

**О перспективах использования наноматериалов
в лечении повреждений и заболеваний тканей
опорно-двигательной системы**

**В.И. Шевцов, Е.А. Волокитина, С.Н. Лунева, О.Л. Гребнева, М.А. Ковинька,
И.А. Талашова, М.В. Стогов, А.Н. Накоскин, Т.А. Силантьева, Н.А. Кононович,
Н.В. Петровская, Е.А. Ткачук, А.Г. Гасанова, А.А. Еманов, А.И. Гайдышев**

***Scopes for nanomaterial use in treatment of the injuries and
diseases of the locomotor apparatus tissues***

**V.I. Shevtsov, E.A. Volokitina, S.N. Luniova, O.L. Grebneva, M.A. Kovinka,
I.A. Talashova, M.V. Stogov, A.N. Nakoskin, T.A. Silantiyeva, N.A. Kononovich,
N.V. Petrovskaya, E.A. Tkachuck, A.G. Gasanova, A.A. Yemanov, A.I. Gaidyshev**

Федеральное государственное учреждение
«Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. академика Г. А. Илизарова Росмедтехнологий», г. Курган
(генеральный директор — заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАМН, д.м.н., профессор В.И. Шевцов)

Представлены материалы исследований по конструированию наноматериалов различной тканевой направленности, проводимых в ФГУ «РНЦ «ВТО» им. академика Г.А. Илизарова».

Ключевые слова: наноматериалы, костная ткань, репаративный остеогенез.

The materials of the studies on engineering nanomaterials for different tissues, performed at RISC "RTO" are presented in the work.

Keywords: nanomaterials, bone tissue, reparative osteogenesis.

Болезни опорно-двигательной системы занимают третье место в структуре всех заболеваний у детей и взрослых. В связи с учащением травматизма, а также случаев массовых катастроф и локальных конфликтов возросло количество тяжелых повреждений опорно-двигательной системы, зачастую приводящих к временной или постоянной инвалидности. С целью сокращения сроков и повышения эффективности лечения больных с различными видами повреждений и заболеваний органов опорно-двигательной системы сотрудниками Центра ведутся исследования по конструированию наноматериалов различной тканевой направленности [2, 4, 5].

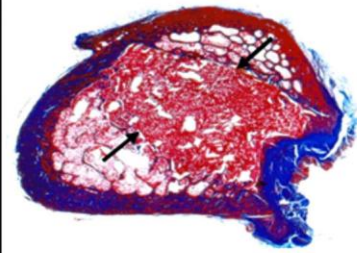
Одним из направлений является работа по созданию имплантационных наноматериалов для возмещения костных дефектов [3]. В результате исследований были разработаны три схемы получения кальцийфосфатных соединений (КФС) из костной ткани животных (КФС I, II и III), представляющих собой порошкообразные смеси [6, 7]. Гранулы смеси имеют неправильную форму, острые грани и плотную шероховатую поверхность, их диаметр составляет от 100 до 500 мкм. Проведенное элементное картирование с использованием метода рентгеновского электронно-зондового микроанализа выявило однородное распределение остеотропных элементов в составе гранул.

В представленных ниже экспериментах использовали композиционные материалы на основе КФС с включением органической составляющей костного матрикса (ОМ) и сывороточных полипептидов (СБ). Полученными композиционными материалами заполняли дырчатые дефекты в проксимальном метафизе большеберцовой кости и плеча экспериментальных животных. К 6-й неделе эксперимента в контрольной группе полости дефектов перекрывали тени, оптическая плотность которых приближалась к плотности мягких тканей (рис. 1). Края дефектов были сглажены. При использовании имплантационных материалов полости дефектов слабо определялись.

Результаты экспериментов показали, что сочетание КФС с сывороточными полипептидами улучшает васкуляризацию регенерата, ослабляет иммуногенные и повышает остеокондуктивные свойства минерального компонента и активизирует репаративный остеогенез, что особенно ярко выражено в случае применения КФС I. Было установлено, что полученные нами имплантационные наноматериалы являются биodeградируемыми, гранулы минерального компонента обладают остеокондуктивными свойствами, а порошкообразная часть подвергается деградации без выраженной воспалительной реакции, что подтверждается морфологическими, биохимическими и гематологическими исследованиями.

