle Surg. 1993. V. 32. P. 242–244.
18. *Jaffe H., Lichtenstein L.* Solitary unicameral bone cyst // Arch. Surg. 1942. V. 64. P. 1.
19. *Matthew G.W., Hubble J.W.* Bone grafts // Surg. Techn. Intern. X. 2002. V. 10, No 9. P. 261–265.
20. *McKay O.W., Nason S.S.* Treatment of unicameral bone cysts by subtotal resection without grafts //J. Bone Joint Surg. 1977. V. 59-A. P. 515–519.

21. *Moreau G.*, *Letts M.* Unicameral bone cyst of the calcaneus in children // J. Pediatr. Orthop. V. 14. P. 101–104.

22. *Norman A.*, *Schiffman M.* Simple bone cysts: factors of age dependency // Radiology. 1977. V. 124. P. 779–782.

23. *Oppenheim W.L.*, *Galleno H.* Operative treatment versus steroid injection in the management of unicameral bone cysts // J. Pediatr. Orthop. 1984. V. 4. P. 1–7.

24. *Jnoue O. et al.* Packing with high-porosity hydroxyapatite cubes alone for the treatment of simple bone cyst // Clin. Othop. 1993. No 293. P. 287–292.

25. *Peltier L.F.*, *Jones R.H.* Treatment of unicameral bone cysts by curettage and packing with plaster-of-Paris pellets // J. Bone Joint Surg. 1978. V. 60-A. P. 820–822.

26. *Shindell R. et al.* Prostaglandin levels in unicameral bone cysts treated by intralesional steroid injection // J. Pediatr. Orthop. 1989. V. 9. P. 516–519.

27. *Scaglietti O.*, *Marchetti P.G.*, *Bartolozzi P.* The effects of methylprednisolone acetate in the treatment of bone cysts. Results of three years follow-up // J. Bone Joint Surg. 1979. V. 61-B. P. 200–204.

28. *Komiya S. et al.* Simple bone cyst. Treatment by trepanation and studies on bone resorptive factors in cyst fluid with a theory of its pathogenesis // Clin. Orthop. 1993. No 287. P. 204–211.

29. *Spence K.F. et al.* Solitary unicameral bone cyst: treatment with freeze-dried crushed cortical-bone allograft. A review of one hundred and forty-four cases // J. Bone Joint Surg. 1976. V. 58-A. P. 636–641.

30. *Virchow R.* On the formation of bony cysts // Überdie Bildung von Knochencysten. Berlin, 1876. S. 369–381.

31. *Wilkins R.M.* Unicameral bone cysts // J. Am. Acad. Orthop. Surg. 2000. V. 8. P. 217–224.

# Content

Авторский коллектив . . . . . 5
Introduction . . . . . 7

**1. The Use of Auto- and Allografts to Replace Bone Defects in the Resections of Bone Tumors (A Review of the Literature)**
*E.A. Anastasieva, M.A. Sadovoi, A.A. Voropaeva, I.A. Kirilova* . . . . . 14

**2. Comparative Characteristics of Materials for Bone Grafting: Composition and Properties**
*I.A. Kirilova, V.T. Podorozhnaya* . . . . . 27

**3. United Donation Femoral Heads in the Novosibirsk Rito**
*I.A. Kirilova, V.T. Podorozhnaya, V.V. Pavlov, I.Y. Bedoreva* . . . . . 55

**4. The Study of the Morphology of Femoral Head Midline Section Specimens**
*I.A. Kirilova, Yu.P. Sharkeev, V.T. Podorognaya, K.S. Popova, P.V. Uvarkin, N.G. Fomichev* . . . . . 65

**5. The Study of Structural and Functional Characteristics of Femoral Head Midline Section Specimens**
*V.T. Podorognaya, I.A. Kirilova, Yu.P. Sharkeev, K.S. Popova, P.V. Uvarkin, N.G. Fomichev* . . . . . 72

