

© Ю. М. Ирьянов, Н. А. Кирьянов, О. В. Дюрягина, 2015  
УДК 616.72-018.3-003.93

Ю. М. Ирьянов<sup>1</sup>, Н. А. Кирьянов<sup>2</sup>, О. В. Дюрягина<sup>1</sup>

## ВЛИЯНИЕ ИМПЛАНТАЦИИ МИНЕРАЛИЗОВАННОГО КОСТНОГО МАТРИКСА НА РЕГЕНЕРАЦИЮ СУСТАВНОГО ХРЯЩА

<sup>1</sup> Лаборатория морфологии (зав. — проф. Ю. М. Ирьянов), Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г. А. Илизарова, г. Курган; <sup>2</sup> кафедра патологической анатомии (зав. — проф. Н. А. Кирьянов), Ижевская государственная медицинская академия

В эксперименте на половозрелых крысах линии Вистар (n=25) методами световой и электронной микроскопии, гистохимии и рентгеновского электронно-зондового микроанализа исследованы особенности регенерации хряща коленного сустава после моделирования краевого дырчатого дефекта и имплантации в зону повреждения гранулированного минерализованного костного матрикса (МКМ). Установлено, что данный биоматериал обладает хондроиндуктивными свойствами, обеспечивает пролонгированную активизацию репаративного процесса, ускоренное органотипическое ремоделирование и восстановление поврежденного суставного хряща. Полученные данные указывают на возможность применения МКМ в клинической практике при лечении повреждений и заболеваний суставного хряща.

**Ключевые слова:** суставной хрящ, минеральный компонент костного матрикса, имплантация, репаративный хондрогенез

Хирургические методы лечения при повреждении или утрате суставного хряща вследствие врожденных аномалий, дегенеративных заболеваний или травм часто оказываются недостаточными и во многих случаях не приводят к ожидаемому полноценному его возмещению [9, 10]. В связи с этим разработка, научное обоснование и экспериментально-морфологическая апробация биоматериалов, обладающих хондрогенной активностью, являются одной из наиболее актуальных проблем современной медицины. Наиболее широко используемые биоматериалы: деминерализованный костный матрикс, матрицы из полимолочных и полигликолевых кислот, коллагеновые криогели, аналоги костного минерала, полисахариды природного происхождения характеризуются низкой пластической эффективностью, отсутствием хондрогенной активности, ограниченной биосовместимостью [1, 5, 7, 12]. Ранее проведенные нами исследования показали, что минерализованный костный матрикс (МКМ), полученный по оригинальной технологии без применения термической и деминерализующей обработки [6], обладает остеоиндуктивным свойством и является эффективным стимулятором остеогенеза [4]. Цель настоящей работы — морфологический анализ репаративного хондрогенеза при имплантации в зону повреждения хряща коленного сустава данного биоматериала — МКМ.

**Материал и методы.** В работе использованы 25 половозрелых крыс линии Вистар массой 340–390 г (20 подопытных и 5 интактных). Содержание, эксперименты и эвтаназия животных соответствовали требованиям, указанным в нормативных документах [2]. У подопытных крыс в условиях операционной с использованием общей анестезии (рометар 8 мг и золетил 4 мг на 1000 г массы тела внутримышечно) на пателлярной поверхности дистального конца левой и правой бедренной кости зубным бором моделировали несквозные окончатые дефекты диаметром 2,5–3 мм до проникновения в субхондральную кость. В область дефекта правой кости вводили стерильный гранулированный аллогенный МКМ массой 2–3 мг, полученный из трубчатых костей беспородных крыс по оригинальной технологии [6]. Зону дефекта левой кости оставляли заживать под кровяным сгустком и использовали в качестве контроля. У 5 интактных здоровых крыс для сравнения исследовали хрящ коленного сустава. Через 7, 15, 30 и 60 сут после операции подопытных животных выводили из эксперимента (использовали по 5 животных на каждую временную точку). Бедренные кости оперированных подопытных и интактных животных фиксировали в 2% растворе параформальдегида и 2% растворе глутаральдегида на фосфатном буфере (рН 7,4) и заливали в парафин (после декальцинации) и аралдит (без декальцинации). Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином — эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону и альциановым синим (Alcian blue 8GS) при рН 2,5 и 1,0 для выявления несulfатированных (НСГАГ) и sulfатированных гликозаминогликанов (СГАГ) соответственно. Содержание ГАГ (в усл.уд.) оценивали, определяя концентрацию альцианового синего в срезах, которую измеряли при помощи энергодисперсионного рентгеновского спектрометра (рентгеновского электронно-зондового микроанализатора) INCA-200 Energy (Oxford Instruments,