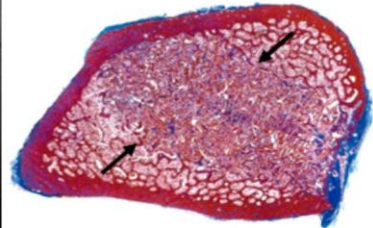
Без имплантации

заполнение области дефекта ретикулофиброзной губчатой костной тканью



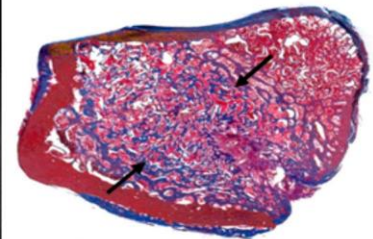
КФС I+СБ+ОМ

зрелая губчатая костная ткань с пластинчатыми трабекулами и компактизирующейся корковой пластинкой



КФС II+СБ+ОМ

незрелая губчатая костная ткань с фрагментами слабо васкуляризированной рыхлой волокнистой соединительной ткани



КФС III+СБ+ОМ

преимущественно неоформленная волокнистая соединительная ткань

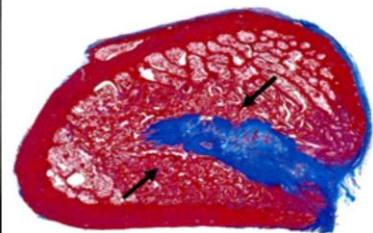


Рис. 1. Рентгенограммы и гистотопографические целлоидиновые срезы (окраска по Массону) проксимального метафиза большеберцовой кости собак на 6-й неделе после создания дефекта

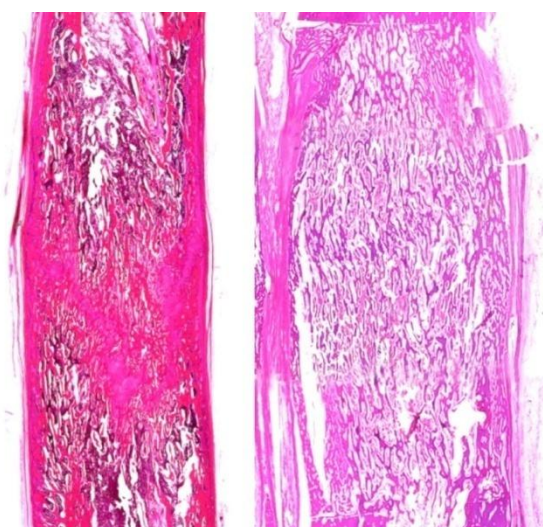
Для дальнейшего конструирования наноматериалов нами были поставлены эксперименты с использованием кислоторастворимых компонентов фетальной костной ткани (ФК) животных в качестве стимуляторов репаративного остеогенеза. Выделение ФК включало в себя ряд препаративных процедур, включающих экстракцию, высаливание, фильтрацию, диализ, лиофильное высушивание, стерилизацию. Раствор ФК вводили в зону роста регенерата по окончании дистракции при проведении остеосинтеза по Илизарову.

Анализ рентгенограмм показал, что в опытной серии регенерат имел гомогенную структуру с непрерывной корковой пластинкой (рис. 2).

Морфологические исследования показали, что введение в соединительнотканную прослойку дистракционного регенерата компонентов из фетальных тканей приводит к более раннему замещению прослойки, более быстрому развитию перестроечных процессов в регенерате, формированию кортикальной пластинки (рис. 3). Введение раствора ФК способствовало резкому сокращению сроков созревания регенерата: в контрольной группе период фиксации составлял от 45 до 60 суток, тогда как в экспериментальной – от 7 до 29 суток.



Контроль. Конец дистракции Опыт. Конец дистракции Опыт. Фиксация 7 суток Контроль. Фиксация 30-45 суток
Рис. 2. Рентгенограммы собак с введением в регенерат кислоторастворимых компонентов фетальной костной ткани (опыт)



Контроль Опыт
Рис. 3. Гистотопограммы дистракционных регенератов собак с введением в регенерат кислоторастворимых компонентов фетальной костной ткани (опыт)

Следующее направление в создании наноматериалов – исследование активирующего влияния полипептидных компонентов (ПК) плазмы крови на репаративный остеогенез.

