

ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ МОНОКОНДИЛЯРНОЙ АРТРОПЛАСТИКИ КОЛЕННОГО СУСТАВА

Жук П. М., Бойнюк А. Л., Бабун Д. В., Каяфа А. М., Котович О. А., Минкин В. В., Филоненко Е. А.

Резюме. Проанализированы отдаленные результаты монокондиллярного эндопротезирования 108 коленных суставов. Через 5 лет отмечено полное сохранение функции оперированных суставов у 92,5% обследованных пациентов. Учитывая малую травматичность и незначительное использование метала при вмешательстве, возможность сохранения связочного аппарата сустава и раннего восстановления функции, а также при соблюдении строгих показаний к операции и техники ее выполнения методика одномышечковой артропластики во многих случаях может служить альтернативой тотальному эндопротезированию.

Ключевые слова: коленный сустав, гонартроз, монокондиллярное эндопротезирование, отдаленные результаты.

УДК 615.46:57.086.83:611.018.46:612.085.2

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КЛОНИРОВАНИЯ СТВОЛОВЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ ВЫСОКОПОРИСТОЙ СТЕКЛОКЕРАМИКИ И ЕЁ РАСТВОРИМОСТЬ ЕХ VIVO

Панченко Л. М.¹, Сыч Е. Е.², Яценко А. П.³

¹ГУ "Институт травматологии и ортопедии НАМН Украины", г. Киев

²Институт проблем материаловедения им. И. Н. Францевича
НАН Украины, г. Киев

³Национальный технический университет Украины "КПИ", г. Киев

Резюме. В работе исследована эффективность клонирования стволовых стромальных клеток костного мозга в присутствии высокопористой стеклокерамики на основе биогенного гидроксиапатита (БГА), а также её растворимость в физиологическом растворе. Показано, что увеличение в составе стеклокерамики массовой доли биогенного гидроксиапатита от 50 до 60% в 1,7 раза повышает её растворимость *ex vivo*. Кроме того, установлено существенное увеличение показателей остеогенной активности стволовых стромальных клеток костного мозга подвздошной кости человека вне очагов локального воспаления и дегенеративно-дистрофического поражения в присутствии стеклокерамики. Причём эффективность клонирования возрастает с увеличением содержания биогенного гидроксиапатита в составе высокопористой стеклокерамики.

Ключевые слова: гидроксиапатит, стекло, высокопористый, растворимость, стволовые стромальные клетки костного мозга человека, эффективность клонирования.

Введение

На сегодняшний день одним из наиболее перспективных направлений в ортопедии и травматологии является клеточная инженерия костной ткани. Материалы, применяемые в данной области, должны иметь высокопористую

проницаемую структуру (пористость > 70%) с размером пор 100–600 мкм, что обеспечивает миграцию клеток и вращение костной ткани. Скорость растворения таких материалов в организме должна быть сопоставима со скоростью образования новой костной ткани для обеспечения постепенной механической нагрузки, а прочность материала

ла – достаточной для проведения врачебных манипуляций без разрушения последнего.

Кроме того, обязательным является также свойство материала поддерживать и оптимизировать остеогенную дифференциацию клеток-предшественников костного мозга и повышать остеointegrацию. Имплантационные материалы для восстановления костной ткани должны содержать нетоксичные продукты деградации, а их состав должен максимально приближаться к составу природной кости во избежание осложнений и воспалительных процессов в послеоперационном периоде [8]. Благодаря максимальной схожести по составу и структуре с природной костью, а также хорошей биосовместимости, идеальным материалом для замещения костных дефектов считается гидроксиапатит как синтетического, так и биогенного происхождения.

