Подписано к печати 30.12.2005 г.
Объем – 1 печ. л. Формат 60x84/16. Печать офсетная.
Тираж 100. Заказ № 327.
Отпечатано в типографии ООО «Универс – групп»
443011 г. Самара, ул. Академика Павлова, 1.

На правах рукописи

Белозерцева Екатерина Александровна

МЕХАНИЗМЫ РАССАСЫВАНИЯ БИОИМПЛАНТАТОВ СЕРИИ «ЛИОПЛАСТ» И ИХ ВЛИЯНИЕ НА РЕГЕНЕРАТОРНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ОПОРНЫХ ТКАНЯХ РЕЦИПИЕНТОВ

14.00.15 - патологическая анатомия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Саратов - 2006

Работа выполнена в Центральной научно – исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) ГОУ ВПО «Самарский ГМУ Росздрава»

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор Волова Лариса Теодоровна

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор Демкин Григорий Прокофьевич

доктор медицинских наук, профессор Алексеев Юрий Дмитриевич

Ведущая организация: Центральный научно – исследовательский институт стоматологии (ЦНИИС), г. Москва

Защита диссертации состоится «26» февраля 2006 года в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 208.094.01 при ГОУ ВПО «Саратовский ГМУ Росздрава» по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Большая Казачья, 112.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО «Саратовский ГМУ Росздрава»

Автореферат разослан «12» января 2006 года

Ученый секретарь диссертационного совета, доктор медицинских наук Г.Н. Маслякова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Для обеспечения полноценной регенерации дефектов костной и соединительной тканей в различных отраслях медицины (травматология и ортопедия, пластическая и челюстно-лицевая хирургия, офтальмология, оториноларингология, стоматология и др.) широко используют разные материалы биологического происхождения. Учитывая большое разнообразие применяемых биоматериалов, встает вопрос об определении полноценности процессов регенерации тканей реципиентов при их применении (Волова Л.Т., 1996,1997). Для этого необходимо понимать как механизмы рассасывания имплантатов (Слуцкий Л., Ветра Я., 2001), так и их влияние на характер репаративного остеогенеза и коллагенообразование. В современной литературе уделено не достаточно внимания процессам рассасывания биоматериалов (резорбция, биодеградация) и их взаимосвязи с регенерацией, в то время как их оптимизация создаст наилучшие результаты восстановления опорных тканей.

Изучение репаративной регенерации является одной из фундаментальных задач современной патологии. Репаративные процессы в организме неразрывно связаны с воспалением и формируют с ним единую реакцию на повреждение (Серов В.В., Пауков В.С., 1995; Пальцев М.А., Иванов А.А., 1995). Установлено, что регенерация компактной кости происходит в основном за счёт камбия надкостницы и стромальных клеток костно-мозгового канала (Хэм А., Кормак Д., 1983; Докторов А.А., Денисов-Никольский Ю.И., 1991). В губчатой кости наряду с индуцибельными (клетки стромы костного мозга, перициты) содержится большая масса детерминированных клеток-предшественников (преостеобластов), выстилающих костные лакуны (Фриденштейн А.Я., Лалыкина К.С., 1973; Саркисов Д.С. с соавт., 1998).

С позиций биоэтики обязательным условием внедрения новых и уже известных биоматериалов в практическое здравоохранение являются предварительные всесторонние испытания на экспериментальных животных и различных живых системах. Перспективным направлением является

использование культур различных клеточных популяций (фибробласты, остеогенные стромальные клетки-предшественники и др.) для оценки свойств биоимплантатов *in vitro* (Воложин А.И. с соавт., 2002; Алексеев А.А., Туманов В.П., 2004; Лекишвили М.В., 2005). С целью ускорения собственной регенерации опорных тканей реципиентов активно применяются различные клетки соединительной ткани, выращенные *in vitro* (Shortkroff S. et al., 1996; Малахов С.Ф., 1997; Хрупкин В.И. с соавт., 1998; Ходжабекян Г.В., 2003).

Для восстановления поврежденных участков кости, реконструкции ее анатомической целостности широко используют разнообразные пластические материалы биологической (Савельев В.И., 1982, 1992; Абдуллаев Ф.М., Кулаков А.А., 2003; Берченко Г.Н., Кесян Г.А., 2004; Нигматуллин Р.Т., Шангина О.Р., 2004) и неорганической (Григорьян А.С. с соавт., 1999; Грудянов А.И. с соавт., 2001; Подорожная В.Т., Кирилова И.А., 2004) структуры. При реконструктивных операциях многие ученые стремились заменить оптимальную для человека его собственную костную ткань на чужеродную, но близкую по своим биологическим свойствам к аутокости, избегая нанесения дополнительной травмы пациенту забором аутотрансплантата. Одним из таких костно-пластических материалов стал аллогенный деминерализованный брефоостеоматрикс, производимый в Самарском тканевом банке на базе ЦНИЛ СамГМУ (Волова Л.Т. с соавт., 2004). Он представляет разновидность деминерализованного костного материала, получаемого из незрелой костной ткани плодов человека и животных. Исходя из всего вышеперечисленного, нами сформулирована **цель исследования:** в экспериментах *in vivo* и *in vitro* с помощью комплекса различных методов изучить механизмы рассасывания аллогенного деминерализованного брефоостеоматрикса, изготовленного по технологии «Лиопласт», и влияние данного биоматериала на регенераторные процессы в костной ткани реципиентов после его имплантации.

Основные задачи исследования.