### Сведения об авторах:

Ирьянов Юрий Михайлович (e-mail: [irianov@mail.ru](mailto:irianov@mail.ru)), Дюрягина Ольга Владимировна (e-mail: [irianov@mail.ru](mailto:irianov@mail.ru)), лаборатория морфологии, Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г. А. Илизарова, 640014, г. Курган, ул. М. Ульяновой, 6;

Кирьянов Николай Александрович (e-mail: [kirnik@igma.udm.ru](mailto:kirnik@igma.udm.ru)), кафедра патологической анатомии, Ижевская государственная медицинская академия, 426034, г. Ижевск, ул. Коммунаров, 281

Англия) [3]. Структуру гранул МКМ и регенератов в зоне повреждения исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-840 (Jeol, Япония) и трансмиссионного электронного микроскопа JEM-2010 (Jeol, Япония). Результаты количественных исследований обрабатывали методами вариационной статистики. Значимость различий сравниваемых параметров рассчитывали с использованием критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при уровне  $P < 0,05$ .

**Результаты исследования.** Имплантированные гранулы МКМ имеют размер 50–200 мкм в поперечнике и упорядоченную высокопористую структуру. Поры соответствуют местам локализации лакун остеоцитов и костных канальцев, из которых клетки и другие органические компоненты были удалены при получении биоматериала.

Установлено, что через 7 сут после операции в левой и правой конечности суставная капсула гиперемирована и отечна. Хрящевое покрытие имеет матовый оттенок. В зоне повреждения выявляются признаки воспалительной реакции и альтеративно-деструктивные преобразования, затрагивающие все компоненты метаэпифиза. Обнаруживаются очаги организованной гематомы, сгустки фибрина, инфильтрированные мало дифференцированными клеточными элементами, нейтрофильными гранулоцитами, лимфоцитами, макрофагами, тучными клетками и экстравазальными эритроцитами. Выявляются лейкоцитарно-некротические массы, содержащие лизированные клетки и пласты фибрина. Суставной хрящ скарифицирован. Зона дефекта частично восполняется грануляционной и мало дифференцированной рыхлой соединительной тканью с признаками отека и немногочисленными сосудами. В правой кости (опыт) в зоне повреждения наблюдаются единичные костно-остеоидные очаги и тонкие костные трабекулы. Репаративное костеобразование осуществляется по типу интрамембранного остеогенеза. Содержание НСГАГ и СГАГ в зоне повреждения суставного хряща значительно снижено по сравнению с аналогичными показателями у интактных животных ( $0,59 \pm 0,03$  и

$0,68 \pm 0,03$  усл.ед. соответственно), однако значимых изменений в их содержании в контроле и опыте на этом этапе эксперимента не выявлено (таблица).

Через 15 сут после операции в контрольной кости в центральной зоне дефекта выявляется грануляционная ткань, содержащая многочисленные лейкоциты, фибробластические элементы, пучки коллагеновых волокон и значительное количество расширенных и заполненных кровью сосудов. В правой кости (опыт) клеточные элементы, характерные для воспаления, не выявляются, репаративное костеобразование осуществляется не только по типу интрамембранного, но и энхондрального остеогенеза. В зоне повреждения субхондральной кости формируется обширная мелкопетлистая сеть утолщенных трабекул, покрытых рядами многочисленных крупных остеобластов, образующих губчатую кость, тесно спающую с поверхностью подлежащей кости. Имплантируемые гранулы МКМ имеют вид кистозных полостей, образовавшихся при декальцинации образца и вследствие биодеструкции, внутри них располагаются функционально активные остеокласты с многочисленными ядрами и гофрированным краем (рис. 1). Многочисленные синусоидные капилляры окружены пролиферирующими периваскулярными клетками.