Однако получение высокопористых материалов на основе гидроксиапатита осложнено их низкими механическими свойствами [6, 7]. Повысить прочностные характеристики такого материала возможно за счёт введения в его состав биостекла, присутствие которого не нарушает баланс ионов в организме и является биосовместимым. К биоактивным стеклам относят стекла системы $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O}$ (с содержанием P_2O_5 , 6 мол. %), которые в зависимости от состава имеют различную степень биоактивности и растворимости. Среди них наиболее распространённым является стекло 45S5 Bioglass® [10, 11]. Однако такое стекло достаточно тугоплавкое для получения его в лабораторных условиях (температура варки – 1370°C), что значительно повышает себестоимость получаемого материала. Поэтому перспективным является разработка биоактивных высокопористых материалов на основе гидроксиапатита со структурой, максимально приближенной к структуре костной ткани, и температурой синтеза, не превышающей 1000°C , что позволило бы получать их с использованием стандартного лабораторного оборудования.

Совместная разработка ИПМ НАН Украины и кафедры ХТКС НТУУ “КПИ” – высокопористый стеклокерамический материал на основе биогенного гидроксиапатита (БГА) и стекла системы $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O}$, который имеет открытопористую структуру с размером пор более 100 мкм и пористостью не менее 70% [5], что делает его перспективными для медицинского применения.

Как известно, процессы регенерации костной ткани обеспечивают специальные типы клеток, которые называются стволовыми. Среди них ведущая роль принадлежит стволовой кроветворной клетке (СКК), которая отвечает за гемопоэз и иммуногенез, а также стволовой стромальной клетке (ССК), обеспечивающей остеогенез, хондрогенез и фиброгенез. В костном мозге эти две линии находятся в тесном морфологическом взаимодействии. Нормальный гемопоэз и иммуногенез могут осуществляться только на полноценном стромальном плацдарме, который строится колониеобразующими единицами фибробластов (КОЕф) – остеогенными клетками-предшественниками или стволовыми стромальными клетками (ССК) костного мозга [1, 2]. В культуре КОЕф костного мозга человека за 14 суток проходят полный курс дифференцировки от ранних предшественников до остеобластов [1]. Было доказано, что культура стволовых стромальных клеток костного

мозга является классической моделью для изучения непосредственного влияния физических или химических (в том числе фармакологических и костнозамещающих) факторов *ex vivo* [3, 4].

Целью данной работы было исследование растворимости высокопористой стеклокерамики в изотоническом растворе и изучение её прямого влияния на ССК костного мозга человека *ex vivo*.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования были выбраны образцы высокопористой стеклокерамики с массовой долей гидроксиапатита 50 и 60%. Образцы получены методом дублирования с применением в качестве темплата полимерной открытопористой пенополиуретановой матрицы. Термообработка производилась при температуре 900°C .

Исследование растворимости было проведено в физиологическом растворе (0,9% NaCl), который применяется для исследований *ex vivo* [9, 12] и является простейшим водным раствором, изотоническим плазме крови человека, и важнейшим неорганическим компонентом, поддерживающим соответствующее осмотическое давление плазмы крови и внеклеточной жидкости. Образцы высокопористой стеклокерамики помещали в физиологический раствор и выдерживали в термостате при $36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 2 суток. После извлечения образцы промывали дистиллированной водой и высушивали в сушильном шкафу до постоянной массы. Растворимость материала оценивали по потере массы. Кроме того, методом энергодисперсионного рентгенфлуоресцентного элементного анализа (ЭДРФА) (“Expert 3L”, Украина) был исследован химический состав физиологического раствора после пребывания в нём образцов высокопористой стеклокерамики. Также осуществлялся контроль изменения pH физиологического раствора в присутствии полученных образцов с использованием pH-метра “Checker HI 98127” (“Hanna Instruments”, США).

