

На правах рукописи



Анастасиева
Евгения Андреевна

**ЗАМЕЩЕНИЕ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ
ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИЕЙ
НА ОСНОВЕ ДЕПРОТЕИНИЗИРОВАННОЙ ГУБЧАТОЙ КОСТИ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

3.1.8 – травматология и ортопедия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск - 2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Кирилова Ирина Анатольевна, доктор медицинских наук, доцент

Официальные оппоненты:

Ахтямов Ильдар Фуатович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой травматологии, ортопедии и хирургии экстремальных состояний ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Брижань Леонид Карлович – доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Главный военный клинический госпиталь им. Ак. Н.Н. Бурденко» Министерства обороны Российской Федерации, заместитель начальника по научно-исследовательской работе.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Защита состоится «__» _____ 2023 года в __ часов на заседании диссертационного совета 21.1.047.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации, по адресу: 630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе 17.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе 17, и на официальном сайте организации.

Автореферат разослан «__» _____ 2023 года

Ученый секретарь
диссертационного совета 21.1.047.01
доктор медицинских наук, доцент

И.А. Кирилова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Количество операций с использованием остеопластических материалов ежегодно возрастает, что объясняется увеличением числа высокотехнологичных операций, реконструктивных вмешательств при костной патологии, деформациях костей, а также дефектах тканей, полученных в результате боевых травм (Хоминец В.В. и соавт., 2022; Дзюба Г.Г. и соавт., 2015; Максимов И.Б. и соавт., 2014; Гуражев М.Б. и соавт., 2021; Кирилова И.А. и соавт., 2019; Ахтямов И.Ф. и соавт., 2020; Крюков Е.В., Брижань Л.К. и соавт., 2019; Линник С.А. и соавт., 2021). Под утраченным объемом костной ткани следует понимать не только фактическое отсутствие участка кости, но и изменение ее плотности – уплотнение, например, вследствие импрессионного перелома, требующего реконструктивной коррекции, а также несоответствие структурно-функциональных характеристик костной ткани – например, в области ложного сустава (Stewart S.K. и соавт., 2019). Трудность замещения костных дефектов может возникать как в случае ограниченных, так и неограниченных дефектов (Корыткин А.А. и соавт., 2022; Тихилов Р.М. и соавт., 2022), что имеет особое значение при сочетании патологического процесса с нарушением нормальной биомеханики (Glatt V.A. и соавт., 2017). Важным аспектом восстановления костной ткани в зоне дефекта или дефицита костной ткани является правильный выбор костно-пластического материала (КПМ) для восстановления структурно-функциональных свойств кости.

Развитие тканеинженерных технологий и ортобиологии, как отдельного направления медицины позволяет создавать конструкции для костной пластики с заданными свойствами. Тканеинженерная конструкция представляет собой биомедицинский продукт, который состоит из клеток (клеточных линий), биосовместимого материала и вспомогательных веществ (Atala A. и соавт., 2012). Биосовместимый материал может быть как биологического (например, депротеинизированные и децеллюляризованные носители), так и небиологического происхождения (полимеры, металлы и сплавы). Структурно-функциональные свойства биосовместимого материала, имитация структуры, биологических и механических характеристик влияют на пролиферацию, адгезию и миграцию активного клеточного компонента. Таким образом биосовместимые материалы перестают быть статическими конструкциями, а присущая им ранее инертность меняется на функциональную активность (Хоминец В.В. и соавт., 2022; Toosi S. И соавт., 2020). Анализ литературы по теме исследования позволяет сделать заключение, что тканеинженерные конструкции для замещения костных дефектов на основе депротеинизированной губчатой кости в экспериментах на животных ранее не изучались, что обуславливает актуальность данного исследования.

Цель исследования: совершенствование метода замещения костных дефектов путем использования тканеинженерной конструкции на основе депротеинизированной губчатой кости.

Задачи исследования:

1. Изучить структурные характеристики и элементный состав депротеинизированной губчатой кости и оценить ее цитотоксичность для тестовой культуры фибробластов в эксперименте *in vitro*.

2. Изучить влияние депротеинизированной губчатой кости на адгезию, миграцию и пролиферацию мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани в эксперименте *in vitro*.

3. Разработать способ создания тканеинженерной конструкции на основе депротеинизированной губчатой кости для замещения костных дефектов и изучить восстановление костной ткани при её использовании по данным рентгеновской плотности в эксперименте *in vivo*.

4. Изучить замещение костного дефекта кортикальной пластины тканеинженерной конструкцией в эксперименте *in vivo*.

Научная новизна исследования

- Изучены структурные характеристики, элементный состав и цитотоксичность депротеинизированной губчатой кости (способ обработки в соответствии с патентами RU 2232585 C2, RU 2223104 C2, RU 2640932 C2 в лаборатории заготовки и консервации тканей ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна»)

- Впервые изучено влияние депротеинизированной губчатой кости на адгезию, миграцию и пролиферацию мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани человека в эксперименте *in vitro*.

- Разработан способ создания тканеинженерной конструкции на основе депротеинизированной губчатой кости для стимуляции регенерации кости (Патент №2801471 от 09.08.2023).

- Впервые в эксперименте *in vivo* изучено замещение дефекта кортикального слоя кости тканеинженерной конструкцией.

Теоретическая и практическая значимость исследования

В ходе работы сформирован фундаментально-прикладной задел, который может быть использован для создания тканеинженерной конструкции со стромально-васкулярной фракцией жировой ткани, которая относится к минимально-манипулированным клеточным продуктам (согласно консенсусу «Минимально манипулированные клеточные продукты» от 2021г), и исключает длительный процесс выделения и обработки клеточного материала. Данные настоящего исследования в перспективе могут быть внедрены в клиническую практику (травматолого-ортопедические отделения многопрофильных больниц, клиник).

Положения, выносимые на защиту

1. Депротеинизированная губчатая кость является перспективной основой для формирования тканеинженерной конструкции.

2. Использование разработанной тканеинженерной конструкции на основе депротеинизированной губчатой кости со стромально-васкулярной фракцией позволяет усовершенствовать метод замещения костных дефектов за счет восстановления кости в более ранние сроки.

