

РАЗРАБОТКА БИОМАТЕРИАЛОВ для остеопластики на основе коллагена костной ткани

С.Ю.Иванов

• д.м.н., профессор, декан стоматологического факультета МГМСУ, зав. кафедрой факультетской хирургической стоматологии и имплантологии МГМСУ, г. Москва

Е.В.Ларионов

• ведущий научный сотрудник, зам. Генерального директора ООО «НПК ВИТАФОРМ-Р», г. Москва

А.М.Панин

• д.м.н., профессор кафедры факультетской хирургической стоматологии и имплантологии МГМСУ, г. Москва

В.М.Кравец

• Генеральный директор ООО «НПК ВИТАФОРМ-Р», г. Москва

С.И.Анисимов

• к.м.н., Генеральный директор ООО «Трансконтакт», г. Москва

Д.Н.Володина

• аспирант кафедры факультетской хирургической стоматологии и имплантологии МГМСУ, г. Москва

Восстановление костной ткани является одной из важнейших проблем в реконструктивной хирургии различных опорно-двигательных систем организма, в частности — в стоматологии [1].

Современные исследования в области биохимии, патофизиологии остеогенеза и остеорепарации костной ткани показали, что в основе понимания процессов восстановления костных дефектов ведущую роль играют механизмы моделирования и ремоделирования экстрацеллюлярного матрикса костной ткани, в частности — коллагена и сульфатированных гликозаминогликанов [19, 20].

Известно, что репарация костной ткани начинается сразу после повреждения и проходит несколько стадий [21].

В первой фазе происходят процессы заполнения костного дефекта фибрино-эпителиальной пробкой и фиброваскулярной тканью [3]. В рану поступают полиморфонуклеары — макрофаги, лимфоциты и клетки лейкоцитарного ряда. Фибрин формирует провизорный матрикс кровяного сгустка для агрегации тромбоцитов, активация которых приводит к стимуляции факторов роста — фактора роста соединительной ткани (CTGF), фактора роста фибробластов (FGF), трансформирующего фактора роста (TGF β) и т.д. Эти сигнальные молекулы, в свою очередь, образуют активные комплексы со свободными сГАГ, которые появляются в дефекте или зоне повреждения [10, 13, 23]. Такие комплексы способны связываться с интегринами, рецепторами мембран клеток, активирующих их пролиферацию и способствующих процессу репарации. Показано, что в первые 7-14 дней после повреждения активные комплексы

фактор роста — сГАГ способны активировать рост фибробластов, перицитов, стимулируя развитие сосудистой сети и периостальных клеток. Роль коллагена на этой фазе репарации заключается в формировании первичного каркаса или провизорного матрикса, и таким образом стимулируется формирование первичной костной мозоли [6,16]. Эта первая стадия достигает своего завершения в течение 7-14 дней.

Повреждения (различного вида травмы), воспаление (пародонтит) или механические стимулы ускоряют процессы обмена в клетках костной ткани. Ремоделирование (обновление) начинается с приема сигналов группой выстилающих клеток или остеоцитов, в результате чего начинается резорбция костной ткани остеокластами, продолжающаяся от 2 до 4 недель. Вслед за резорбцией происходит образование костной ткани остеобластами (моделирование), которое длится от 3 до 4 месяцев [15, 17].

Этот процесс характеризуется секрецией остеообластами коллагена типа I и важнейшими маркерами остеобластической активности, к которым относятся: щелочная фосфатаза, остеокальцин или gla-белок, костный сиалопротеин, остеоопонтин, остеоонектин. Другие белки, продуцируемые остеобластами, в том числе декорин и бигликан, выделенные из костного матрикса, не являются костноспецифическими, хотя и играют важную роль в костном обмене [20].

Третья фаза остеорепарации включает стадию минерализации костного или коллагенового матрикса. Результатом процесса моделирования является создание минерализованного костного матрикса — уникальный секреторный продукт, который создается на базе неминерализованного матрикса, посредством многофазного депонирования секретированных белков, которые практически все в нем определяются [22, 25].