В этих участках отсутствуют геморрагии и очаги деструкции, отмечается активная пролиферация фибробластов, интенсивный неогенез, на поверхности гранул МКМ располагаются слои остео- и хондрогенных клеток на различных этапах дифференцировки. Зона дефекта суставного хряща частично заполняется новообразованным гиалиновым хрящом, межклеточное вещество которого содержит, преимущественно, НСГАГ (см. таблицу). Края дефекта сливаются с краями не поврежденного в процессе операции суставного хряща, где выявляются изогенные группы хондроцитов. Наличие последних свидетельствует о пролиферативной активности части хондроцитов, являющихся одним из источников хрящевой

**Содержание гликозаминогликанов в зоне повреждения хряща коленного сустава у крыс без пластики дефектов (контроль) и с использованием аллогенного минерализованного костного матрикса (опыт) ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ , усл.ед.)**

| Срок эксперимента, сут | Контроль          |                   | Опыт                |                     |
|------------------------|-------------------|-------------------|---------------------|---------------------|
|                        | НСГАГ             | СГАГ              | НСГАГ               | СГАГ                |
| 7                      | $0,180 \pm 0,011$ | $0,111 \pm 0,011$ | $0,201 \pm 0,012$   | $0,121 \pm 0,011$   |
| 15                     | $0,191 \pm 0,011$ | $0,121 \pm 0,012$ | $0,493 \pm 0,013^*$ | $0,261 \pm 0,012^*$ |
| 30                     | $0,210 \pm 0,012$ | $0,160 \pm 0,011$ | $0,563 \pm 0,023^*$ | $0,542 \pm 0,013^*$ |
| 60                     | $0,221 \pm 0,012$ | $0,242 \pm 0,013$ | $0,59 \pm 0,03^*$   | $0,702 \pm 0,013^*$ |

Примечание. НСГАГ — несультатированные гликозаминогликаны; СГАГ — сультатированные гликозаминогликаны.

\* Значимые изменения по сравнению с показателями в контроле.

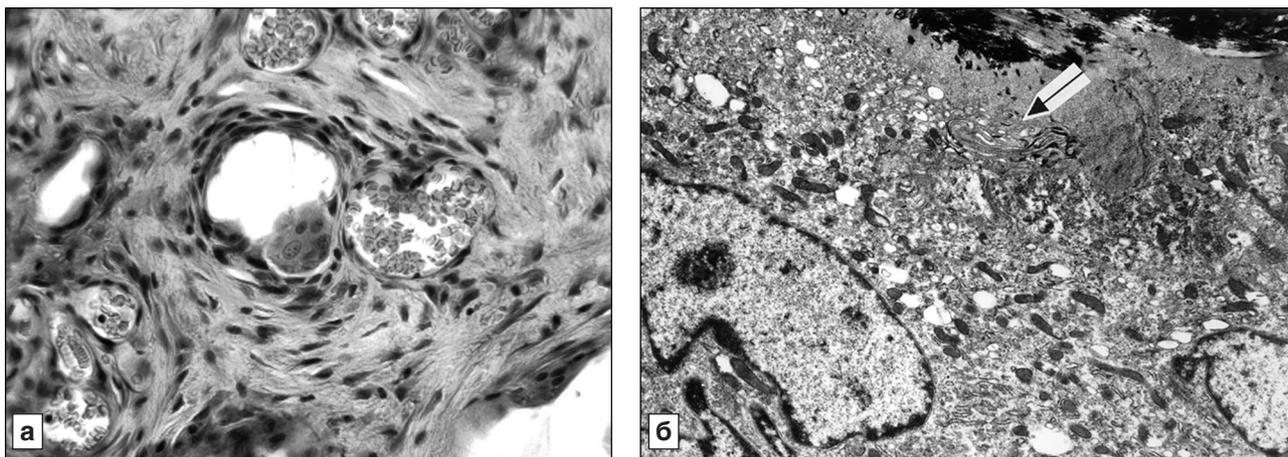


Рис. 1. Зона дефекта хряща коленного сустава крысы через 15 сут после операции.

а — остеокласт внутри имплантированной гранулы минерализованного костного матрикса (МКМ), имеющей вид кистозной полости; б — ультраструктура остеокласта, расположенного на поверхности имплантированной гранулы МКМ. Стрелка — гофрированный край остеокласта в зоне контакта. а — окраска гематоксилином — эозином. а — об. 40, ок. 10; б — ув. 8000

ткани, заполняющей дефект. Вторым источником хондроцитов являются клетки, располагающиеся вокруг гранул МКМ, и третьим — хондроциты в зоне энхондрального остеогенеза в участках заживления субхондральной кости. Концентрация ГАГ в зоне дефекта в опыте более чем в 2 раза превосходит контрольные значения (см. таблицу).