Апробация основных положений диссертации.

Основные положения настоящего диссертационного исследования представлены и обсуждены на 9 российских конференциях и научных форумах, в том числе с международным участием: на международной конференции «Physics of cancer: interdisciplinary problems and clinical applications» (Tomsk, Russia, 2017); на всероссийской конференции с международным участием «XI Всероссийский съезд травматологов-ортопедов» (Санкт-Петербург, 2018); на XI всероссийской научно-практической конференции «Цивьяновские чтения» с международным участием (Новосибирск, 2019); на X всероссийском съезде трансплантологов (2020г); на III конгрессе ОРТОБИОЛОГИЯ 2022 «ОТ ИССЛЕДОВАНИЯ К КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ» (Москва, 2022); на VI съезде травматологов-ортопедов Сибирского федерального округа (Барнаул, 2022); на всероссийской конференции с международным участием «XII Всероссийский съезд травматологов-ортопедов» (Москва, 2022); вебинар на открытом образовательном портале для обучения врачей различных специальностей Doctor.school в системе НМО (2022); на IV конгрессе ОРТОБИОЛОГИЯ 2023 «Patient Cases – от теории к практике (Москва, 2023)

Публикация результатов исследования и сведения о внедрении в практику. По теме диссертационного исследования опубликовано 14 научных работ, в том числе – 4 в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, из них 4 в журналах, индексируемых в международной базе данных WoS. Получен патент на изобретение РФ №2801471 от 09.08.2023 «Способ создания тканеинженерной конструкции для стимуляции регенерации кости». Опубликовано 1 учебное пособие.

Полученные результаты исследования используются в лекционных курсах для аспирантов и ординаторов ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, кафедры травматологии и Новосибирского государственного медицинского университета Минздрава России.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 134 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка использованной литературы, приложения. Работа иллюстрирована 45 рисунками, 19 таблицами. Библиографический список использованной литературы представлен 232 источниками, из них 81 отечественных и 151 иностранных.

Личный вклад автора состоит в формулировке цели, задач исследования и основных положений, выносимых на защиту. Автором проанализированы зарубежные и отечественные источники литературы по проблеме исследования, методикам проведения экспериментов и обработке данных,

статистического анализа. Автором выполнены хирургические вмешательства на 24 (100 %) животных, разработано объемное соотношение элементов для формирования тканеинженерной конструкции (Патент №2801471 от 09.08.2023 «Способ создания тканеинженерной конструкции для стимуляции регенерации кости»).

Диссертационная работа выполнена в процессе обучения в аспирантуре при ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России в рамках государственного задания на проведение научных исследований и разработок на тему «Разработка биомедицинских регенерирующих имплантатов для травматологии и ортопедии», номер государственной регистрации АААА-А18-118030690022-4.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность работы, определены цели и задачи исследования, показана научная новизна и практическая значимость, сформированы основные положения, выносимые на защиту

В первой главе представлен обзор литературы, приводятся данные поисковых работ и обзоров с 2012 по 2022 по принципам замещения костных дефектов, формированию тканеинженерных конструкций. Приведены характеристики типов костных матриц с описанием их преимуществ и недостатков. Обоснован выбор стромально-васкулярной фракции (SVF) жировой ткани в качестве клеточного компонента тканеинженерной конструкции.

Вторая глава описывает материалы, методы и этапы экспериментального исследования.

Материалом исследования являлись фрагменты губчатой костной ткани головки бедренной кости (ДПК-ГБК) человека, резецированной по медицинским показаниям и после комплексного обследования на гемотрансмиссивные инфекции, с согласия пациента. Каждый образец был подвергнут многоэтапной последовательной обработке — механической и физико-химической децеллюляризации и депротеинизации с последующей радиационной стерилизацией (RU 2232585 С2, RU 2223104 С2, RU 2640932 С2) в лаборатории заготовки и консервации тканей ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна».

В работе использовали 20-ть срединных смежных распилов площадью $1,0 \text{ см}^2 \pm 5\%$ и толщиной $0,4 \text{ см} \pm 5\%$ - для исследования пористости костной ткани и ее элементного состава, и по 10-ть фрагментов кубической формы, $1,0 \text{ см}^3$ - для проведения МТТ-теста на цитотоксичность и исследования свойств МСК-ЖТ. По 4 фрагмента для разработки способа создания тканеинженерной конструкции. Для изучения замещения дефекта костной ткани в эксперименте *in vivo* КПМ использовали в виде фрагментов в соответствии с размерами костного дефекта.

Материал для лучевой диагностики и гистологического исследования при ортотопической имплантации образцов в эксперименте *in vivo*: участок бедренной кости области заполнения костных дефектов в сроки 2, 4 и 6-й недели после операции. Для гистологического исследования образцы фиксировали в 10 % нейтральным забуференным раствором формалина в течение 72 ч, с последующей декальцинацией в растворе Рихмана – Гельфанда – Хилла в течение 10 суток при температуре 20 °С.

Оценку структурных характеристик образцов ДПК-ГБК осуществляли на металлографическом инвертированном микроскопе «Альтами МЕТ 1МТ» (Россия, Санкт-Петербург) в светлом и темном полях, а также методом поляризации. Определяли параметры пор всех образцов ДПК-ГБК по фотоизображениям, полученным посредством макрофото съемки при различной глубине фокуса и рассчитывали общую пористость (раздел работы выполнен в лаборатории физики наноструктурных биоконструктивов ФГБУН «Институт физики прочности и материаловедения» СО РАН).

Для определения элементного состава образцов ДПК-ГБК использовали последовательный волнодисперсионный рентгенофлуоресцентный спектрометр Lab Center XRF-1800 (Япония).

Цитотоксичность ДПК-ГБК оценивали с помощью МТТ-теста в эксперименте *in vitro* после 1 и 7 сут. экстракции. В качестве тестовой культуры использовали стерильную культуру дермальных фибробластов человека 4-5 пассажа, полученную методом тканевых эксплантов (раздел работы выполнен в лаборатории биотехнологий университетской клиники ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России). Относительную интенсивность роста клеток (ОИР) определяли по следующей формуле (1):

$$\text{ОИР (\%)} = \frac{\text{средняя ОП в тестовой культуре}}{\text{средняя ОП в контроле}} \times 100 \quad (1),$$

где ОП – оптическая плотность.