По современным данным на этой стадии происходит осаждение солей фосфатов кальция из плазмы крови. Считают, что это молекулы $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (трикальций фосфат) и $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (тетракальций фосфат). Процесс их осаждения создаёт дальнейшие условия для формирования окончательной кристаллизации и отложения гидроксиапатита. Эта фаза репарации кости может быть растянута во времени до нескольких месяцев [18, 20].

По окончании фазы минерализации структурированный коллаген костной ткани формирует пласти костной ткани различной зрелости.

В результате процесса минерализации основной структуры костного матрикса — коллагена — возникает надструктура — минеральный остов, придающий костной ткани опорно-механические свойства.

Таким образом, остеорепарация является динамическим биологическим процессом, который включает в себя все фазы и стадии образования кости.

Процесс остеорепарации заканчивается ремоделированием через 1-1,5 года после операции или травматического повреждения [17].

Из сказанного видно, что ведущая роль в фор-

мировании остова костной ткани принадлежит коллагену, который синтезируется практически одновременно с другими компонентами матрикса [21].

Коллаген составляет около 90% органического матрикса кости. В костной ткани представлен только коллаген типа I, который имеет меньше поперечных связей, чем в других видах соединительной ткани [12].

В построении коллагеновых волокон, их поперечном связывании ключевую роль играют протеогликаны [4, 24]. Функциональной частью (95-97%) протеогликанов являются сульфатированные гликозаминогликаны (сГАГ)— хондроитин сульфат, дерматан сульфат, гепаран сульфат и адгерина кератан сульфат [5, 29].

Известно, что определенные дефекты костной ткани или ее возрастная утрата, патологические состояния не могут быть устранены путем ее физиологической регенерации или благодаря простому хирургическому вмешательству [1]. В таких случаях для восстановления ткани, как правило, применяются биоматериалы или их синтетические аналоги, способные либо механически выполнять функции кости, либо оказывать индуцирующее влияние на процессы регенерации [7].

В стоматологической практике при замещении костных дефектов наиболее часто используют процедуру аутотрансплантации костной ткани из подбородочной области или из области подвздошного гребня [1, 7].

К недостаткам этого “золотого” стандарта следует отнести ограниченные возможности забора большого количества материала, дополнительную травму здоровых тканей, которая может потребовать замещения полученного дефекта. Кроме того, возможности получения значительных количеств аутоматериала весьма ограничены, и при его заборе, как правило, донор подвергается серьезным оперативным вмешательствам. Все это существенно ограничивает широкое применение аутотрансплантатов [28].

Применение аллокости при замещении костных дефектов также имеет ограничения по цене донорского материала, частой контаминации материала инфекционными агентами и низкому проценту приживления.

Широкое применение в качестве материала для восстановления костных дефектов получила деминерализованная аллокость.

Исследования, проведенные M.R.Urist, показали наличие остеоиндуктивных свойств деминерализованной костной ткани, что проявляется в более быстром восстановлении костной ткани при пластике стандартного дефекта по сравнению с другими видами аллокости, а при его эктопической подсадке в мягкие ткани — в индукции формирования костной ткани [27]. Присутствующий в деминерализованной аллокости костный морфогенетический протеин влияет на дифференцировку остеогенных клеток-предшественников в остеобласты и тем самым может оказывать остеоиндуктивное действие [30].

Однако такой материал должен находиться в условиях специализированного донорского костного банка для изготовления и хранения его, что



доступно только очень крупным медицинским учреждениям из-за высокой стоимости.

В 70-х годах прошлого столетия были впервые получены данные о влиянии коллагеновых имплантатов на репарацию костной ткани. При этом было установлено, что коллагеновые имплантаты способствуют пролиферации фибробластов, васкуляризации близлежащих тканей и, по-видимому, индуцируют формирование новой костной ткани с последующей ее перестройкой [22]. В качестве быстро биодеградирующего материала коллаген был применен и в виде геля при восстановлении костных дефектов [11]. Полученные данным автором результаты также позволили предположить, что препараты на основе коллагена способны стимулировать регенерацию костной ткани.