Через 30 и 60 сут после операции в контроле значительный объем зоны дефекта заполнен рыхлой или плотной соединительной тканью (рис. 2, а, в). Новообразованная хрящевая ткань формируется лишь в области субхондральной кости в результате ее повреждения и лентовидными структурами отрастает от краев дефекта. В опыте дефект суставного хряща почти полностью заполнен новообразованным гиалиновым хрящом с гладкой поверхностью (см. рис. 2, б, г), который растет не только от субхондральной кости, но и, главным образом, от краев дефекта, где располагаются изогенные группы клеток, что свидетельствует о пролиферативной активности хондроцитов.

Поверхность новообразованного гиалинового хряща приобретает свойственный суставному хрящу интактных животных блеск. Клеточная

популяции хрящевого регенерата представлена в основном пролиферирующими хондроцитами, его строение еще не имеет характерной для суставного хряща специфичности. Содержание НСГАГ и СГАГ через 30 сут после операции в дефекте и опыте более чем в 2 раза превосходит контрольные показатели, но между собой значимо не различается, тогда как через 60 сут СГАГ преобладают, что свидетельствует о более высокой степени зрелости новообразованной хрящевой ткани (см. таблицу), достигающей степени зрелости, свойственной суставному хрящу у интактных животных.

Обсуждение полученных данных. Известно, что зрелый гиалиновый хрящ обладает незначительным потенциалом восстановления вследствие низкой плотности расположения клеток и малой митотической активности хондроцитов [9, 14]. Крупные дефекты суставного хряща замещаются биомеханически неполноценным волокнистым хрящом с последующим развитием остеоартрита [10]. Появление методов тканевой инженерии предоставило альтернативные возможности для лечения таких пациентов

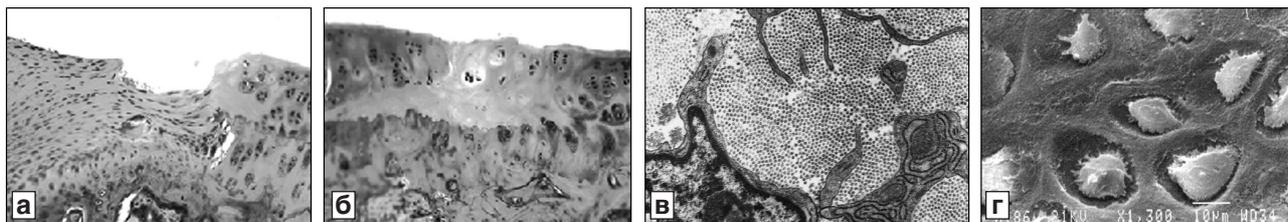


Рис. 2. Зона дефекта хряща коленного сустава крыс через 60 сут после операции.

а, в — контроль, дефект замещен волокнистой соединительной тканью; б, г — опыт, дефект заполнен новообразованным гиалиновым хрящом. а, б — световая микроскопия; в — трансмиссионная электронная микроскопия; г — сканирующая электронная микроскопия. а, б — окраска гематоксилином — эозином. а, б — об. 10, ок. 10; ув.: в — 5000; г — 1300

путем применения клеточной терапии в сочетании с синтетическими заменителями внеклеточного матрикса и биологически активными факторами для функциональной замены суставного гиалинового хряща [11–13]. Проведенные исследования показали, что гранулы МКМ при имплантации в зону дефекта суставного хряща, выявляющиеся во все сроки последующего наблюдения, оказывают хондромодулирующее действие, пролонгированно активизируют репаративный хондро- и остеогенез. В зоне повреждения суставного хряща в ранние сроки формируется регенерат, приобретающий клеточную специфику гиалинового хряща, образуется целостное хрящевое покрытие, постепенно выравниваются нарушенные контуры суставной поверхности, что приводит к полному или частичному восстановлению функциональной активности сустава. Свойства хондро- и остеоиндуктора имплантационным гранулам МКМ обеспечивают содержащиеся в них факторы роста и костные морфогенетические белки, которые выделяются при остеокластической резорбции [1, 8].