Полученные данные выражали ОП в условных единицах, ОИР в процентах. Затем данные оценивали, ориентируясь на ранговую шкалу оценки цитотоксичности (ГОСТ ISO 10993-5-2011).

С целью изучения адгезии, миграции и пролиферации МСК-ЖТ человека на образцах ДПК-ГБК в эксперименте *in vitro* использовали стерильную культуру 3 пассажа. Состояние клеток культуры оценивали с помощью инвертированного микроскопа Leica DMI 3000 B, Leica Microsystems, Германия, с программным обеспечением LAS v. 4.3, Leica Microsystems, Германия. Фенотип МСК-ЖТ определяли с использованием моноклональных антител: CD90, CD105, CD44, CD 73, CD 45, CD 14, CD 34, CD HLA-DR, с соответствующим изотипическим контролем на цитофлуориметре BD FACS CANTO II.

Клетки тестовой культуры засеивали на поверхность стерильных образцов ДПК-ГБК в 2 мл ростовой среды ДМЕМ с добавлением антибиотиков и 10% телячьей эмбриональной сыворотки, (ООО «ПанЭко»,

Москва, Россия). В контрольные сроки: 24 часа, 3 суток и 7 суток, культивирования клеток на образцах костной ткани проводили окрашивание образцов флуоресцентными красителями в соответствии с протоколами производителя: флуорохром Hoechst 3334, BD Pharmingen™, США - визуализация ядер клеток, адгезировавшихся на образцах, флуорохромом TO-PRO™3ReadyFlow Invitrogen™, США - идентификация погибших клеток, флуорохромом Calcein AM — визуализация цитоплазмы жизнеспособных клеток. Распределение и жизнеспособность клеток в структуре образцов оценивали методом флуоресцентной микроскопии с использованием многофункционального фотометре-имиджера Cytation 5 (BioTek, США), с программным обеспечением Gen5 Imedge+ (BioTek, США) и фотофиксацией глубины миграции клеток в структуру материала и их распределения на разной глубине в структуре образцов с послойной съемкой по оси Z. Исследование проводили для каждого контрольного срока. Оценку пролиферативной активности проводили подсчетом общего количества клеток на Z-стек изображениях с последующим перерасчетом на 1 мм³. Жизнеспособность клеток оценивали путем подсчета на этих же изображениях количества мертвых клеток с последующим расчетом их доли от общего количества клеток в 1 мм³. Достоверность отличий оценивали по критерию Вилкоксона при $p < 0,001$.

Эксперимент *in vivo* выполнен на 24 кроликах линии NZW (раздел работы выполнен на базе ФГБУН «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова» СО РАН). Сформировано три группы исследования: 1-я группа (контрольная) — моделирование костных дефектов в участках диафиза бедренной кости без заполнения; 2-я группа — моделирование костного дефекта диафиза бедренной кости с его заполнением депротенизированной губчатой костью; 3-я группа — моделирование костного дефекта диафиза бедренной кости с его заполнением тканеинженерной конструкцией на основе депротенизированной губчатой кости со стромально-васкулярной фракцией жировой ткани (согласно технологии «Autologous conditioned plasma-SVF» (ACP-SVF) (патент US10512659B2). Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом через 2, 4 и 6 нед. после операции. В стандартных условиях осуществляли забор операционного материала для последующей МСКТ и гистологической оценки местного влияния костнозамещающих материалов на живые ткани и восстановление костной ткани в области замещения костных дефектов. Дизайн исследования соответствует действующим международным стандартам проведения лабораторных исследований ISO 10993-2-2009.

В эксперименте *in vivo* в качестве клеточного компонента тканеинженерной конструкции получали стромально-васкулярную фракцию из жировой ткани дорсальной поверхности шеи кролика породы NZW.

Для разработки способа создания тканеинженерной конструкции для стимуляции регенерации кости выполнен эксперимент в 4-х группах по выбору соотношения объема основы ТИК и клеточного компонента.

В 1-2 сериях предполагаемый результат не был получен, отмечалось неравномерное пропитывание образцов ДПК-ГБК. В 3-ей серии эксперимента образцы пропитаны полностью на весь поперечник, при этом отмечено избыточное количество клеточного компонента.

В 4 серии эксперимента получено равномерное пропитывание образца данного объема по всей площади, без признаков избытка СВФ.

Метод оперативного вмешательства в эксперименте in vivo

До начала анестезии у животных забирали 2 мл венозной крови из *v. marginalis* с последующим двукратным центрифугированием в течение 10 мин. при частоте 2800 об./мин. Кожные покровы в области экспериментального хирургического вмешательства освобождали от шерсти и маркировали по стандартной методике. Общую анестезию осуществляли 1% раствором тиопентала натрия с предшествующей местной инфильтрационной анестезией тканей 2 мл 2% раствора лидокаина с 6 мл 0,9% раствора NaCl для каждого этапа операции. Использовали единичный небольшой хирургический доступ по дорсальной поверхности шеи животного, паравертебрально между лопатками и параллельно линии остистых отростков позвонков, осуществляли *забор жировой ткани* кремово-белого цвета в объеме 2 мл. Полученную жировую ткань укладывали в стерильную чашку Петри с добавлением 4 мл раствора Кляйна (оригинального состава) с последующим механическим измельчением при помощи хирургического инструментария. Затем обрабатывали посредством быстрого перегона в системе из двух стерильных инъекционных шприцев до получения однородной массы с последующим распределением по 4 пробиркам типа эппендорф объемом 2 мл и двукратно центрифугировали в течение 10 мин. при частоте оборотов 2800 об./мин. с этапным очищением (дополнительным центрифугированием) и соответственно сокращением объема субстрата. Следующий этап выделения и обработки стромально-васкулярной фракции жировой ткани был проведен по стандартной методике с добавлением центрифугированной крови — выделенной из нее обогащенной тромбоцитами плазмой.