1. *In vivo* в эксперименте на крысах исследовать в динамике характер рассасывания аллогенного брефоостеоматрикса, помещенного в дефект лопаточной кости, и сравнить постимплантационную регенерацию костной ткани реципиентов с процессами остеогенеза при заполнении дефекта только кровяным сгустком.
2. Оценить степень общей реакции организма по изменениям показателей системы крови и периферических органов иммуногенеза (лимфатические узлы, селезенка) у крыс в динамике после применения аллогенного брефоостеоматрикса.
3. Создать математическую модель для описания характера, динамики и направленности процессов рассасывания аллогенного брефоостеоматрикса и регенерации, развивающихся у экспериментальных животных без пластики костных дефектов и после применения данного биоматериала.
4. *In vitro* в монослое культуры фибробластов с помощью комплекса методов изучить влияние брефоостеоматрикса на морфофункциональное состояние клеточных культур и выраженность коллагеногенеза путем определения содержания маркеров биосинтеза коллагена в культуральной жидкости.
5. С помощью предварительной стимуляции выработки макрофагов у крыс получить культуру перитонеальных макрофагов с целью изучения влияния аллогенного брефоостеоматрикса на морфофункциональную активность этих клеток *in vitro*.

Научная новизна.

Впервые на новой экспериментальной модели у крыс *in vivo* исследованы особенности механизма рассасывания аллогенного деминерализованного брефоостеоматрикса и дана оценка характера и направленности процессов регенерации опорных тканей животных в сравнительном аспекте в зависимости от заживления костных дефектов при пластике данным биоматериалом и без его применения.

Процессы репаративной регенерации в тканях животных после имплантации аллогенного деминерализованного брефоостеоматрикса, изготовленного по технологии «Лиопласт», впервые изучены с помощью комплекса морфологических, морфометрических, авторадиографических,

общеклинических, иммунологических и биохимических методов с применением кластерного анализа и математического моделирования.

При изучении показателей крови и препаратов периферических органов иммуногенеза экспериментальных животных доказано, что аллогенный брефоостеоматрикс обладает минимальной антигенностью и не вызывает отрицательных реакций со стороны иммунной системы организма реципиента.

Впервые в экспериментальной модели *in vitro* проведено исследование изменений морфофункциональной активности клеточных культур дермальных фибробластов и перитонеальных макрофагов под влиянием различных видов аллогенного брефоостеоматрикса (изготовленного по технологии «Лиопласт» с pH<6,0 и нейтрализованного с pH 7,0). Благодаря этому получены новые данные, выявившие корреляцию уровней белковосвязанного оксипролина и общего белка в культуральной жидкости, а также стимуляцию биосинтетических, адгезивных, хемотаксических и других свойств исследованных клеток под воздействием кислого pH биоимплантата.

Теоретическое и практическое значение работы.

Результаты проведенной работы дополняют современные представления о характере регенераторных процессов в костной и соединительной тканях реципиентов под действием аллогенных деминерализованных биоимплантатов и о механизмах рассасывания этих биоматериалов.

Обнаружена выраженная стимуляция процессов остеогенеза с реакцией со стороны камбиального слоя надкостницы под влиянием брефоостеоматрикса, причем резорбция как биоимплантата, так и окружающей зону вмешательства поврежденной костной ткани и дальнейшая костная перестройка происходят гораздо интенсивнее, чем без использования данного биоматериала, что связано с привлечением активных макрофагов в область операции. Полученные данные обосновывают положительные результаты использования аллогенного брефоостеоматрикса в лечебных целях и подтверждают необходимость его широкого применения.

Выявлена особенность репаративного остеогенеза губчатой кости крыс - регенерация через образование хондроидной ткани, являющейся временной структурой и подвергающейся перестройке с формированием зрелой органотипичной костной ткани.

Нами разработана методика нейтрализации брефоостеоматрикса перед его помещением в клеточную культуру с целью выявления изменений структуры, свойств и функциональной (пролиферативной, секреторной и др.) активности клеток под действием данного биоматериала, а также изучено влияние его pH на рост клеток.

Предложенный алгоритм изучения регенераторного процесса в комплексе с диагностическими методами определения у пациентов уровней свободного и белковосвязанного оксипролина в периферической крови и математическим моделированием может быть использован для оценки течения и прогноза заживления костных дефектов с преимущественным воздействием на рассасывание или регенерацию в реконструктивной хирургии. Результаты данного исследования могут быть использованы как основа для дальнейших экспериментов по изучению свойств алло- и ксеногенных биоимплантатов на различных видах клеточных культур.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Процессы рассасывания аллогенного брефоостеоматрикса происходят как путем растворения, так и с участием активных макрофагов и остеокластов с высвобождением большого количества индукторов остеогенеза, за счет чего происходит оптимизация процессов регенерации собственных тканей реципиентов.
2. Брефоостеоматрикс усиливает регенерацию костной ткани, особенностями которой являются выраженная стимуляция камбия надкостницы с формированием периостальной костной мозоли и регенерация по типу костно - хрящевой модели остеогенеза.
3. При пересадке аллогенного брефоостеоматрикса реакция со стороны системы крови и периферических органов иммуногенеза у животных

минимальна и доказывает отсутствие у данного биоматериала иммуногенных свойств.

4. Помещение аллогенного деминерализованного брефоостеоматрикса, изготавливаемого по технологии «Лиопласт» (pH<6,0) в культуру дермальных фибробластов усиливает пролиферативную активность клеток и стимулирует коллагеногенез, что проявляется в повышении синтеза белковосвязанного оксипролина и общего белка.
5. На культурах перитонеальных макрофагов подтверждено, что pH брефоостеоматрикса является одним из ведущих факторов, оказывающих влияние на функциональную активность макрофагов: кислый pH вызывает выраженный хемотаксис и активацию фагоцитоза, нейтральный pH такого воздействия не оказывает.