Обоснованием к применению коллагена как биопластического материала послужили работы I. Yannas и сотрудников по исследованию растворимого коллагена кожи с/х животных в смеси с сГАГ, с целью получения покрытия для лечения ожогов [31, 32].

В России его широкое применение в практической медицине связано с развитием реконструктивной хирургии и поиском новых материалов, выполняющих каркасную и пластическую функции при регенерации тканей. Источниками получения коллагена при изготовлении изделий для пластической хирургии служат ткани богатые этим белком — кожа, сухожилия, перикард и костная ткань [2].

К основным достоинствам коллагена как пластического биоматериала следует отнести

его низкую токсичность и антигенность, высокую механическую прочность и устойчивость к тканевым протеазам.

При создании биоматериалов используется принцип биоинженерной реконструкции, или воссоздания материала с исходными характеристиками нативного, но лишённого отрицательных свойств последнего [11, 25, 27].

Выделение коллагенов из нативных тканей осуществляется, как правило, путем растворения этих тканей кислотнo-щелочным способом [2]. Таким образом получают коллагены кожи или перикарда, которые растворяются в кислотах и щелочах с образованием гелей с различной вязкостью. Все связи в волокнах и фибриллах (как внутри, так и межмолекулярные) разрушаются, сами волокна коллагена при этом раскручиваются и утрачивают свою поперечную исчерченность. Такие коллагены называют растворимыми, или солюбилизованными. Коллагеновые пористые губки получают путем лиофилизации растворов коллагена.

При изготовлении изделий из растворимых коллагенов приходится восстанавливать (сшивать) как межмолекулярные связи в волокнах, так и концевые связи, которые разрушаются в процессе получения коллагенов [11].

К недостаткам таких коллагенов следует отнести их набухаемость после высушивания и помещения в растворы или при имплантации в ткань реципиента. Поэтому, чтобы устранить все «недостатки» растворения коллагенов, прибегают к методу их сшивки. В качестве «сшивателя»

часто используют глутаровый альдегид [14, 31]. Такой метод позволяет повысить его биосовместимость и снизить биодеградацию.

Являясь, как и другие белки, амфотерным полиэлектролитом и имея в своей структуре свободные активные сайты и радикалы, коллаген способен образовывать ионные связи при большом диапазоне pH [2].

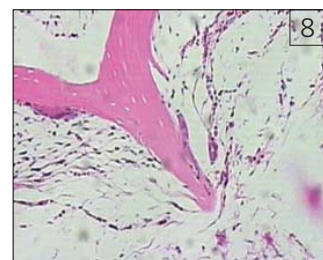
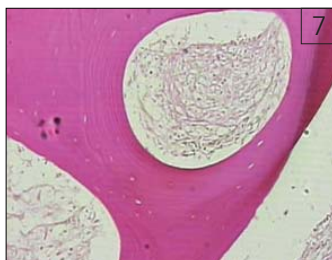
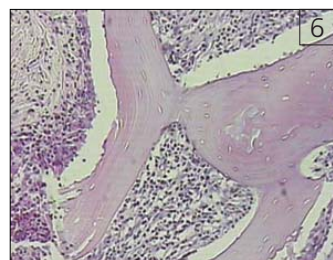
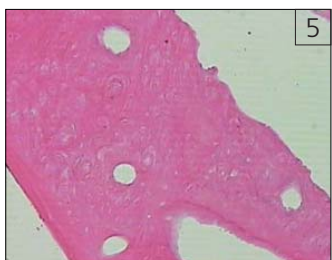
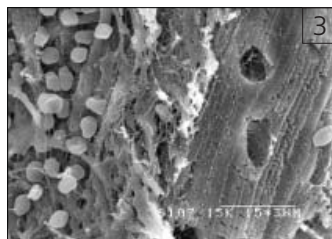
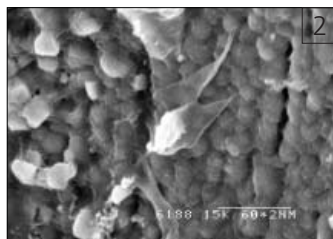
Функциональные возможности коллагена определяются также его способностью связывать сГАГ, что значительно повышает его устойчивость к биодеградации, вероятно, за счет создания дополнительных межмолекулярных сшивок [4].