Для оценки эффективности репаративного остеогенеза при замещении костных дефектов тканеинженерной конструкцией на основе депротенизированной губчатой кости *моделировали костные дефекты* согласно выбранным группам исследования. Выполняли хирургический доступ по латеральной стороне дистальной части бедра. Мягкие ткани разводили тупо по ходу мышечных волокон, надкостницу отслаивали при помощи распатора. В диафизарной части бедренной кости обеих задних лап каждого животного формировали по три несквозных костных дефекта. Два из трех костных дефектов, расположенных в диафизе правой бедренной кости, замещали образцами в соответствии с группой исследования — 2-я и 3-я

группы. Симметричные костные дефекты контралатеральной бедренной кости не заполняли костным материалом, использовали в качестве контроля. Для подтверждения отсутствия вариативности морфологических проявлений репаративной регенерации костной ткани в условиях каждой отдельной особи были сформированы дополнительные дефекты — по одному в диафизарной части бедренной кости на каждой конечности. Осуществляли гемостаз и послойное ушивание операционной раны. Осуществляли обработку послеоперационного шва раствором антисептика и порошком антибактериального комбинированного препарата с активными веществами бацитрацин, неомицин.

Гистологическое исследование операционного материала. После стандартной гистологической проводки в серии спиртов возрастающей концентрации и ксилоле образцы костной ткани заливали в парафиновые блоки, изготавливали серийные срезы толщиной 4–5 мкм и их окрашиванием гематоксилином и эозином. С целью дифференцированной количественной оценки зрелой и формирующейся соединительной ткани в образцах исследования гистологические срезы окрашивали по Ван Гизону и подвергали импрегнации серебром. Препараты заключали в монтирующую среду под покровное стекло и высушивали в течение 7 дней при комнатной температуре. Обзорную световую микроскопию с получением обзорных микрофотографий осуществляли на лабораторном микроскопе OLYMPUS CX 43 с фотокамерой OLYMPUS UC 90 (Olympus Medical Systems Corp., Япония). *Морфометрическое исследование* гистологических образцов проводили с помощью программного обеспечения (ImageJ, v. 1.53o, 2022, Wayne Rasband and contributors National Institutes of Health, США) при увеличении 200. В гистологических срезах оценивали численную плотность сосудов (Nai), из них процент полнокровных сосудов в зоне имплантации (%), объемную плотность зрелых коллагеновых волокон (Vv%), объемную плотность аргирофильных соединительнотканых волокон (Vv%), объемную плотность костной ткани зрелой и новообразованной (Vv%).

Статистический анализ. Результаты исследования *in vitro* обрабатывали методами непараметрической статистики с применением критерия парных сравнений Вилкоксона при помощи пакета программ STATISTICA 6.0. Статистическую обработку данных эксперимента *in vivo* осуществляли в программе RStudio (v. 2022.02.1 RStudio, Inc., США) на языке R (v. 4.1.3, Австрия). Для полученных морфометрических данных дескриптивные статистики непрерывных показателей рассчитывались в виде медиан [первый квартиль; третий квартиль], среднее \pm стандартное отклонение и минимальное — максимальное значение; у категориальных показателей определялась частота для каждой категории. Сравнение непрерывных показателей между группами проводилось непараметрическим непарным U-критерием Манна–Уитни. Производился расчет смещения распределений с построением 95% доверительного интервала (ДИ) для смещения. Категориальные показатели сравнивали точным двусторонним критерием

Фишера. Коррекция ошибки множественного тестирования при сравнении категорий проводилась методом Бенджамини–Хохберга. Проверка статистических гипотез проводилась при критическом уровне значимости $p = 0,001$, т.е. различие считалось статистически значимым при $p < 0,001$.

Для полученных данных лучевой диагностики описательные статистики непрерывных показателей дефекта рассчитывались в виде медианы [первый квартиль; третий квартиль] (МЕД [Q1; Q3]), среднее \pm стандартное отклонение (СРЕД \pm СО), минимальное и максимальное значение (МИН-МАКС). Для сравнения показателей областей дефекта с зоной интактной кортикальной пластинки использовали непараметрический критерий Вилкоксона, статистически значимым считалось различие при $p < 0,05$.

Для выявления парных числовых зависимостей между непрерывными показателями рассчитывались коэффициенты корреляции Спирмена r с оценкой достигнутого уровня значимости p . Проверка статистических гипотез проводилась при критическом уровне значимости $p = 0,05$, т.е. различие считалось статистически значимым, если $p < 0,05$. Все использованные критерии были двусторонними.

В третьей главе представлены результаты исследования:

Изучены структурные характеристики и элементный состав губчатой костной ткани головки бедренной кости человека. При исследовании распределения пор в срединных распилах выявлено, что средний продольный размер пор в среднем превышает поперечный на 33,8 %, вне зависимости от их размера. Общая пористость образцов депротенизированной губчатой костной ткани в среднем составляла не ниже 32 %. Исследования элементного состава костной ткани показали наличие следующих элементов: Ca, P, O, Na, Mg, а также Sn, S, Fe, Cr, C в микроколичествах, а показатель атомного соотношения Ca/P составил 1,55

Анализ результатов МТТ-теста депротенизированной губчатой кости человека не выявил данных за цитотоксичность.

*Изучено влияние депротенизированной губчатой кости человека на характеристики мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани *in vitro*.* Исследование характера адгезии МСК ЖТ на образцах депротенизированной губчатой кости в полях зрения при разном увеличении выявили отчетливую визуализацию ядер клеток как через 48 ч, так и через 144 ч, в то время как на образцах контрольных серий (только костная матрица) клетки отсутствовали ($p < 0,05$). Отмечали миграцию клеток в глубокие зоны образцов (таблица 1).