Апробация работы. Апробация работы проведена в Центральной научно – исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) ГОУ ВПО «Самарский ГМУ Росздрава». Материалы диссертации доложены на 4-й Международной конференции молодых ученых и студентов «Актуальные проблемы современной науки» (Самара, 2003); на 12-м Международном конгрессе Европейской ассоциации тканевых банков (Бельгия – Брюгге, 2003); на II Всероссийском симпозиуме с международным участием «Клинические и фундаментальные аспекты тканевой и клеточной терапии» и конференции «Теория и практика клеточных биотехнологий» (Самара, 2004); на V и VI научных конференциях молодых ученых «Региональная медицинская наука: тенденции и перспективы развития» (Самара, 2004, 2005). Работа поддержана грантом РФФИ «Новые биотехнологии в медицине» № 51Е2.8К от 12.05.2004.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, получено 5 удостоверений на рационализаторские предложения.

Реализация работы. Результаты исследования используются в лечебном процессе ММУ «Стоматологическая поликлиника № 2» г. Самары; Самарской областной стоматологической поликлиники, г. Самара; ЛПУ Нов.НМЦ "Гиппократ", г. Новокуйбышевск; в учебном и лечебном процессах на кафедре и

в клинике челюстно-лицевой хирургии и стоматологии Клиник ГОУ ВПО «Самарский ГМУ Росздрава»; в учебном процессе на кафедре патологической анатомии ГОУ ВПО «Самарский ГМУ Росздрава»; при выполнении экспериментов на базе Центральной научно – исследовательской лаборатории ГОУ ВПО «Самарский ГМУ Росздрава».

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 169 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа содержит 77 рисунков и 16 таблиц. Список литературы включает в себя 234 источника, из которых 122 отечественных и 112 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований

Эксперименты проведены на 90 белых половозрелых лабораторных крысах массой 150-200г. Все опыты проводили в соответствии с положением приказа № 755 МЗ СССР от 12.08.1977 года. До начала экспериментов у крыс всех групп осуществляли забор крови из подъязычной вены в количестве 1,0-1,5 мл.

Нами была разработана модель, при которой создавался краевой непроникающий дефект в области ости лопатки. Все крысы были разделены на 2 группы: контрольная (5 здоровых животных) и опытная (85 животных). Выведение животных из эксперимента осуществляли на 1, 2, 3, 7, 14 и 30-е сутки путем декапитации с помощью специально разработанного устройства - «гильотины» с забором крови для проведения общеклинических, иммунологических и биохимических исследований. Опытная группа была разделена на две серии. У крыс в I серии создавали дефекты обеих лопаток, которые оставляли заживать под кровяным сгустком. Во II серии создавали аналогичные дефекты, которые заполняли аллогенным брефоостеоматриксом.

Взятый у экспериментальных животных материал подвергался общеморфологическому, морфометрическому, авторадиографическому,

общеклиническому, иммунологическому, биохимическому и статистическому исследованиям с применением математического моделирования.

Для гистологического анализа у крыс брали лопатки с обеих сторон, регионарные (подмышечные) лимфатические узлы и селезенку. Взятый материал фиксировали в 12% формалине на фосфатном буфере pH 7,2-7,4, декальцинировали в растворе трилона-В, осуществляли спиртовую проводку и заливку в парафин с помощью стандартных методик (Лилли Р., 1969; Меркулов Г.А., 1969). Изготавливали парафиновые срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван – Гизону. С целью авторадиографического исследования за 1 час до выведения из эксперимента крысам вводили в брюшную полость радиоизотоп ^{3}H-тимидин в дозе 40 МБК на 1кг массы. Полученные микропрепараты подвергали обработке фотоэмульсией, затем проявляли, промывали в дистиллированной воде, окрашивали гематоксилином и эозином. Все препараты изучали светооптически и телеметрически с помощью электронной системы визуализации - видеокамеры CCD KOCOM KCC-31OPD и светового микроскопа Nicon ALPHAPHOT-2 YS2-H (Japan). Телеморфометрическая установка включала в себя цифровую видеокамеру, совместимый с ней световой микроскоп, персональный компьютер с установленной на его жёсткий диск программой «Видео Тест – Морфо» («ВТ–М» - Россия, г. Санкт-Петербург; рег. уд. МЗ РФ № 29/20010702/6102-04).

С помощью стандартных общеклинических и иммунологических методик определяли показатели общего анализа крови и реакцию клеток, осуществляющих фагоцитоз. Для оценки метаболизма коллагена в организме экспериментальных животных биохимически определяли количественное содержание свободного и белковосвязанного оксипролина в плазме крови.

Нами также была разработана экспериментальная модель изучения воздействия аллогенного деминерализованного брефоостеоматрикса на культуры фибробластов и макрофагов. Исследования проводили на первичных культурах дермальных фибробластов крыс (4 – 8 пассажа) и первичных 7-

дневных культурах перитонеальных макрофагов крыс. Клетки культивировали в стандартных условиях в термостате Sanyo – Incubator MIR-262 при температуре 37°C в среде МЕМ с 10%-ной эмбриональной телячьей сывороткой в пластиковых культуральных флаконах Orange Scientific (производство Бельгии), Corning (производство США) площадью 25 и 75см^2 и культуральных чашках Петри Sarstedt диаметром 3 и 6см. В качестве контрольных групп служили: 1- культура клеток фибробластов или макрофагов с ростовой средой во флаконе или чашке без брефоостеоматрикса; 2 - ростовая среда МЕМ с 10%-ной эмбриональной телячьей сывороткой во флаконе или чашке с помещенной в нее такой же по массе пластинкой брефоостеоматрикса без культивируемых клеток. Нативные культуры исследовали с помощью инвертированного микроскопа "Биолам П – 2-1" при увеличении 100 и 150. Для выявления фибробластов в культуре их окрашивали по Романовскому-Гимзе. При пересеве забирали из опытных и контрольных флаконов культуральную среду, в которой исследовали содержание общего белка, свободного и белковосвязанного оксипролина. Первичную культуру макрофагов получали из перитонеального экссудата крыс, предварительно стимулированных за 3-4 дня до забора внутрибрюшинным введением раздражающих веществ. Для выявления макрофагов в культуре их окрашивали по Романовскому-Гимзе и нейтральным красным.