Первоначально нами было исследовано действие ПК, выделенных из плазмы крови животных в период дистракции с помощью последовательного применения процедур высаливания, гель-фильтрации, диализа, лиофилизации и стерилизации. Полученный раствор полипептидных компонентов плазмы крови вводили в соединительнотканную прослойку дистракционного регенерата животных-реципиентов после окончания периода дистракции при проведении остеосинтеза по Илизарову. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор. Балльная экспертиза рентгеновских снимков, учитывающая величину поперечника регенерата, высоту соединительнотканной прослойки, ее

пересечение и замещение трабекулярными теньями, формирование корковой пластинки, костномозговой полости и оптическую плотность регенерата показала достоверно более высокие темпы созревания структур регенерата в опытной группе животных, что было подтверждено компьютерной денситометрией рентгенограмм (рис. 4). Через 3 недели фиксации в контрольной группе площадь среднеминерализованной части регенерата составляла 63 %, тогда как в опытной – 75 %. Эксперименты доказали, что роль компонентов плазмы крови заключается в увеличении количества очагов минерализации регенерата и ускорении темпов его созревания.

Способ был применен в клинике у 20 больных, которым проводили удлинение конечностей методом полилокального полисегментарного остеосинтеза. Компоненты аутоплазмы после прекращения дистракции вводили в соединительнотканную прослойку дистального регенерата. Было обнаружено, что темпы минерализации дистального регенерата превышали таковую в нестимулированном фрагменте (рис. 5).

Еще одним направлением наших исследований является изучение возможности коррекции дегенеративных и дистрофических процессов в ткани хряща. Нами было обнаружено, что низкомолекулярные полипептиды (НП) экстракта костной ткани, обладающие гипогликемическими свойствами, при внутрибрюшинном введении экспериментальным животным способны тормозить пролиферативную активность хондроцитов (рис. 6). Доказано уменьшение количества пролиферирующих хондроцитов и числа двух- и четырехчленных экзогенных групп клеток. Выключение хондроцитов из пролиферативного цикла сопровождалось ускорением их цитодифференцировки и возрастанием биосинтетической активности. Это приводило к приросту высоты суставного хряща после введения НП.