Таблица 1 – Миграция клеток в структуру образцов ДПГК-ГБК

Показатель	Время культивирования		
	24 ч	96 ч	168 ч
Глубина проникновения клеток в материал по оси Z (мкм)	273,10 $\pm 13,93$	381,70 $\pm 20,62^*$	702,91 $\pm 28,11^{**/**}$
Скорость миграции клеток (мкм/ч)	11	4	4

Примечание: * $p < 0,001$ – сравнение с 24 ч; ** $p < 0,001$ – сравнение с 96 ч, критерий Вилкоксона.

Глубина проникновения клеток в материал к 4-м суткам увеличилась в 1,4 раза ($p < 0,001$) и в среднем составила 381,7 мкм. К 7-м суткам нарастание глубины миграции клеток сохранило прежние темпы по отношению к результату на 96 ч с начала наблюдения ($p < 0,001$), увеличилась в 2,6 раза по отношению к 24 ч с начала наблюдения. В процессе культивирования на образцах и миграции во внутренние структуры клетки сохраняли жизнеспособность и пролиферативную активность (таблица 2), о чем свидетельствовало статистически значимое увеличение количества клеток на образцах ($p < 0,001$).

Таблица 2 – Пролиферативная активность и жизнеспособность МСК ЖТ при культивировании в структуре депротенизированной губчатой кости

Время культивирования	1-е сутки	4-е сутки	7-е сутки
Общее количество клеток в 1 мм ³	302,27 ± 22,79	664,31 ± 32,10*	1744,43 ± 73,62*/**
Мертвые клетки в 1 мм ³ (%)	3,37	3,95	0,81

Примечание: * $p < 0,001$ – сравнение с 1-ми сутками, ** $p < 0,001$ – сравнение с 4-ми сутками, критерий Вилкоксона.

Для подтверждения жизнеспособности клеток на образцах исследуемого материала образцы были докрашены флуорохромом (Calcein AM, BD Pharmingen™): на поверхности материала хорошо визуализировались клетки с зеленым сигналом свечения в цитоплазме. Это свидетельствует о сохранении МСК жизнеспособности на образцах материала на протяжении всего срока наблюдения (144 ч/6 суток).

Разработан способ создания тканеинженерной конструкции для стимуляции регенерации кости (Патент №2801471 от 09.08.2023), который заключается в соблюдении объемных соотношений депротенизированной губчатой кости человека и клеточного компонента 1:1,7 соответственно, что позволяет оптимальным образом пропитать биосовместимый материал.

В четвертой главе представлены результаты эксперимента *in vivo*. Изучены показатели костной плотности в области замещения дефекта кортикальной пластины. В группе №1 (контроль) к 6-ти неделям костная плотность соответствовала D2 по классификации Misch со стороны надкостницы и D4 со стороны костномозгового канала (рисунок 1). К 6-й неделе исследования в 3-й группе разница величин показателей рентгеновской плотности кости в области дефекта со стороны надкостницы и костномозгового канала была минимальной и не имела достоверных отличий, в то время как во 2-й группе сохранялось преобладание величины рентгеновской плотности кости со стороны надкостницы в 1,6 раза, в сравнении с величиной данного показателя со стороны костномозгового канала (рисунки 2 и 3).

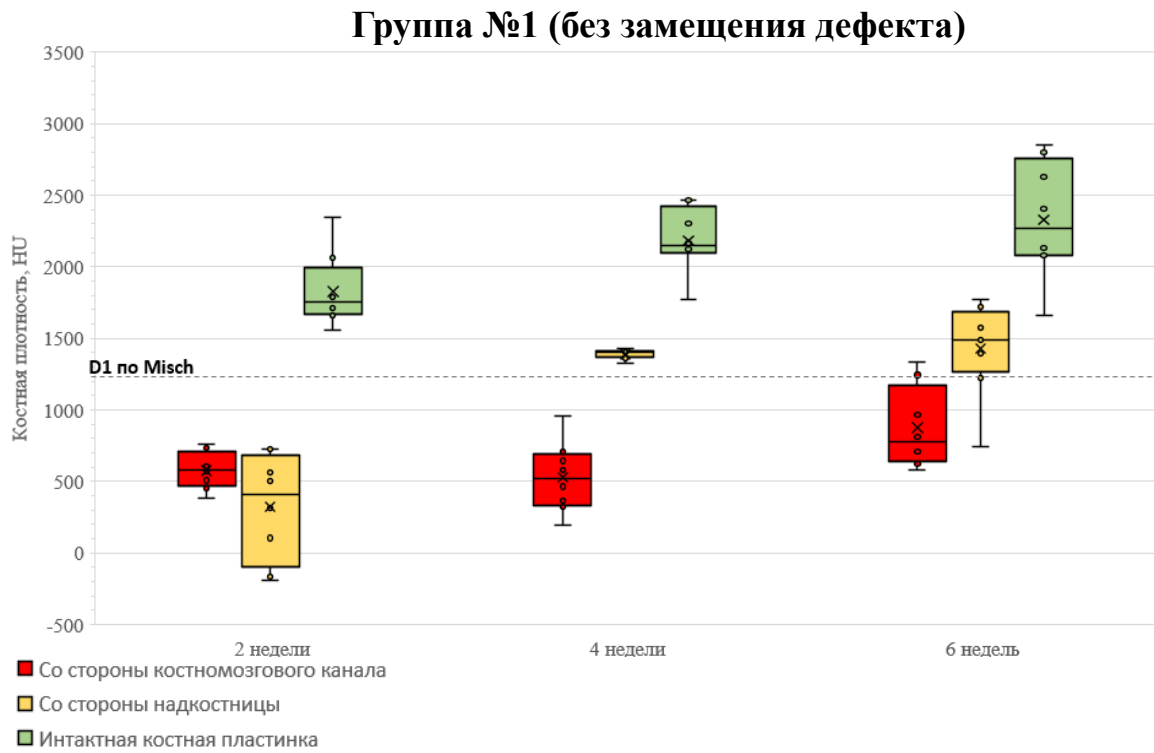


Рисунок 1 – Динамика показателей костной плотности по данным МСКТ в группе №1, без замещения костного дефекта