Все полученные результаты подвергали статистической обработке при помощи персонального IBM-совместимого компьютера с использованием приложения Microsoft Excel программного продукта Microsoft Office и программы Statsoft Statistica 6.0. Достоверность межгрупповых различий полученных данных определяли по t - критерию Стьюдента. Полученные при общеклинических и иммунологических исследованиях данные для приведения в соответствие требованиям нормального распределения подвергали логарифмированию по основанию e, затем проводили статистический анализ полученных натуральных логарифмов исходных значений (Петри А., Сэбин К., 2003). Математическое моделирование осуществлено по методике Б.А. Углова

с соавт. (1994) с учетом данных о нормальности распределения и выполнения матричных тестов корреляции Пирсона. Для группировки переменных применяли кластерный анализ методом древовидной кластеризации.

Результаты собственных исследований

Гистологически установлено, что аллогенный брефоостеоматрикс, полученный из фетальной костной ткани крыс по технологии «Лиопласт», имеет вид бесклеточных пористых структур, окрашивающихся оксифильно пикрофуксином в ярко-красный, а гематоксилином и эозином – в ярко-розовый цвет. В эксперименте на крысах выявление брефоматрикса в зоне имплантации в виде ярко-красных волокнисто-балочных структур возможно лишь на 1-2-е сутки с момента операции. В дальнейшем этот биоматериал уже не определяется, так как подвергается полному рассасыванию за этот срок благодаря воздействию тканевых макрофагов, на более поздних сроках трансформирующихся в остеокласты. Выявляемые в больших количествах макрофаги и остеокласты в зоне регенерата осуществляют активный фагоцитоз брефоостеоматрикса и перестройку образующейся костной ткани (**рис. 1а**).

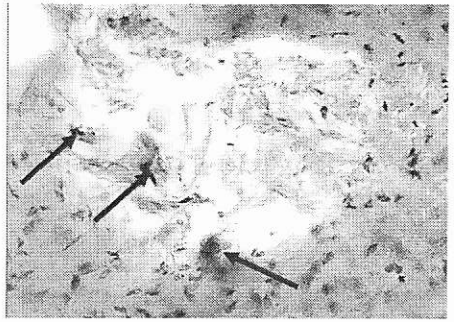


Рис. 1а.

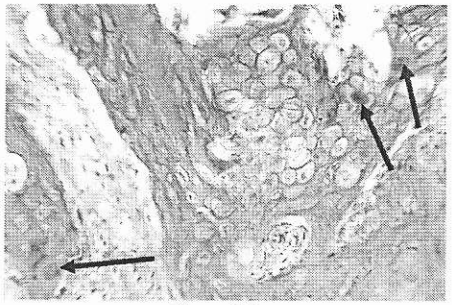


Рис. 1б.

Имплантация брефоостеоматрикса в дефект лопатки. Рис. 1а - 2-е сутки после операции. В центре - глыбки брефоостеоматрикса, окруженные по периферии макрофагами (указаны стрелками). **Рис. 1б - 7-е сутки после операции.** Регенерат имеет полиморфную структуру: видны участки хондроидных клеток среди молодых костных балок с остеокластами (указаны стрелками). Окр. гематоксилином и эозином. Ув. 400.

В обеих опытных сериях нами была отмечена особенность регенерации костной ткани крыс с образованием особой временной структуры в виде

хрящеподобной ткани, содержащей хондроидные клетки округлой формы, больших размеров, с единичными крупными ядрами, четко контурирующей мембраной и светлой цитоплазмой. Они расположены в небольших лакунах группками по несколько клеток и по своему строению напоминают гиалиновый хрящ. При использовании брефоостеоматрикса таких клеток в зоне регенерата формировалось значительно больше, чем без его применения (**рис. 1б**).

Нами также было установлено, что в норме надкостница крыс имеет малую толщину (1–2 ряда клеток), клеточные слои дифференцируются нечётко, в них нет активных остеобластов (**рис. 2а**). У крыс серии № I без пластики дефекта брефоостеоматриксом во все наблюдаемые сроки также определяется тонкая надкостница, имеющая вид и строение интактной. (**рис. 2б**).

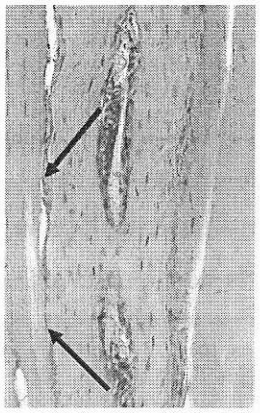


Рис. 2а.

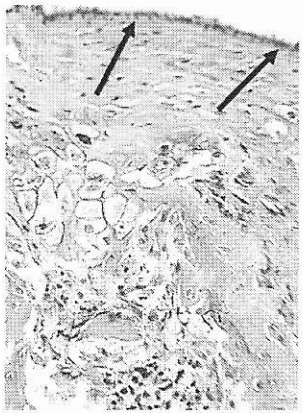


Рис. 2б.

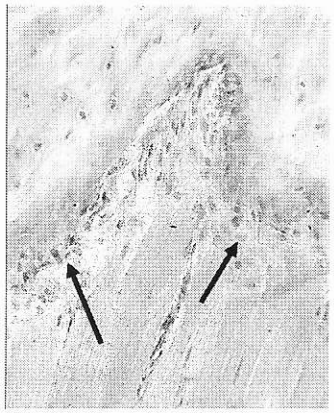


Рис. 2в.

Ость лопатки крысы. Рис. 2а. Контрольная группа. 3-и сутки после операции: рис. 2б - лопатка без пластики дефекта, рис. 2в - пластикой дефекта брефоостеоматриксом. Стрелками указана надкостница. Окр. гематоксилином и эозином. Ув. 400.