Таким образом, проведенные исследования показали, что применение имплантата из гранулированного МКМ в качестве стимулятора хондро- и остеогенеза и корректора деструктивных нарушений в костной и хрящевой ткани при повреждениях суставного хряща представляется теоретически обоснованным и перспективным и указывают на возможность использования МКМ в клинической практике при лечении повреждений и заболеваний суставного хряща.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Деев Р.В., Исаев А.А., Кочиш А.Ю., Тихилов Р.М. Пути развития клеточных технологий в костной хирургии // Травматол. ортопед. России. 2008. Т. 47, № 1. С. 65–74.
2. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей // Вопр. реконструкт. пластич. хир. 2003. № 4. С. 34–36.
3. Ирьянов Ю.М., Ирьянова Т.Ю. Рентгеновский электронно-зондовый микроанализ в количественной гистохимии // Морфол. ведомости. 2010. № 3. С. 77–81.
4. Ирьянов Ю.М., Ирьянова Т.Ю. Остеопластическая эффективность минерализованного костного матрикса // Морфология. 2013. Т. 143, вып. 1. С. 63–68.
5. Лысенко Л.Н. Биоматериаловедение: вклад в прогресс современных медицинских технологий // Клет. трансплантол. и тканевая инженерия. 2005. № 2. С. 56–61.

6. Патент РФ № 2478394. Биоматериал для возмещения дефектов костей и способ его получения / Ю.М.Ирьянов, Т.Ю.Ирьянова. Заявка от 23.11.2011 г. Опубл. в БИ. 2013. № 10.
7. Шишацкая Е.И. Клеточные матриксы из резорбируемых полигидроксиалканоатов // Клет. трансплантол. и тканевая инженерия. 2007. Т. 2, № 2. С. 68–75.
8. Bessa P.C., Casal M., Reis R.L. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery) // J. Tissue Eng. Regen. Med. 2008. Vol. 2. P. 81–96.
9. Brown T.D., Johnston R.C., Saltzman C.L. et al. Posttraumatic osteoarthritis: a first estimate of incidence, prevalence, and burden of disease // J. Orthop. Trauma. 2006. Vol. 20. P. 739–744.
10. Buckwalter J.A. Articular cartilage injuries // Clin. Orthop. Relat. Res. 2002. Vol. 402. P. 21–37.
11. Danisovic L., Varga I., Zamborsky R., Bohmer D. The tissue engineering of articular cartilage: cells, scaffolds and stimulating factors // J. Exp. Biol. Med. 2012. Vol. 237, № 1. P. 10–17.
12. Duguay N., Petite A., Arnaud E. Biomaterials and osseous regeneration // Ann. Chir. Plast. Esthet. 2000. Vol. 45, № 3. P. 364–376.
13. Eberli D., Atala A. Tissue engineering using adult stem cells // Methods Enzymol. 2006. Vol. 420. P. 287–302.
14. Strehl R., Tallheden T., Sjogren-Jansson E. et al. Long-term maintenance of human articular cartilage in culture for biomaterial testing // Biomaterials. 2005. Vol. 26. P. 4540–4549.

Поступила в редакцию 10.03.2014

#### THE EFFECT OF IMPLANTATION OF MINERALIZED BONE MATRIX ON THE REGENERATION OF ARTICULAR CARTILAGE

Yu.I. Iryanov<sup>1</sup>, N.A. Kiryanov<sup>2</sup>, O.V. Diuriagina<sup>1</sup>

The peculiarities of regeneration of knee articular cartilage were studied experimentally in adult Wistar rats (n=25) using the methods of optical and electron microscopy, histochemistry and x-ray electron probe microanalysis after modeling marginal perforated defect and implantation of granulated mineralized bone matrix (MBM) into the damaged zone. This biomaterial was demonstrated to have marked chondroinductive properties, to provide prolonged activation of reparative process, accelerated organotypical remodeling and restoration of the damaged articular cartilage. The data obtained indicate the possibility of MBM application in clinical practice for the treatment of injuries and diseases of the articular cartilage.

**Key words:** articular cartilage, bone matrix mineral component, implantation, reparative chondrogenesis

<sup>1</sup> Laboratory of Morphology, Russian G.A. Ilizarov Scientific Center of Restorative Traumatology and Orthopaedics; <sup>2</sup> Department of Pathological Anatomy, Izhevsk State Medical Academy