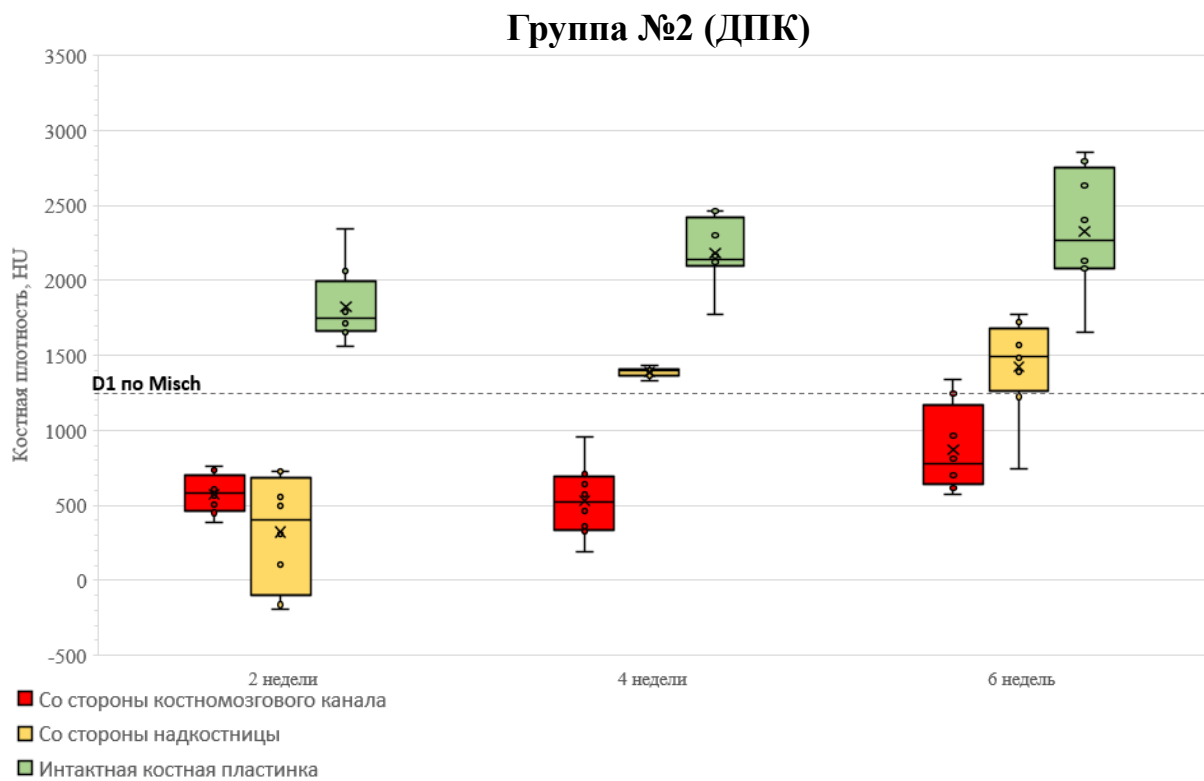


Рисунок 2 – Динамика показателей костной плотности по данным МСКТ в группе №2, с замещением дефекта при помощи ДПК

Группа №3 (ДПК+СВФ)

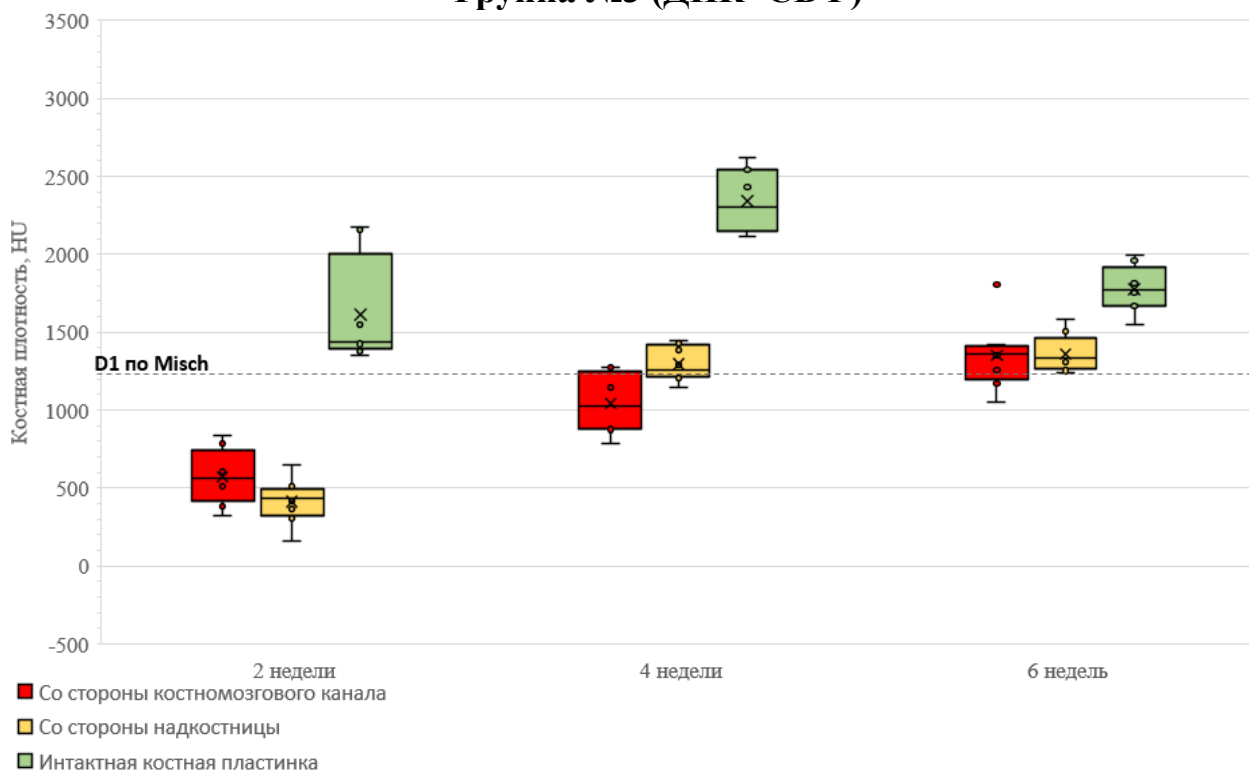


Рисунок 3 – Динамика показателей костной плотности по данным МСКТ в группе №3, с замещением дефекта при помощи ДПК совместно с аутологичной СВФ

В 3-й группе к 6-й неделе исследования рентгеновская плотность костной ткани в области замещения дефекта соответствовала типу D1 (Misch) — толстая компактная кость. В то время как во 2-й группе показатель рентгеновской плотности кости оставался соответствующим уровню костной плотности D2-D-3 (Misch), ($p < 0,05$).