Как показали наши более ранние экспериментальные и клинические исследования, наиболее оптимальным материалом для замещения костных дефектов является нерастворимый коллаген костной ткани в комплексе с сГАГ [1, 7].

Целью настоящей работы явилась разработка и внедрение новых технологий получения биоматериалов на основе коллагена костной ткани и сГАГ и их применение в хирургической стоматологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Учитывая анатомо-физиологические особенности строения и репарации костной ткани, а также современные потребности рынка в такого рода материалах, фирмой «НПК ВИТАФОРМ РР» совместно с МГМСУ на протяжении последних восьми лет проводятся исследования костного коллагена, насыщенного сГАГ, анализ которых привел к разработке технологии получения новых остеопластических материалов на основе костного деминерализованного



■ **Рис. 1.** Внешний вид недеминерализованного коллагена, изготовленного по технологии «ВИТАФОРМ-Р» и МГМСУ. Видна естественная пористость материала, структурированного костным минеральным компонентом

■ **Рис. 2.** Сканирующая электронная микроскопия недеминерализованного коллагена через 1 месяц после имплантации под кожу крысы. Видны линейно расположенные волокна коллагена, покрытые сферическими образованиями минерального компонента. На поверхности материала распластаны фибробласты с длинными отростками, погруженными в строму. У.н.10 ЭВ, напыление — золото-палладий

■ **Рис. 3.** Сканирующая электронная микроскопия недеминерализованного коллагена через 2 месяца после имплантации под кожу крысы. Недеминерализованный коллаген имеет характерную структуру губчатой кости. В левой части рис. виден сформировавшийся кровеносный сосуд с форменными элементами крови (эритроцитами). У.н.10 ЭВ, напыление — золото-палладий

■ **Рис. 4.** Внешний вид блоков деминерализованного коллагена. Видна пористо-ячеистая структура материала

■ **Рис. 5.** Гистологическая картина участка деминерализованного коллагена. Строма коллагена, лакуны и трабекулы свободны от клеток и других включений. Ув. — 140. Окраска — гематоксилин-эозин

■ **Рис. 6.** Гистологическая картина участка деминерализованного коллагена через 1 месяц после имплантации под конъюнктиву глаза кролика. Вокруг имплантата видна умеренная инфильтрация клетками. Явления воспаления и деструкция имплантата отсутствуют. Ув. — 140. Окраска — по Крейбергу

■ **Рис. 7.** Гистологическая картина участка деминерализованного коллагена через 2 месяца после имплантации под конъюнктиву глаза кролика. Явлений фиброза не отмечается. Коллагеновые волокна не деструктивированы, лакуны и трабекулы заполнены волокнистой тканью. Ув. — 200. Окраска — гематоксилин-эозин

■ **Рис. 8.** Гистологическая картина участка деминерализованного коллагена через 3 месяца после имплантации под кожу крысы. Фиброзное перерождения не отмечается. Коллагеновые волокна не деструктивированы, лакуны и трабекулы заполнены собственной тканью кожи. Имплантат хорошо интегрирован с окружающей тканью. Ув. — 200. Окраска — гематоксилин-эозин

и недеминерализованного коллагена костной ткани (Заявки на патенты RU №2005111015 и №2005111065 от 15.04.05).

Безопасность и эффективность материалов, в частности — биоматериалов на основе коллагенов, полностью обеспечивается контролем используемого сырья и технологией их получения. Поэтому для их получения используют костную ткань, полученную из хозяйств, благополучных по ветеринарному режиму, и прошедшую необходимый микробиологический контроль.

Разработка универсальной технологии обработки костной ткани, которая не зависит от источника ее получения, решает ряд вопросов, связанных с этическими или конфессиональными проблемами. Так, например, деминерализованный или недеминерализованный костный коллаген может быть получен из костной ткани свиней, быков, лошадей или аллокости.