Для оценки эффективности клонирования ССК костного мозга человека в присутствии высокопористой стеклокерамики был использован метод клонирования остеогенных клеток-предшественников костного мозга по А. Я. Фриденштейну в модификации В. С. Астаховой [12]. Забор спонгиозы для исследования производился из крыла подвздошной кости пациентов ортопедического профиля вне очагов локального воспаления и дегенеративно-дистрофического поражения костной ткани. Клетки костного мозга из спонгиозной кости вымывали в среде 199 на магнитной мешалке в течение 30 мин. Клонирование ССК костного мозга проводили с применением фидера – летально облуженных клеток костного мозга кролика, в чашках Петри, используя питательную среду 199 с 20%-м содержанием сыворотки крови человека. Культивирование проводили при 37°C без смены питательной среды в течение 14 суток. Выросшие культуры фиксировали 96%-м этанолом, окрашивали по Романовскому-Гимзе. Результаты оценивали по показателю эффективности клонирования стромальных фибробластов костного мозга среди 10^5 ядерных клеток – соотношение количества выросших колоний к числу посаженных в чашку

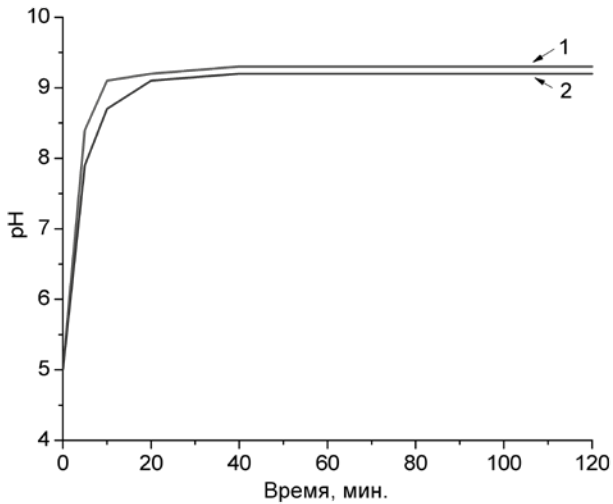


Рис. 1. Изменение pH физиологического раствора в присутствии образцов высокопористой стеклокерамики: 1 – БГА/стекло=50/50, 2 – БГА/стекло=60/40

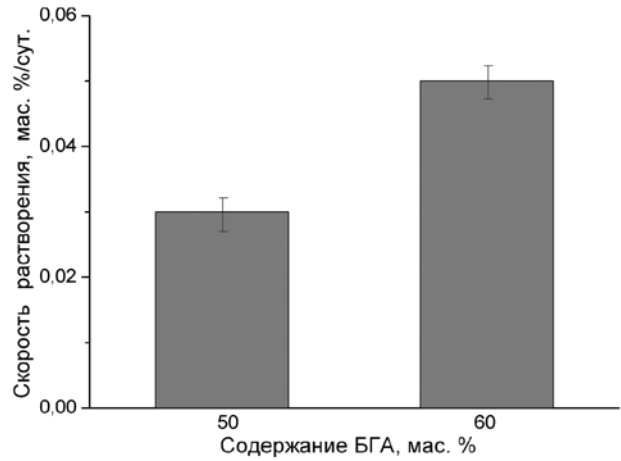


Рис. 2. Скорость растворимости образцов высокопористой стеклокерамики в физиологическом растворе (36,5±0,5° С) в зависимости от содержания БГА

Петри клеток. За колонию принимали скопление клеток, содержащее не менее 50 фибробластов. Эффективность клонирования КОЕф костного мозга (ЭКОЕф) рассчитывали по формуле:

$$\text{ЭКОЕф} = \frac{\text{Количество выросших колоний} \cdot 10^5}{\text{Количество посаженных клеток в чашку Петри}}$$

Контролем служили культуры этих же клеток, выращенные в аналогичных (стандартных) условиях без образцов высокопористой стеклокерамики.

Была выращена 21 культура стромальных фибробластов (по 7 на каждый тип материала и контроль). Сравнивали непосредственное влияние биоматериалов, содержащих различное соотношение БГА и стекла, на рост и дифференцировку ССК костного мозга *ex vivo*.