Аллогенный брефоостеоматрикс оказывает мощное стимулирующее воздействие на пролиферацию остеогенного слоя (камбия) надкостницы. У крыс этой серии во все сроки наблюдения отмечается возрастание толщины надкостницы в 4-5 раз по сравнению с нормой и с крысами без пластики дефекта (2 – 3 слоя клеток). В ее камбиальном слое отмечается большое

множество активно пролиферирующих остеобластов, за счет чего количество слоев клеток увеличивается до 8-10 (**рис. 2в**).

При авторадиографическом исследовании препаратов серии № II с использованием брефоостеоматрикса виден активный остеобластический процесс с образованием молодых костных балок. Идет перестройка костной ткани, вокруг новообразованных костных балок видно большое количество молодых крупных остеобластов со светлой цитоплазмой. Реакция надкостницы сохраняется (**рис. 3а**). В серии № I (без пластики дефекта брефоматриксом) процессы остеогенеза протекают гораздо менее интенсивно - **рис. 3б**.

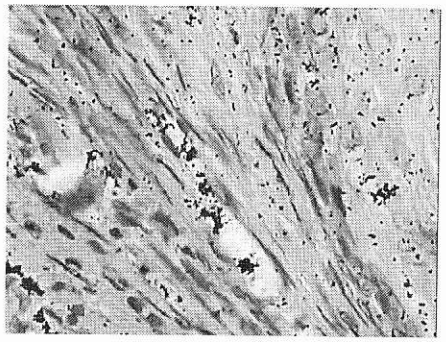


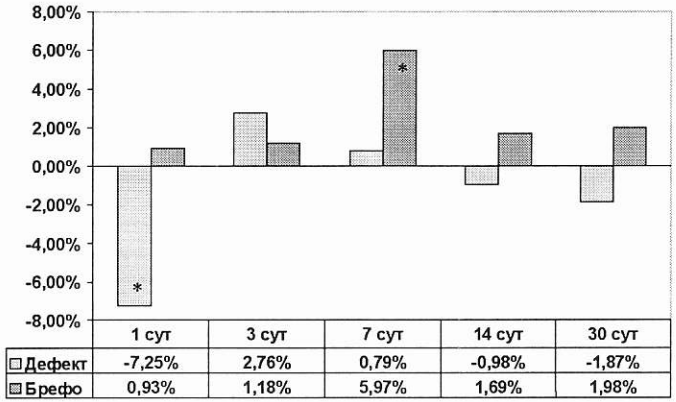
Рис. 3а.

Рис. 3б.

14-е сутки после операции. Рис. 3а – лопатка с пластикой дефекта брефоостеоматриксом. Метки в молодых остеобластах, реакция надкостницы. **Рис. 3б – лопатка без пластики дефекта.** Меченые клетки в эндотелии сосудов. Окр. гематоксилином и эозином. Ув. 500.

Высокий уровень процессов остеогенеза в серии № II подтверждается статистически значимым повышением индекса меченых ядер на 14-е сутки до 7,27±0,44 по сравнению с серией № I (5,77±0,48). На 30-е сутки индекс мечения ядер в серии № II равен 6,81±0,38, что также значимо превышает показатель серии № I (4,38±0,42). Из всех меченых ядер клеток на долю остеобластов в серии № II приходилось 60-70%, остальное - на фибробласты и эндотелиоциты. В серии № I на долю остеобластов приходилось лишь около 40%. Морфометрически нами было отмечено статистически значимое возрастание

процента площади костной ткани в серии с пластикой дефекта брефоостеоматриксом на 5,97% по сравнению с нормой (**рис. 4**).



	1 сут	3 сут	7 сут	14 сут	30 сут
Дефект	-7,25%	2,76%	0,79%	-0,98%	-1,87%
Брефо	0,93%	1,18%	5,97%	1,69%	1,98%

Рис. 4. Динамика изменений площади костной ткани лопаток крыс без пластики дефектов и с использованием аллогенного брефоостеоматрикса в % от нормы. Примечание* - отличие от нормы достоверно значимо ($p < 0,05$)

Таким образом, брефоматрикс непосредственно стимулирует камбиальный слой надкостницы и преостеобласты, а также способствует регенерации через костно-хрящевую модель остеогенеза, за счет чего обеспечивается более быстрое и полноценное созревание пластинчатой костной ткани реципиентов.

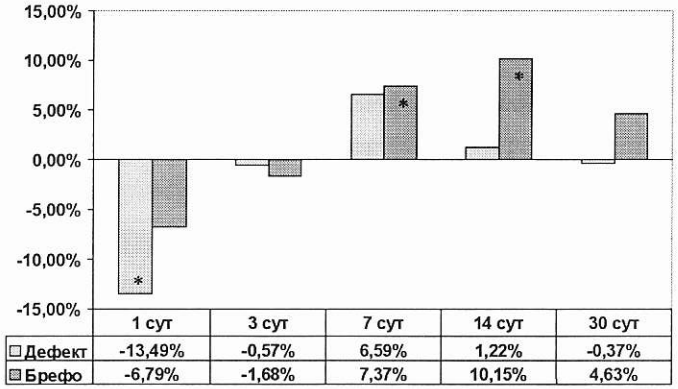
Для проведения комплексной оценки процессов репаративного остеогенеза при пластике дефектов аллогенным брефоостеоматриксом и без его применения весь полученный цифровой материал был обработан с помощью системного многофакторного анализа с последующим математическим моделированием характера и направленности изменений в зоне регенерата по методике Б.А. Углова с соавт. (1994). С учетом выделенных при кластерном анализе группировок определяется четкое разделение показателей на два фактора – «рассасывание» (включает показатели процента площади соединительной ткани и уровень свободного оксипролина) и «регенерация» (процент площади костной ткани, площадь просвета сосудов лопаток и уровень белковосвязанного оксипролина) (**рис. 5**).