К особенностям технологии получения материалов относятся поэтапный селективный процесс элиминации неколлагеновых белков (10% органического матрикса костной ткани) особо антигенных молекул и детерминант — белков, протеогликанов, гликопротеинов и липопротеинов, что делает данную технологию универсальной и позволяет очистить костную ткань полностью и независимо от источника ее получения.

На первых этапах технологии получения материала осуществляется первичная механическая очистка костей от сухожилий, мышц, остатков крови и т.п.

Далее производится поэтапная обработка костей по удалению белков, протеогликанов и гликопротеинов из трабекулярной кости, которые присутствуют в костномозговых синусах (8-9% неколлагеновых белков). Дальнейшая обработка кости приводит к их полному удалению из трабекул и синусов, при этом также удаляются белки и протеогликаны, непосредственно связанные с костным коллагеном. Все процедуры проводятся в условиях, препятствующих денатурации костного коллагена и не приводящих к его конформационным изменениям. Кроме того, на данных стадиях удаляются все возможные контаминации материала — микробами, прионами или какими-либо другими инфекционными агентами.

Технология производства включает анализ входящего сырья и промежуточных стадий контроля содержания белков и примесей в обрабатываемом материале. При этом используются современное оборудование и методы контроля.

Постадийный контроль производства биоматериалов во много раз снижает его антигенность, контаминацию микробами, прионами и другой патогенной флорой.

Данная технология отвечает основным требованиям (ГОСТ Р ИСО 9004-2001), которые предъявляются к условиям производства биоматериалов.

Получаемый по этой технологии коллаген костной ткани получают из трабекулярной кости (губчатая часть) в двух формах — недеминерализованный коллаген и деминерализованный коллаген, которые насыщаются сГАГ.

Трабекулярная часть кости выбирается с учетом ее анатомо-физиологических особенностей — различной степени пористости и более молодого строения коллагена (трабекулярная кость чаще ремоделирует по сравнению с кортикальной). В 99% случаев костные дефекты представляют собой дефекты губчатой части кости, так что дефект должен замещаться по подобию строения окружающей ткани.

Сохранность костной структуры в материалах

после проведения всех технологических процедур по их получению была изучена нами с помощью сканирующей электронной техники на микроскопе Cambridge Stereo-Scan (Англия).

Биосовместимость костного коллагена была оценена нами по стандартным тестам в условиях имплантации их под кожу крысам породы “Вистар” (10 животных) и под конъюнктиву глаз кроликов породы “Шиншилла” (10 животных) на сроки 1, 2 и 3 месяца. Животных вводили в наркоз путем внутримышечной инъекции 0,5 мл 5% р-ра Кетамина и 0,5 мл 2% р-ра Рометара и имплантировали кусочки материала. Животных вывели из эксперимента через 1, 2 и 3 месяца, согласно приказу МЗСР РФ, воздушной эмболией, следующим образом: после внутримышечной инъекции 0,5 мл 5% р-ра Кетамина и 0,5 мл 2% р-ра Рометара внутривенно и внутрисердечно вводили 20,0 мл р-ра Тиопентала натрия.

На эти сроки кусочки ткани иссекали блоками с имплантированным материалом и после этого готовили рутинные гистологические препараты. Препараты изучали и фотографировали на фотомикроскопе Mild-Leitz /Gemany/.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Недеминеализованный коллаген

Костный недеминерализованный коллаген губчатой кости имеет характерную пористо-ячеистую структуру, которая полностью соответствует архитектонике нативной губчатой кости (рис. 1).

С помощью метода сканирующей электронной микроскопии и гистоморфологического анализа было установлено, что костный недеминерализованный коллаген после двухмесячного пребывания в организме реципиента практически не подвергается разрушению и сохраняет свою структуру.

При этом сами волокна плотно упакованы в пучки второго порядка, без разрывов и дефектов. Снаружи волокна закрыты пористыми сферообразными образованиями минерального компонента, которые располагаются вдоль хода волокон с характерной периодичностью (рис. 2). Эти образования присущи структуре биоминерализованного костного волокна, после полной минерализации костного матрикса они придают костному коллагену дополнительную жесткость.