Результаты и их обсуждение

Динамика изменения pH физиологического раствора в присутствии полученных образцов приведена на рис. 1. Как видно из представленного графика, внесение в физиологический раствор образцов высокопористой стеклокерамики увеличивает pH. Стабилизация pH наступает после 40 мин. пребывания образцов в модельной среде и составляет 9,2 и 9,3 для составов стеклокерамики, содержащей 60 и 50 мас. % БГА. Следует отметить, что большее содержание стекла в стеклокерамике обеспечивает больший рост pH за счёт выщелачивания.

Таблица 1

Химический состав модельной среды после изучения растворимости высокопористой стеклокерамики в физиологическом растворе

Исследуемый материал	Содержание элемента, мас. %		
	Са	Р	Cl
0,9% раствор NaCl	-	-	5,4·10 ⁻²
БГА/стекло=50/50	6,1·10 ⁻⁴	1,5·10 ⁻⁴	5,4·10 ⁻²
БГА/стекло=60/40	8,0·10 ⁻⁴	2,3·10 ⁻⁴	5,4·10 ⁻²

Результаты исследования растворимости образцов высокопористой стеклокерамики в модельной среде представлены на рис. 2. Увеличение количества биогенного гидроксиапатита в составе высокопористой стеклокерамики на 10 мас. % в 1,7 раза увеличивает растворимость материала. Растворение стеклокерамики дополнительно подтверждается результатами ЭДРФА (табл. 1), согласно которым после 2 суток пребывания образцов в физиологическом растворе в нём обнаруживаются такие химические элементы, как кальций и фосфор, причём их количество увеличивается пропорционально содержанию БГА в образцах.

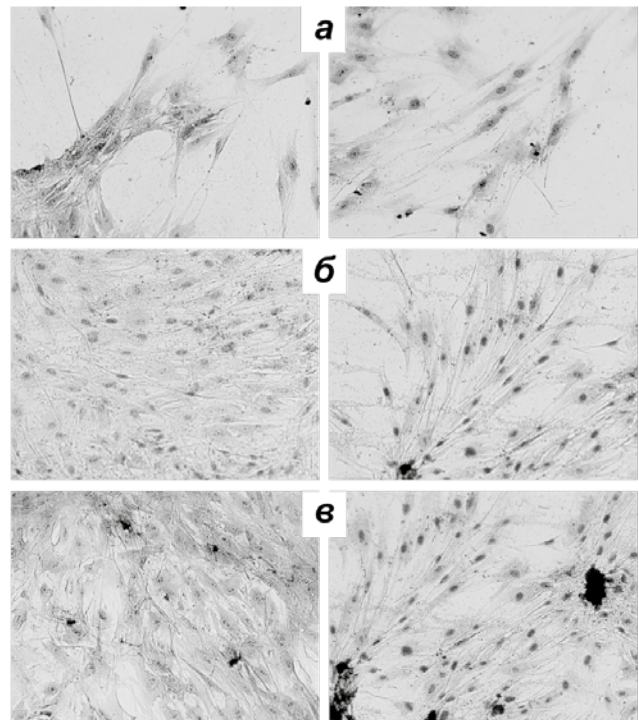


Рис. 3. Колонии ССК костного мозга (увеличение ×100) в контроле (а) и в присутствии высокопористой стеклокерамики (б – БГА/стекло=50/50, в – БГА/стекло=60/40). Окрашивание по Романовскому-Гимзе

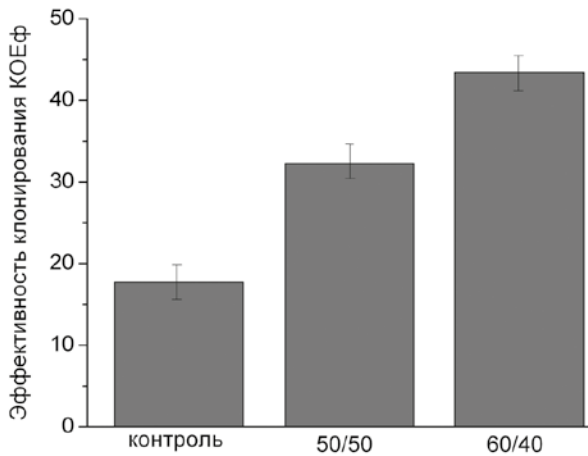


Рис. 4. Эффективность клонирования ССК костного мозга человека в контроле и в присутствии образцов высокопористой стеклокерамики в зависимости от соотношения БГА/стекло