	1 сут	3 сут	7 сут	14 сут	30 сут
РС	0,107407392	0,240804051	0,314036894	0,314600413	0,114032816
РГ	-0,026616985	0,023332188	0,055903594	0,023134256	-0,002847658

Рис. 5. Графическое отображение модели процессов рассасывания (РС) и регенерации (РГ) в разные сроки.

Нами были исследованы кровь и органы иммуногенеза крыс в обеих опытных сериях. Динамика возрастания уровня фагоцитарной активности лейкоцитов (ФАЛ) в серии с пластикой дефекта брефоостеоматриксом схожа с графиком динамики изменений критерия «рассасывания»: повышение ФАЛ на 10,15% говорит об интенсификации общей фагоцитарной активности клеток крови, в первую очередь, – сегментоядерных нейтрофилов («микрофагов»). Эти клетки способствуют активации фагоцитоза макрофагами, которые обеспечивают рассасывание биоимплантатов и ремоделирование собственной костной ткани реципиентов при репаративной регенерации (**рис. 6**).

Исследования системы крови выявили значимо не отличающиеся от нормы показатели общего количества лейкоцитов, эозинофилов, базофилов, моноцитов и уровень миелопероксидазы, что доказывает отсутствие у аллогенного брефоостеоматрикса иммуногенных свойств. Отмечались значимые нейтрофилез и лимфопения в обеих опытных сериях только на 1-е стуки после операции при нормализации во все остальные сроки, что может быть проявлением естественной реакции организма в ответ на любую травму, в т.ч. операционное вмешательство.



	1 сут	3 сут	7 сут	14 сут	30 сут
Дефект	-13,49%	-0,57%	6,59%	1,22%	-0,37%
Брефо	-6,79%	-1,68%	7,37%	10,15%	4,63%

Рис. 6. Динамика изменений фагоцитарной активности лейкоцитов (ФАЛ) в периферической крови крыс в % от нормы.
Примечание* - отличие от нормы достоверно значимо ($p < 0,05$)

При исследованиях препаратов периферических органов иммуногенеза крыс установлено, что в обеих опытных сериях площади лимфоидных фолликулов лимфатических узлов и селезенок незначимо отличаются от нормы; реактивные центры либо малых размеров, либо вообще не выявляются. Авторадиографически установлено, что меченых ядер мало в обеих сериях опытов на всех изучаемых сроках. Метки отмечаются в основном по периферии лимфоидных фолликулов в активных макрофагах и в эндотелиоцитах сосудов. В центрах размножения фолликулов меченых ядер не выявлено, что говорит об отсутствии в них активной клеточной пролиферации.

Для более подробного исследования влияния брефоматрикса на тканевые и клеточные ассоциации мы решили изучить в экспериментах *in vitro* его влияние на морфофункциональную активность клеток, принимающих ведущую роль в фазах раневого процесса. Одними из основных представителей этих клеток являются фибробласты и макрофаги. Фибробласты были избраны как разновидность механоцитов - основных коллагенсинтезирующих клеток соединительной ткани, принимающих непосредственное участие в процессах регенерации. В контроле в молодой культуре фибробласты имеют нормальную веретеновидную форму, два или три отростка, светлую цитоплазму и

центрально расположенные хорошо контурирующие ядра, содержащие 1 – 2 ядрышка. Плотность клеток в молодых культурах составляет 120 – 130 клеток/0,1мм^2, затем к 4-м суткам достигает 200 клеток/0,1мм^2. Количество измененных клеток в норме составляет 2–3%. Мы исследовали как сами клетки в нативной культуре с помощью инвертированного микроскопа, для чего их окрашивали по Романовскому-Гимзе, так и забирали культуральную среду, в которой определяли содержание общего белка, свободного и белковосвязанного оксипролина.

Проведена серия опытов: пластинки брефоостеоматрикса массой 0,5г помещали на монослой фибробластов, который культивировали 4 суток. Затем брефоматрикс убирали и продолжали культивирование ещё 4 суток. Было обнаружено, что при помещении в культуру клеток пластинки брефоостеоматрикса вокруг него уже через 1 сутки формируются 3 зоны изменения роста клеток (**рис. 7**).

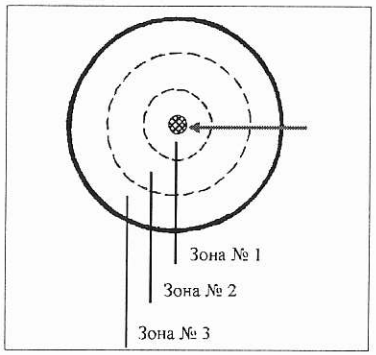


Рис. 7. Схема образования зон изменения роста клеток в монослое фибробластов под влиянием брефоостеоматрикса (указан стрелкой) в чашке Петри, вид сверху. Зона № 1 – задержки роста, зона № 2 – краевая, зона № 3 – отдаленная.

Зона № 1 - задержки роста, представляющая собой поле, лишенное клеток, округлой формы шириной 1,1±0,1мм. За ним шла зона № 2 – краевая шириной 4,5±0,1мм, в которой плотность клеток была снижена до 110,2±15,1 клеток/0,1мм^2. Количество измененных клеток в ней возрастало до 20%. Зона № 3 – отдаленная, в ней фибробласты сохраняли нормальные вид и плотность. Через 2 суток ширина зоны №1 возрастала до 2,0±0,1мм. Ширина и количество измененных клеток в зоне № 2 возрастали до 10,0±0,1мм и 47%, а плотность клеток снижалась до 88,1±10,2 клеток/0,1мм^2 (**рис. 8а**). На 4-е сутки в зоне № 1 вблизи от брефоматрикса появлялись единичные фибробласты. Количество

измененных клеток в краевой зоне снижалось до 29%, ее размер сокращался до 2,7±0,2мм, плотность клеток возрастала до 130,2±8,1 клеток/0,1мм^2. В зоне №3 вид монослоя и плотность клеток не отличались от нормальных.