Данные лучевой диагностики подтверждались результатами гистологического исследования (таблица 3). При морфометрическом исследовании образцов костной ткани области моделирования костного дефекта и его замещения разными костнозамещающими материалами во всех группах было выявлено прогрессивное увеличение показателя численной плотности сосудов к 6-й нед. исследования, в том числе полнокровных. При этом в 3-й группе величина показателя численной плотности сосудов была больше на 2-й, 4-й и 6-й нед. исследования в 1,8; 2,3 и 1,5 раза соответственно, чем в образцах 1-й (контрольной) группы ($p < 0,001$), и несколько больше, чем во 2-й группе.

Таблица 3 – Результаты гистологического исследования репаративного остеогенеза при замещении костных дефектов разными видами костнопластического материала (M+m)

Параметры исследования	Группы исследования								
	1 группа (контрольная) Костный дефект без замещения			2 группа Костный дефект с замещением губчатой ДПК			3 группа Костный дефект с замещением губчатой ДПК + SVF		
	Сроки исследования (недели)								
	2	4	6	2	4	6	2	4	6
Численная плотность сосудов в образцах костной ткани, (Nai)	5,61±1,5	8,25±1,5	16,66±5,7	10,43*±3,5	18,73*±2,2	23,70*±6,8	10,40*±3,41	20,36*,**±4,5	26,31*,**±7,9
Процент полнокровных сосудов, %	54,44±0,2	78,82±0,2	96,58±0,1	38,3*±0,2	75,49*±0,2	92,20*±0,1	81,19*,**±0,2	64,45*±0,2	97,37±0,3
Объемная плотность коллагеновых волокон в образцах костной ткани, (Vv%)	5,15±0,6	7,08±1,1	12,68±2,5	6,35*±3,8	8,83*±2,53	9,26*±1,6	6,88*±1,5	9,30*±1,1	10,68*,**±1,6
Объемная плотность аргирофильных волокон в образцах костной ткани, (Vv%)	7,33±0,7	11,83±1,1	14,19±2,4	7,25±1,8	9,95*±1,6	10,03*±2,2	9,66*,**±1,3	10,23*±1,9	10,65*±2,1
Объемная плотность зрелой костной ткани, (Vv%)	2,88±0,7	6,43±0,8	8,98±1,6	5,98*±2,8	8,81*±1,5	12,83*±1,5	8,63*,**±2,2	11,51*,**±2,5	14,58*,**±2,2
Объемная плотность новообразованной костной ткани, (Vv%)	3,81±0,7	6,43±0,8	9,26±2,1	6,11*±3,2	9,81*±1,6	13,53*±2,7	9,51*,**±2,2	12,95*,**±2,71	16,43*,**±2,1

Примечание:

* - достоверность отличий величин рассматриваемых параметров от аналогичных показателей в контрольной группе, при $p < 0,001$.

** - достоверность отличий величин рассматриваемых параметров от аналогичных показателей во 2 группе, при $p < 0,001$.

При оценке показателя объемной плотности коллагеновых соединительнотканых волокон в образцах исследования 3-й группы выявили его увеличение на 36% со 2-й по 6-ю нед. При этом величина данного показателя уже на 2-й нед. исследования была больше на 25%, чем в образцах 1-й группы, однако на 6-й нед. отмечали ее незначительное уменьшение. При этом во все сроки исследования величина данного параметра была незначительно больше, чем в образцах 2-й группы. Это сопровождалось незначительным прогрессирующим увеличением показателя объемной плотности аргирофильных волокон в образцах 3-й группы и его некоторым преобладанием над величиной данного параметра во 2-й группе на 2-й и 4-й нед. исследования. К 6-й нед. разница в величинах данного показателя невеликовалась. Прогрессирующее увеличение показателя объемной плотности аргирофильных волокон в образцах 1-й и 2-й групп выявили с 2-й по 6-ю нед. (в 2 раза). При этом объемная плотность аргирофильных волокон в 1-й группе исследования на 6-й нед. была больше на 28Vv% в сравнении с величиной аналогичного показателя во 2-й и 3-й группах.

Величина объемной плотности новообразованной костной ткани прогрессивно увеличивалась с 2-й по 6-ю нед.: в 1-й группе — в 1,6 раза, во 2-й группе — в 2,2 раза и в 3-й группе — в 1,7 раза. При этом во все периоды наблюдения объемная плотность новообразованной костной ткани в 3-й группе была статистически значимо больше, чем в 1-й группе, примерно в 2 раза ($p < 0,001$). Объемная плотность зрелой костной ткани в образцах исследования увеличивалась с 2-й по 6-ю нед. во всех группах. При этом величины данного показателя в 2-й и 3-й группах были больше, чем в 1-й группе, во все сроки наблюдения ($p < 0,001$).

Таким образом, использование тканеинженерной конструкции на основе депротеинизированной губчатой кости позволяет ускорить процесс замещения костного дефекта, по сравнению с 1-ой и 2-ой группами исследования и подтверждает возможность её эффективного использования в качестве основы такой конструкции для замещения костных дефектов.

ВЫВОДЫ

1. Депротеинизированная губчатая кость имеет пористую структуру с общей пористостью от 32% до 37%, сохранением микроэлементного состава и показателем атомного соотношения Ca/P - 1,55, без проявлений цитотоксичности в тестовой культуре фибробластов человека *in vitro*.

2. Выявленные структурные характеристики депротеинизированной губчатой кости обеспечивают условия для адгезии мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани на поверхности материала, способствуют сохранению клетками жизнеспособности, пролиферативной активности и миграции вглубь структуры материала на протяжении всего периода культивирования *in vitro*.