На рис. 3 представлены фото колоний ССК костного мозга, культивированные в течение 14 суток в присутствии высокопористой стеклокерамики с разным содержанием БГА и в контроле. Все культуры стромальных фибробластов костного мозга (контроль и опыт – с высокопористой керамикой) представлены различными по величине одно- и многослойными колониями. Следует отметить, что присутствие высокопористой стеклокерамики в культуральной системе в чашках Петри сопровождалось преобладанием многослойных колоний. Причём, чем больше содержание БГА в составе высокопористой стеклокерамики, тем больше общее количество колоний и выше удельный вес многослойных.

Величины эффективности клонирования ССК костного мозга среди 10^5 ядерных клеток в контроле и в присутствии высокопористой стеклокерамики представлены на рис. 4. Как показывают результаты проведенных исследований, эффективность клонирования остеогенных клеток-предшественников костного мозга в присутствии высокопористой стеклокерамики выше по сравнению с контролем в 1,8–2,4 раза. Кроме того, увеличение содержания БГА в высокопористой стеклокерамике статистически достоверно повышает эффективность клонирования стромальных фибробластов костного мозга в 1,3 раза.

Таким образом, высокопористая стеклокерамика на основе биогенного гидроксиапатита не только не подавляет, но и способствует пролиферации и дифференцировке остеогенных клеток-предшественников костного мозга, что экспериментально доказывает возможность и целесообразность клинического использования исследуемого материала для замещения костных дефектов различного происхождения.

Выводы

Установлено, что увеличение содержания биогенного гидроксиапатита от 50 до 60 мас. % в высокопористой стеклокерамике в 1,7 раза повышает растворимость материала в физиологическом растворе. Эффективность

клонирования остеогенных клеток-предшественников костного мозга возрастает в 1,8–2,4 раза в присутствии высокопористой стеклокерамики. Увеличение содержания БГА в высокопористой стеклокерамике статистически достоверно повышает эффективность клонирования в 1,3 раза. Высокопористая стеклокерамика на основе биогенного гидроксиапатита оптимизирует пролиферацию и дифференцировку остеогенных клеток-предшественников костного мозга человека, что делает такой материал перспективным для медицинского применения.