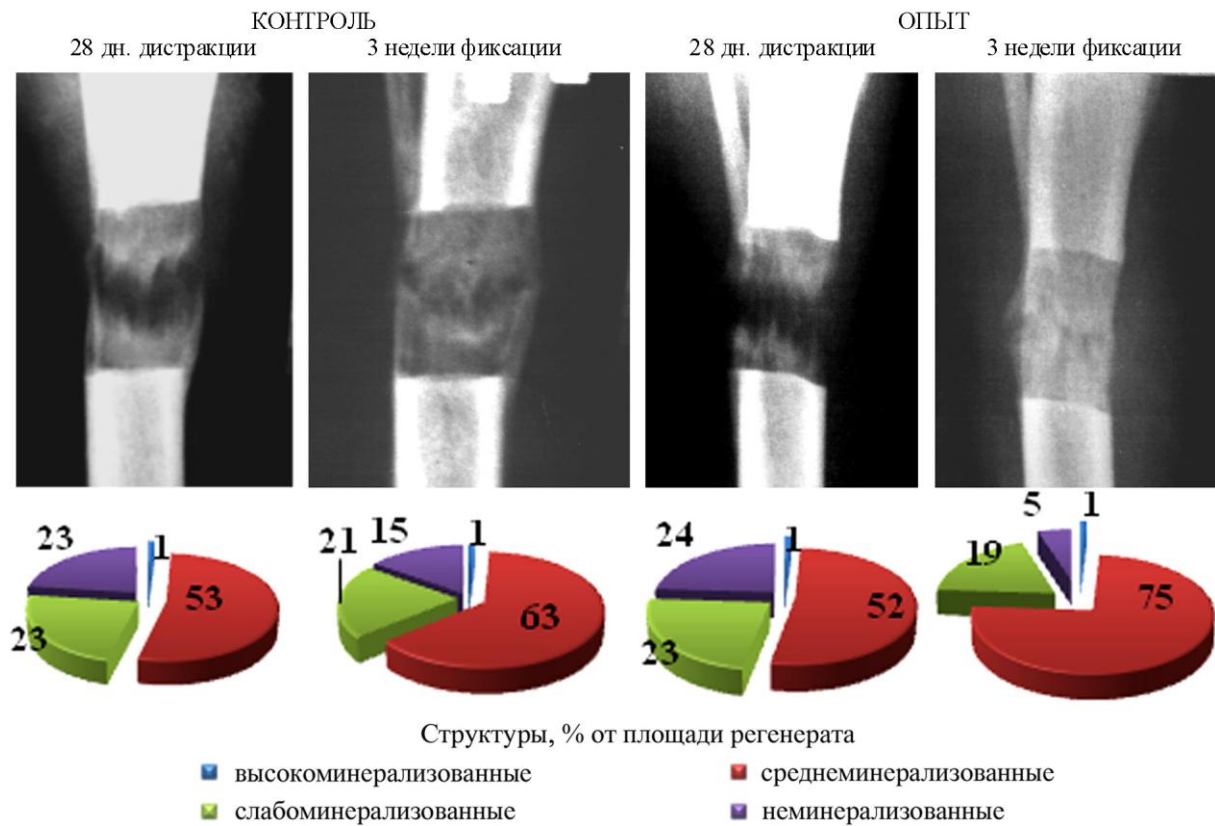


Рис. 4. Оценка минерализованных структур костного регенерата у собак с введением полипептидных компонентов плазмы крови в соединительнотканную прослойку distractionного регенерата

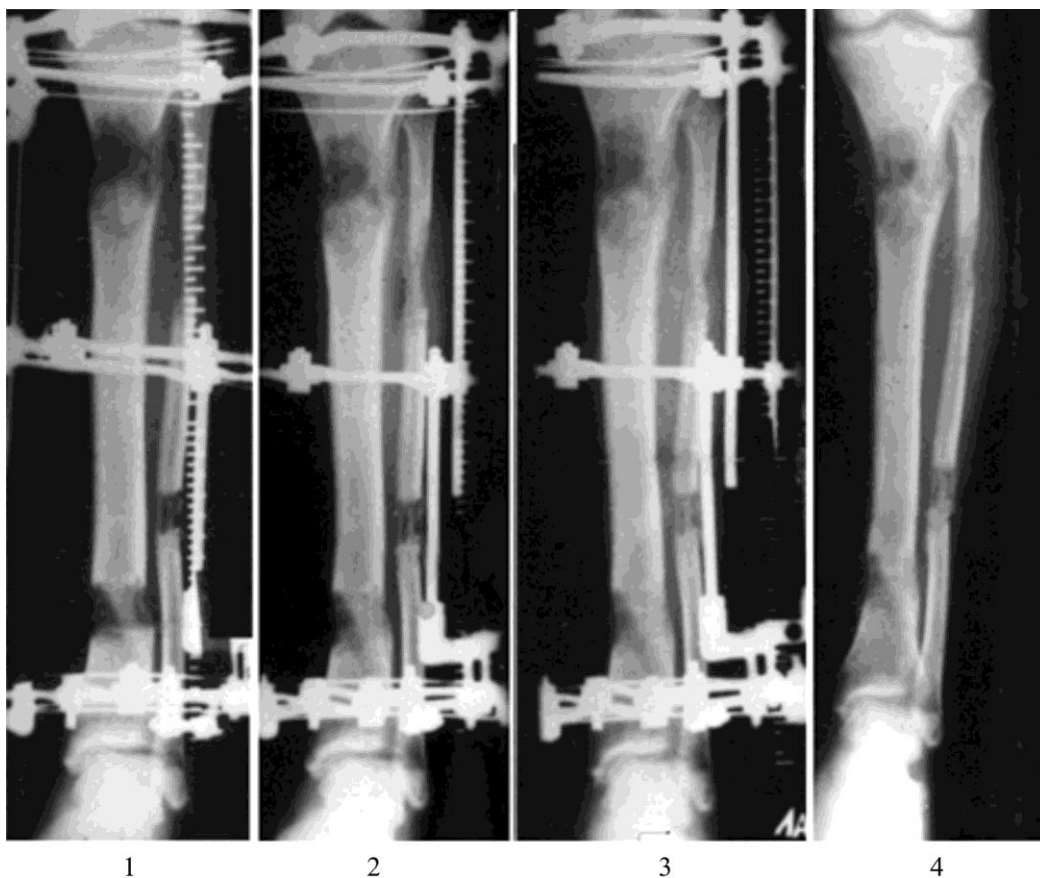


Рис. 5. Рентгенограммы пациента с введением в соединительнотканную прослойку дистального регенерата модифицированной аутоплазмы: 1 – перед введением компонентов плазмы крови, 2 – 1 неделя после введения ПК, 3 – 2 месяца фиксации, 4 – после снятия аппарата