Затем брефоматрикс из флаконов был удален: уже через 4 часа после этого зона № 1 начинала зарастать молодыми фибробластами. На 8-е сутки от начала эксперимента эта зона полностью покрыта монослоем молодых фибробластов с нормальной плотностью клеток 200,2±7,1 клеток/0,1мм^2 (**рис. 8б**).

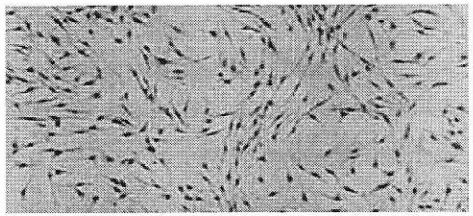


Рис. 8а.

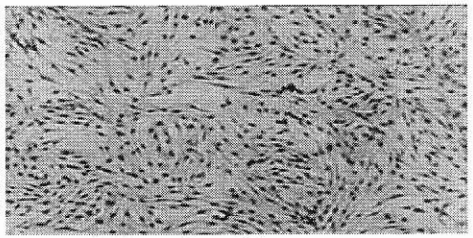


Рис. 8б.

Рис. 8а - снижение плотности монослоя на границе краевой и отдаленной зон. Срок – 2 суток. Рис. 8б - восстановление плотности монослоя. Срок – 4 суток. Фибробласты имеют нормальную веретеновидную форму, гомогенную цитоплазму и четко контурирующее ядро. Окр. по Романовскому. Ув. 100.

Содержание белковосвязанного оксипролина в ростовой среде на 4-е сутки культивирования с брефоматриксом было 21,49±3,14 мкг/мл, что достоверно отличается от контрольных групп: 2,58±0,01 мкг/мл в культуре фибробластов без брефоматрикса; 3,17±0,01 мкг/мл в культуральной среде без фибробластов. Его концентрация положительно коррелировала с общим белком: 9,3±0,01 г/л в опыте, 4,2±0,01 г/л и 5,6±0,01 г/л соответственно в обеих контрольных группах.

Таким образом, деминерализованный брефоостеоматрикс способен оказывать прямое стимулирующее влияние на коллагенсинтезирующие клетки соединительной ткани (фибробласты) в культуре. Это подтверждается значимым повышением содержания белковосвязанного оксипролина и общего белка в ростовой среде. Поскольку брефоматрикс имеет кислый pH<6,0, то при помещении в культуру он образует вокруг себя зоны отсутствия и задержки роста клеток. При помещении на монослой фибробластов брефоостеоматрикса после его нейтрализации с pH 7,0 зон задержки роста клеток вокруг него и

стимуляции биосинтетических процессов не происходит.

В экспериментах на животных мы выявили активное участие макрофагов в рассасывании брефоостеоматрикса. В соответствии с задачами исследования мы получили чистую культуру перитонеальных макрофагов с целью изучения влияния данного биоматериала на активность этих клеток *in vitro.*

В контрольной культуре макрофаги крыс выглядят как крупные клетки разнообразной формы, расположены группами по 3-8 штук, в цитоплазме - от 1 до 3 крупных темных ядер, большое количество гранул и лизосомы, многие из которых, находясь в фагоцитирующем состоянии, формируют фаголизосомы. У отдельных макрофагов 5-6 фаголизосом занимают всю площадь цитоплазмы, окружая ядро (**рис. 9**).

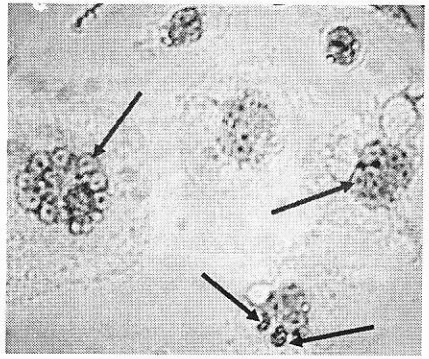


Рис. 9. Первичная культура перитонеальных макрофагов крысы. Стрелками показаны большие фаголизосомы в цитоплазме макрофагов и инородные частицы, поглощенные макрофагами. Окраска нейтральным красным. Ув. 150.

При помещении в культуру макрофагов пластинки брефоматрикса, изготовленного по технологии «Лиопласт» (pH<6,0) уже на 1-е сутки микроскопически определяется прикрепление единичных макрофагов к поверхности пластинки за счет его высоких адгезивных свойств и стимуляции макрофагального хемотаксиса кислой реакцией биоматериала. Через 3 суток количество прикрепившихся макрофагов увеличивается, набухание и деструктуризация брефоостеоматрикса возрастают. Характерно увеличение количества гранул в цитоплазме макрофагов и появление крупных фаголизосом, содержащих поглощенные частички биоматериала (**рис. 10а**).

При помещении в культуру макрофагов пластинки нейтрализованного брефоматрикса на 1-3-и сутки адгезии макрофагов к поверхности пластинки не выявлено. На 3-и сутки также происходят набухание и деструктуризация биоматериала за счёт его растворения в культуральной среде (**рис. 10б**).

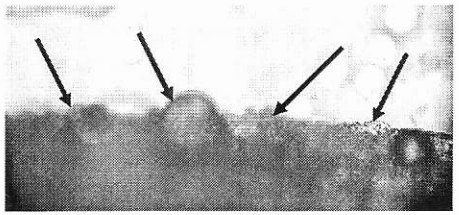


Рис. 10а (pH<6,0).

Рис. 10б (pH 7,0).