3. Разработанный способ создания тканеинженерной конструкции позволяет осуществить замещение дефекта костной ткани, что подтверждается в эксперименте *in vivo* восстановлением рентгеновской плотности кости до показателя D1 по шкале Misch ($p = 0,045$) к сроку наблюдения 6 недель в группе исследования по сравнению аналогичными показателями 1-ой (D2) и 2-ой (D3) групп.

4. Использование тканеинженерной конструкции для замещения дефекта кортикальной пластинки бедренной кости кролика в эксперименте *in vivo* способствует раннему восстановлению структуры кости, что подтверждено увеличением показателя объемной плотности зрелой и новообразованной костной ткани к 6-ой неделе в группе исследования в 1,7 раза, что превышает аналогичные показатели в 1-ой и 2-ой группах ($p < 0,001$).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Анастасиева Е.А., Садовой М.А., Воропаева А.А., Кирилова И.А. Использование ауто и аллотрансплантатов для замещения костных дефектов при резекциях опухолей костей (обзор литературы). // **Травматология и ортопедия России**. - 2017. - Т. 23. - №3. - С. 148-155. doi: 10.21823/2311-2905-2017-23-3-148-155

2. Analysis of the results of replacement of large bone defects in the patients who underwent segmental bone resection for tumor / Anastasieva E.A., Voropaeva A.A., Sadovoy M.A. and Kirilova I.A. // AIP Conference Proceedings. – AIP Publishing, 2017. – Т. 1882. – №. 1. – С. 020002-1 – 020002-4. <https://doi.org/10.1063/1.5001581>

3. Изучение влияния аутологических факторов роста на остеогенез на примере восстановления костной ткани при пластике дефектов / Анастасиева Е.А., Кирилова И.А. // В книге: Достижения российской травматологии и ортопедии Материалы XI Всероссийского съезда травматологов-ортопедов: в 3 томах. 2018. - С. 850-853. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=34936796>

4. Проблемы замещения костных и костно-хрящевых дефектов: перспективы применения стромально-васкулярной фракции жировой ткани для их замещения / Анастасиева Е.А., Батанова А.И., Кирилова И.А. // В книге: Цивьяновские чтения материалы XI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 2019. С. 17-19. <https://elibrary.ru/item.asp?id=41788695>

5. Клетки стромально-васкулярной фракции жировой ткани для восполнения костных дефектов / Анастасиева Е.А., Батанова А.И., Павлов В.В., Кирилова И.А. // **Гены и Клетки**. 2019. Т. 14. № 3. С. 96-97. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=42625053>

6. Перспективы применения клеточных технологий в травматологии и ортопедии / Батанова А.И., Павлов В.В., Кирилова И.А., Анастасиева Е.А.,

Батанов Д.И. // **Вестник трансплантологии и искусственных органов.** 2020. Т. 22. № 5. С. 132. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=44018737>

7. Оценка *in vitro* влияния аллогенной костной матрицы на характеристики мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани при создании комбинированных тканеинженерных конструкций / Черданцева Л.А., Анастасиева Е.А., Алейник Д.Я., Егорихина М.Н., Кирилова И.А. // **Травматология и ортопедия России.** 2021. Т. 27. № 1. С. 53-65.

8. 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. – 244 с. – ISBN 978-5-9221-1918-4.

9. Использование стромально-васкулярной фракции жировой ткани на аллогенной костной матрице человека. Обоснование выбора матрицы в эксперименте *in vitro* / Анастасиева Е.А., Черданцева Л.А., Алейник Д.Я., Егорихина М.Н., Кирилова И.А. // В книге: III конгресс ОРТОБИОЛОГИЯ 2022 «От исследования к клинической практике». тезисы. Воронеж, 2022. С. 50-52.

10. Замещение аллокостью дефектов костной ткани при доброкачественных опухолях и опухолеподобных заболеваниях / И. А. Кирилова, Е. А. Анастасиева, Е. В. Губина, Л. А. Черданцева. – Новосибирск: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2021. – 60 с

11. Использование депротенизированной костной ткани в качестве матрицы тканеинженерной конструкции: экспериментальное подтверждение / Анастасиева Е.А., Черданцева Л.А., Толстикова Т.Г., Кирилова И.А. // **Травматология и ортопедия России.** - 2023. - Т. 29. - №1. - С. 46-59. doi: [10.17816/2311-2905-2016](https://doi.org/10.17816/2311-2905-2016)

12. Патент № 2801471 С1 Российская Федерация, МПК А61F 2/28. способ создания тканеинженерной конструкции для стимуляции регенерации кости : № 2022126705 : заявл. 13.10.2022 : опубл. 09.08.2023 / Е. А. Анастасиева, И. А. Кирилова ; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение "Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна" Министерства здравоохранения Российской Федерации. – EDN RYYFRD.

13. Изучение влияния структурных характеристик аллогенной депротенизированной губчатой кости на активность мезенхимных стромальных клеток жировой ткани/ Черданцева Л.А., Анастасиева Е.А., Егорихина М.Н., Алейник Д.Я., Медведчиков А.Е., Шаркеев Ю.П., Кирилова И.А. // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2023, Том 176, №10. 2-6 с.

14. Особенности восстановления рентгеновской плотности костной ткани при замещении костных дефектов депротенизированной губчатой костью человека совместно с аутологичной стромально-васкулярной фракцией по данным МСКТ / Анастасиева Е.А., Черданцева Л.А., Медведчиков А.Е., Лукинов В.Л., Кирилова И.А. // **Acta biomedica scientifica**. 2023. – №5

Подписано в печать 06.10.2023 г.

Формат 60x90/16. Объем 1,75 п.л., 1,1 авт.л.

Бумага офсетная. Гарнитура Times New Roman

Заказ 16895. Тираж 130 экз.

Отпечатано в полном соответствии с авторским оригиналом
в типографии ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России

Новосибирск, ул. Фрунзе, 17, телефон: 8-383-373-32-01

E-mail: niito@niito.ru