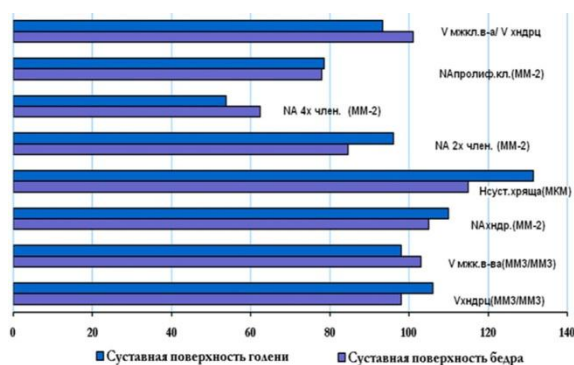


Рис. 6. Изменения в суставном хряще мышей после внутрибрюшинного введения низкомолекулярных белков костной ткани

Эффективность НП исследовали на животных, которым моделировали начальные стадии остеоартроза коленного сустава. Было показано, что применение НП в виде внутриартикулярных инъекций восстанавливает механические свойства суставного хряща. Восстановление структуры и химического состава матрикса хряща сопровождалось изменением состава гликозаминогликанов и количественным перераспределением фракций протеогликанов. Нам представляется особенно важным достижением восстановление доли высокоагрегированных протеогликанов, прочно связанных с коллагеном.

В последующих экспериментах изучали действие низкомолекулярных полипептидов из плазмы крови (НПК), аналогичных костным по физико-химическим свойствам. Было обнаружено, что внутриартикулярное введение НПК также вызывало выключение хондроцитов из пролиферативного цикла, что сопровождалось ускорением их цитодифференцировки и возрастанием биосинтетической активности. Это приводило к приросту высоты суставного хряща в среднем на 20 %. Данные морфометрии были подтверждены результатами сонографических исследований (рис. 7).

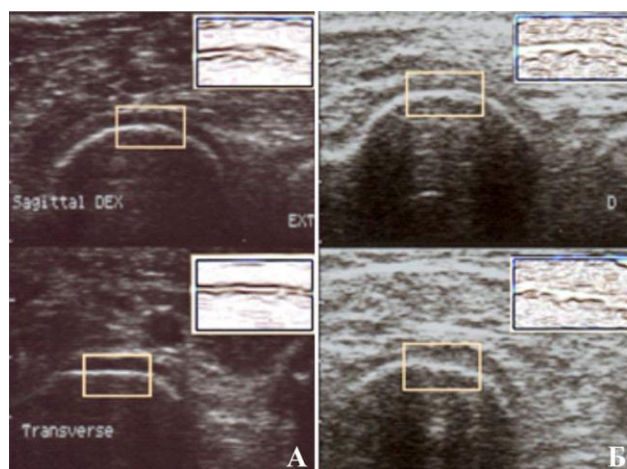


Рис. 7. Сонограмма коленного сустава со II стадией остеоартроза до (А) и после (Б) внутриартикулярного введения препарата на основе аутоплазмы крови

Одним из актуальных, но мало разработанных направлений, проводимых в центре, является поиск материалов, способных корригировать метаболические изменения скелетных мышц при лечении костной патологии. Первоначально нами обнаружено, что патологические сдвиги в скелетных мышцах удлиняемой конечности связаны с активацией процессов анаэробной генерации энергии и интенсификацией перекисного окисления [1]. При этом обменные процессы в мышцах удлиняемой и контралатеральной конечностях имели сходные изменения метаболических реакций. Однако дальнейшие исследования позволили обнаружить, что скелетные мышцы обладают значительной гибкостью молекулярных механизмов энергообмена. Так, в условиях повышенного темпа distraction (3 мм/сут) нами обнаружен феномен активации «резервного» механизма энергообеспечения ткани – пентозофосфатного пути окисления (рис. 8).

Значительные изменения происходят и в сократительном аппарате мышц. Нами было обнаружено, что в удлиняемых скелетных мышцах изменяются кинетические свойства основного сократительного белка – миозина, что показано на графике двойных обратных величин для миозиновой АТФ-азы скелетных мышц быстрого и медленного типов (рис. 9).

Оказалось, что константа Михаэлиса миозина в удлиняемых мышцах выше, чем в интактных. Таким образом, кинетические характеристики миозина в условиях дозированного удлинения мышц изменялись в направлении снижения сродства к АТФ. Полученные результаты являются основанием для направленного воздействия на метаболические звенья скелетных мышц, нуждающиеся в коррекции. Перспективным направлением здесь также является использование липосомных наночастиц, обеспечивающих точечную доставку биологических активных веществ в мышечную ткань.