На имплантированном материале видны фибробласты, расплазненные по его поверхности, что свидетельствует о его адгезивных свойствах и биосовместимости.

На поверхности имплантата формируется незначительный фиброзный слой, а в самом имплантате отмечается присутствие небольшого количества клеточных элементов, основными из которых являются фибробласты. Эти результаты однозначно свидетельствуют о высокой устойчивости данного материала к биораспаду и о полной биоинертности в отношении него окружающей СТ.

Сохраненный биоминерализованный костный коллаген, насыщенный сГАГ, обладает способностью активировать рост сосудов, которые появляются в порах материала на 2-месячный срок после операции (рис. 3).

Такой биоминерализованный костный матрикс является более устойчивым к быстрому разрушению протеолитическими ферментами и надежно выполняет геометрию дефекта, а также придает материалу свойства активного рецепторного поля при имплантации в костные дефекты для взаимодействия с молекулами факторов роста и подавления реакции воспаления. Известно, что минеральный компонент костной ткани наиболее активно связы-

вает морфогенетические белки [27, 30].

По нашему мнению, имплантация такого комплекса в костные дефекты будет способствовать быстрой миграции клеток и васкуляризации имплантата, что в свою очередь создаст предпосылки для развития новой костной ткани в дефекте.

Деминерализованный костный коллаген

Характерной особенностью деминерализованного коллагена является его высокая эластичность и упругость по сравнению с известными аналогами, изготовленными из коллагенов, полученных из других источников.

Деминерализованный коллаген получают путем деминерализации костной ткани, из которой предварительно удалены все неколлагеновые белки, после чего данный материал насыщается сГАГ (рис. 4).

Гистоморфологические исследования структуры деминерализованного коллагена, насыщенного сГАГ, показали, что он имеет характерную структуру стромы губчатой кости, из которой удалены клетки, эндост и другие включения (рис. 5).

При имплантации такого материала под кожу крысам или под конъюнктиву глаза кролика гистоморфологическим методом было показано, что через 1 месяц после операции воспалительные реакции на него отсутствуют (рис. 6).


На срок 2 месяца имплантат не деградирует, волокна коллагена остаются без изменений (рис. 7). По периферии имплантата формируется незначительная фиброзная капсула. Волокна коллагена гладкие, без явлений резорбции или дегенерации, вокруг имплантата отсутствуют явления воспаления или инфильтрации нейтрофилами.

Через 3 месяца после операции имплантат хорошо интегрирован в окружающую ткань (рис. 8). Имплантат — без явлений воспаления или дегенерации. В лакунах костного коллагена расположена собственная ткань кожи без явлений фиброза. Имплантат сохраняет свою первоначальную структуру с частичной краевой деструкцией, которая носит локальный характер. Естественная высокая пористость материала способствует миграции в него собственных клеток ткани, в которую он помещен, что свидетельствует о его биосовместимости и отсутствии на него патологической реакции.

Введение в костный деминерализованный коллаген сГАГ создает активный комплекс, снижающий первичную воспалительную реакцию на имплантированный материал, что повышает его устойчивость к биораспаду.

Такой комплекс при помещении в костные дефекты способен быть эффективным и активным субстратом для активации и связывания факторов роста, костных морфогенетических белков, агрегации тромбоцитов, остеобластов и остеокластов, что способствует ремоделированию костной ткани и стимуляции репарации костного дефекта [11, 14, 16, 23].

Представленные в данной работе результаты исследования по биосовместимости костного недеминерализованного и деминерализованного коллагенов, насыщенных сГАГ, полученных по новой технологии обработки костной ткани из различных источников (костная ткань свиней, быков, лошадей), позволили разработать серию остеопластических материалов Остеопласт, которые прошли клиническую апробацию в ведущих клиниках г. Москвы.

Материалы серии Остеопласт решением МЗСР РФ разрешены к широкому клиническому применению. 

(Список литературы находится в редакции).