Первичная культура перитонеальных макрофагов крысы на 2-е сутки помещения брефоостеоматрикса с pH<6,0 (рис. 10а) и с pH 7,0 (рис. 10б). Стрелками указаны макрофаги, прикрепившиеся к поверхности брефоостеоматрикса. Нативная культура. Инвертированный микроскоп. Ув. 150.

ВЫВОДЫ

1. *In vivo* на новой экспериментальной модели у крыс установлено, что для аллогенного брефоостеоматрикса характерна высокая скорость рассасывания (в течение 2-3-х суток) как за счет его растворения во внутренней среде организма, так и активной резорбции макрофагами и остеокластами. Этот биоматериал ускоряет заживление костной ткани на 5,97% за счет выраженного усиления пролиферации камбиального слоя надкостницы и регенерации по типу костно-хрящевой модели остеогенеза.

2. Исследования системы крови и периферических органов иммуногенеза экспериментальных животных показали, что аллогенный брефоостеоматрикс обладает минимальной антигенностью и не вызывает отрицательных реакций со стороны иммунной системы организма реципиента.

3. Созданная математическая модель в комплексе с кластерным анализом позволяет описать и спрогнозировать характер, динамику и направленность процессов рассасывания биоимплантатов и регенерации костной ткани реципиента, а также подтверждает высокие биопластические и стимулирующие свойства использованного нами аллогенного брефоостеоматрикса.

4. *In vitro* в культуре фибробластов аллогенный брефоостеоматрикс вызывает стимуляцию морфофункциональной активности клеток и синтеза коллагена, что проявляется значимым повышением уровня белковосвязанного оксипролина в ростовой среде в 10 раз (до 21,49 мкг/мл) по сравнению с

контрольной культурой. *In vivo* в крови крыс после имплантации этого биоматериала также отмечается значимое возрастание уровня белковосвязанного оксипролина на 56,77 % по сравнению с нормой.

5. На полученной нами культуре перитонеальных макрофагов установлено, что аллогенный брефоостеоматрикс, изготовленный по технологии «Лиопласт», имеющий кислый pH, обладает мощным стимулирующим воздействием на клетки, что проявляется усилением адгезивной, хемотаксической и фагоцитирующей активности макрофагов. Брефоостеоматрикс с нейтральным pH такого воздействия не оказывает.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Новая экспериментальная модель формирования краевого дефекта в области ости лопатки крыс перспективна для изучения процессов, протекающих в поврежденной костной ткани при имплантации различных костно – пластических материалов.

2. Созданная нами математическая модель процессов репаративного остеогенеза позволяет прогнозировать темпы и особенности заживления костных дефектов у крыс, вследствие чего может быть предложена к использованию для оценки характера остеогенеза в дальнейших научных исследованиях костной регенерации у данного вида животных.

3. *In vitro* перспективным направлением являются исследования биосинтетической активности, а также механизмов и скорости рассасывания различных видов биоимплантатов на культурах фибробластов и макрофагов по изменениям морфофункциональной активности этих клеток.

4. Аллогенный деминерализованный брефоостеоматрикс серии «Лиопласт» оптимален для пластики дефектов костей губчатой, ячеистой структуры, ввиду чего обосновано его широкое применение в травматологии, ортопедии, челюстно-лицевой хирургии и стоматологии.

5. В клинике для оценки регенераторных процессов в костной и соединительной тканях реципиентов можно проводить количественное определение свободного и белковосвязанного оксипролина сыворотки крови.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Белозерцева, Е.А. Использование деминерализованного костного брефоматрикса при пластике костных дефектов после удаления ретенированных нижних зубов «мудрости» / Т.А. Киселева, Т.В. Брайловская, Е.А. Белозерцева // Актуальные проблемы современной науки: Сб. науч. тр. 4-й Междунар. конф. молодых ученых и студентов. Часть 25. - Самара, 2003. – С. 68-71.

2. Belozertzeva, E.A. The application of demineralized brephomatrix in bone defects plasties after the removal of impacted lower wisdom teeth / T.V. Brailovskay, L.T. Volova, E.A. Belozertzeva // 12th International Congress of the European Association of Tissue Banking. Programme & Abstracts. – Brugge, Belgium, 2003. – P. 81.

3. Белозерцева, Е.А. Изучение свойств аллогенного брефоостеоматрикса в эксперименте на животных / Е.А. Белозерцева // Региональная медицинская наука: тенденции и перспективы развития «Аспирантские чтения – 2004»: Тез. докл. V науч. конф. молодых ученых. - Самара, 2004. – С. 401-403.

4. Особенности регенерации костной ткани в условиях аллогенной брефоостеопластики / Л.Т. Волова, Е.А. Белозерцева, И.Н. Наумова, Т.В. Брайловская // Международный морфологический журнал «Морфологические ведомости» (приложение). – Москва – Берлин, 2004. – С. 22.

5. Изучение свойств аллогенного деминерализованного брефоостеоматрикса в эксперименте на животных / Л.Т. Волова, Е.А. Белозерцева, Т.В. Брайловская, И.Н. Наумова // Клинические и фундаментальные аспекты тканевой терапии: теория и практика клеточных биотехнологий: Материалы II Всерос. симпозиума с международным участием. - Самара, 2004. – С. 11-12.

6. Белозерцева, Е.А. Малотравматичный способ удаления ретенированных нижних зубов «мудрости» с пластикой костных дефектов лиофилизированным брефоматриксом. Цитологический мониторинг / Т.А. Киселева, Т.В. Брайловская, Е.А. Белозерцева // Клинические и фундаментальные аспекты тканевой терапии: теория и практика клеточных биотехнологий: Материалы II Всерос. симпозиума с международным участием. - Самара, 2004. – С. 73-74.

7. Белозерцева, Е.А. Изучение свойств аллогенного брефоостеоматрикса в эксперименте на животных и в клеточных культурах / Е.А. Белозерцева: Аспирантский вестник Поволжья. - 2005. № 1 (9). – С. 94.