Литература

1. Астахова В.С. Остеогенные клетки-предшественники костного мозга человека / Астахова В.С. – К.: Феникс, 2000. – 176 с.
2. Коваленко В.М. Дослідження впливу хондроїтину сульфату, глюкозаміну гідрохлориду та їх комбінації на культуру стромальних клітин кісткового мозку людини / Коваленко В.М., Лисенко І.В., Панченко Л.М. // Український ревматологічний журнал. – 2007. – № 2 (28). – С. 51–55.
3. Коваленко В.Н. Культура створових стромальних клітин костного мозга человека как модель для изучения прямого влияния фармакологических препаратов при остеоартрозе / Коваленко В.Н., Лысенко И.В., Панченко Л.М. // Український ревматологічний журнал. – 2006. – № 3 (25). – С. 45–48.
4. Панченко Л.М. Показатели остеогенной активности костного мозга человека и их практическое использование: дис. ... канд. мед. наук: 14.01.21 / Л.М. Панченко. – К., 1997. – 115 с.
5. Патент на корисну модель 92619 Україна, МПК (2014.01) А61К 33/00, А61Р 19/00 Високопористий комірчастий кальційфосфатний біоматеріал / О.Є. Сич, А.П. Яценко; заявник і патентовласник Інститут проблем матеріалознавства ім. І.М. Францевича НАН України. – у 2014 03034; заявл. 25.03.2014; опуб. 26.08.2014, Бюл. № 16. – 3 с.
6. Bellucci D. A revised replication method for bioceramic scaffolds / Bellucci D., Sola A., Cannillo V. // Bioceramics Development and Applications. – 2011. – Vol. 1. – P. 1–8.
7. Callcut S. Correlation between structure and compressive strength in a reticulated glass-reinforced hydroxyapatite foam / S. Callcut, J. C. Knowles // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2002. – Vol. 13, Issue 5. – P. 485–489.
8. Gerhardt L.-C. Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering / L.-C. Gerhardt, A.R. Boccaccini // Materials. – 2010. – Vol. 3. – P. 3867–3910.
9. Gonzalez J.S. Composite gels based on poly (vinyl alcohol) for biomedical uses / J.S. Gonzalez, A.S. Maiolo, C.E. Hoppe, V.A. Alvarez // Procedia Materials Science. – 2012. – Vol. 1. – P. 483–490.
10. Kokubo T. Bioceramics and their clinical applications / T. Kokubo. – Boca Raton–Boston–New York–Washington, DC: CRC Press LLC, 2008. – 760 p.
11. Ryszkowska J.L. Biodegradable polyurethane composite scaffolds containing Bioglass® for bone tissue engineering / Ryszkowska J.L., Auguscik M., Sbeikh A., Boccaccini A.R. // Composites Science and Technology. – 2010. – Vol. 70. – P. 1894–1908.
12. Sych O. Effect of plasticizer on production of bioactive synthetic calcium phosphates/glass composites and their properties / Sych O., Pinchuk N., Ivanchenko L. // Materials Letters. – 2011. – Vol. 65, Issue 15–16. – P. 2391–2394.

EFFECT OF HIGHLY POROUS GLASS CERAMICS ON BIORESORPTION AND CLONING EFFICIENCY OF HUMAN BONE MARROW STROMAL STEM CELLS EX VIVO

Panchenko L. M., Sych O. Ye., Yatsenko A. P.

Summary. We have studied the efficiency of the bone marrow stromal stem cells cloning in the presence of biogenic hydroxyapatite-based highly porous glass ceramics and its solubility in physiological saline. It was shown that an increase of the biogenic hydroxyapatite content in glass ceramics from 50 to 60% increases in 1.7 times its solubility *ex vivo*. Moreover, it was found the significant increase in osteogenic activity of bone marrow stromal stem cells of human ilium outside the local foci of inflammation and degenerative lesions in the presence of glass ceramics. The cloning efficiency increases with increasing of hydroxyapatite content in highly porous glass ceramics.

Key words: hydroxyapatite, glass, highly porous, solubility, human bone marrow stromal stem cells, cloning efficiency.

ЕФЕКТИВНІСТЬ КЛОНУВАННЯ СТОВБУРОВИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ ЛЮДИНИ В ПРИСУТНОСТІ ВИСОКОПОРИСТОЇ СКЛОКЕРАМІКИ ТА ЇЇ РОЗЧИННІСТЬ EX VIVO

Панченко Л. М., Сич О. Є., Яценко А. П.

Резюме. У роботі досліджено ефективність клонування стовбурових стромальних клітин кісткового мозку в присутності високопористої склокераміки на основі біогенного гідроксиапатиту (БГА), а також її розчинність у фізіологічному розчині. Показано, що збільшення в складі склокераміки масової частки біогенного гідроксиапатиту від 50 до 60% в 1,7 разу підвищує її розчинність *ex vivo*. Крім того, встановлено суттєве підвищення показників остеогенної активності стовбурових стромальних клітин кісткового мозку клубової кістки людини поза осередками локального запалення та дегенеративно-дистрофічного ураження в присутності склокераміки. Причому ефективність клонування зростає зі збільшенням вмісту біогенного гідроксиапатиту у складі високопористої склокераміки.

Ключові слова: гідроксиапатит, скло, високопористий, розчинність, стовбурові стромальні клітини кісткового мозку людини, ефективність клонування.