**6. Properties of the Demineralized Bone Matrix for Bioenginery of Tissue**
*I.A. Kirilova, V.T. Podorognaya, Yu.P. Sharkeev, S.V. Nikolaev, A.V. Penenko, P.V. Uvarkin, A.S. Ratushnyak, V.V. Chebodaeva, E.A. Anastasieva, S.K. Golushko, A.V. Korel* . . . . . 78

**7. Numerical Algorithms for Diffusion Coefficient Identification in Problems of Tissue Engineering**
*A.V. Penenko, S.V. Nikolaev, S.K. Golushko, A.V. Romashenko, I.A. Kirilova* . . . . . 97

**8. Cultivation and Characteristics of Mesenchymal Stem Cells from the Bone Marrow of the Patients with Orthopedic Pathology**
*N.M. Astakhova, A.V. Korel, K.E. Orishchenko, Y.R. Efremov, G.A. Kudrov, S.V. Nikolaev, I.A. Kirilova* . . . . . 121

**9. The Study of the Basic Characteristics of the Osteogenic and Chondrogenic Cells, Important for Tissue Engineering Implants**
*N.M. Astakhova, A.V. Korel, E.I. Shchelkunova, K.E. Orishchenko, S.V. Nikolaev, U.S. Zubairova, I.A. Kirilova* . . . . . 135

**10. Seeding of the Demineralized Bone Matrix with Chondrogenic Cells**
*E.I. Shchelkunova, A.A. Voropaeva, A.V. Korel, D.A. Mayer, V.T. Podorognaya, I.A. Kirilova* . . . . . 150

**11. *In vitro* Evaluation of the Allogeneic Bone Matrix Effect on the Adipose Mesenchymal Stromal Cells Characteristics in Combined Tissue Engineering**
*L.A. Cherdantseva, E.A. Anastasieva, D.Ya. Aleinik, M.N. Egorikhina, I.A. Kirilova* . . . . . 164

**12. Allogenic Bone Materials: Structure, Properties, Application**
*V.T. Podorozhnaya, I.A. Kirilova, Yu.P. Sharkeev, E.V. Legostaeva* . . 186

**13. Two-Stage Repeated Hip Arthroplasty with Extensive Bone Defect of the Acetabulum**
*V.V. Pavlov, I.V. Kirilova, M.V. Efimenko, V.A. Bazlov, T.Z. Mamuladze* . . . . . 198

**14. Surgical Treatment of Osteoid-Osteomas in Children and Adolescents (Clinical Observation)**
*E.V. Gubina, D.V. Ryzhikov, V.T. Podorozhnaya, I.A. Kirilova, A.V. Andreev, M.A. Sadovoi, N.G. Fomichev, A.V. Bondarenko, L.M. Afanasiev, A.S. Revkovic, E.V. Senchenko* . . . . . 213

**15. Surgical Treatment Experience Active Calcane Cystals in the Background Formed Skeleton Using the Material «Bone Allosolomka»**
*I.A. Pakhomov, M.A. Sadovoi, V.M. Prokhorenko, I.A. Kirilova* . . . . . 229

Научное издание

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА КАК СИГНАЛЫ ДЛЯ УПРАВЛЕНИЯ ПРОЛИФЕРАЦИЕЙ, ДИФФЕРЕНЦИРОВКОЙ, ПОДВИЖНОСТЬЮ И ТАКСИСОМ КЛЕТОК**

Редактор *В.Р. Игнатова*
Оригинал-макет: *И.Г. Андреева*
Оформление переплета: *А.В. Андросов*

Подписано в печать 18.11.2021. Формат 60×90/16. Бумага офсетная.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 15,5. Уч.-изд. л. 17,05. Тираж 300 экз.
Заказ №

Издательская фирма «Физико-математическая литература»
МАИК «Наука/Интерпериодика»
117342, г. Москва, ул. Бутлерова, д. 17Б
E-mail: porsova@fml.ru, sale@fml.ru
Сайт: http://www.fml.ru
Интернет-магазин: http://www.fmllib.ru

Отпечатано с электронных носителей издательства
в ООО «Типография «Перфектум»
428000, г. Чебоксары, ул. Карла Маркса, 52