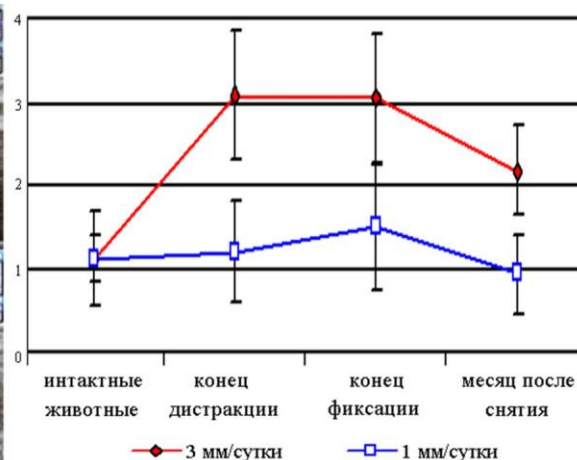


Рис. 8. Изменение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (мккат/мг белка) в передней большеберцовой мышце удлиняемой конечности собак при различных режимах удлинения

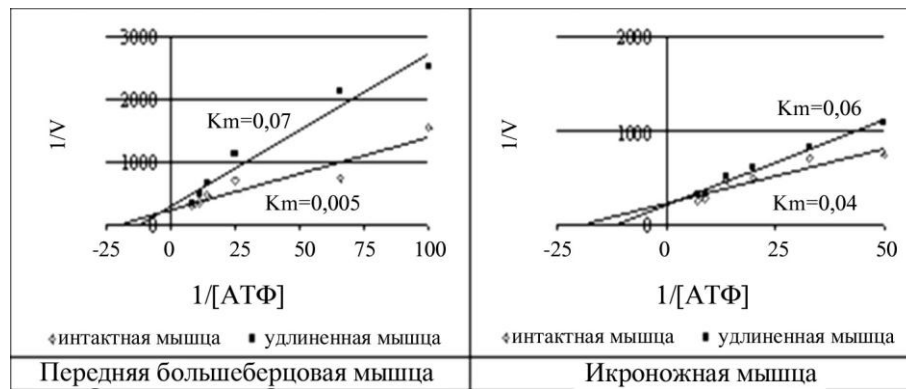


Рис. 9. Кинетические кривые (обратные координаты) миозина мышц различного типа интактной и удлинненной конечности

ЛИТЕРАТУРА

1. Биохимические исследования сыворотки крови и скелетных мышц при удлинении голени аппаратом Илизарова с темпом distraction 3 мм в сутки в автоматическом режиме / С. А. Ерофеев [и др.] // Вестн. новых мед. технологий. – 2005. - № 3-4. – С. 89-91.
2. Гребнева, О. Л. Влияние остеоиндуктивных компонентов плазмы крови на гематологические показатели у мышей / О.Л. Гребнева, М. А. Ковинька, С. П. Изотова // Гений ортопедии. – 2005. - № 3. – С. 58-61.
3. Имплантационные кальцийфосфатные материалы / В. И. Шевцов [и др.] // Мед. наука и образование Урала. – 2008. - № 2. - С. 105-107.
4. Конструирование фармпрепаратов из костной ткани для коррекции осложнений при вмешательстве на скелете : материалы симпозиума «Регенерация и рост тканей в условиях дозированного растяжения» / К. С. Десятниченко [и др.] // Гений ортопедии. – 1996. - № 2-3. – С. 130-131.
5. Костные рострегулирующие факторы – гуморальные регуляторы остеогенеза и кроветворения / О. Л. Гребнева [и др.] // Гений ортопедии. – 1997. - № 4. – С. 15-19.
6. Пат. 2193868 Российская Федерация, МПК⁷ А 61 В 17/56, А 61 Р 5/50. Способ стимуляции репаративного остеогенеза / Десятниченко К. С., Ларионов А. А., Гребнева О. Л., Ерофеев С. А., Ковинька М. А., заявитель и патентообладатель РНЦ «ВТО» им. акад. Г. А. Илизарова. - № 98105940/14 ; заявл. 26.03.1998 ; опубл. 10.12.2002, Бюл. № 34.
7. Пат. 2311167 Российская Федерация, МПК⁷ А 61 К 6/033, 35/32, 38/01. Биоимплантат для возмещения дефектов минерализованных тканей и способ его получения / Шевцов В. И., Талашова И. А., Лунева С. Н., Ковинька М. А., заявитель и патентообладатель РНЦ «ВТО» им. акад. Г. А. Илизарова. – № 2005100254 ; заявл. 11.01.2005 ; опубл. 27.11.2007, Бюл. № 33.

Рукопись поступила 18.12.06.