



УДК 591.121.1
ББК 28.6

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОСТНОГО МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОГО БЕЛКА 2 ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ ОСТЕОРЕГЕНЕРАЦИИ

Семенов Павел Сергеевич

Аспирант кафедры биоинженерии и биоинформатики
Волгоградского государственного университета
medbiolab@gmail.com

Проспект Университетский, 100, 400062 г. Волгоград, Российская Федерация

Аннотация. Заполнение дефектов костной ткани пастой, содержащей фактор роста BMP-2, в эксперименте на крысах оптимизировало течение репаративного процесса в сторону формирования регенерата, приближающегося по клеточному составу трехмерной организации и плотности матрикса к окружающей неповрежденной кости.

Ключевые слова: имплантат, костная ткань, ремоделирование, костный морфогенетический белок 2.

Введение

В последние десятилетия в медицине для лечения травм и дефектов костной ткани наряду с трансплантацией все шире используются альтернативные методы, связанные с применением имплантатов на основе синтетических материалов – металлов, полимеров, керамики, цемента, стеклокристаллических и других композитов [1; 2; 6]. Процесс ассимиляции имплантата в организме сопровождается его частичным или полным растворением, проникновением в имплантат эндогенных протеинов, прорастанием кровеносных сосудов, ростом, размножением и делением клеток с образованием ткани, заполняющей поры имплантата и, наконец, ремоделированием вещества имплантата в натуральную кость [3; 4; 5].

Высокая потребность в остеоиндуктивных материалах стимулировала в медицине в последние 10–15 лет создание нового направления, основанного на применении морфогенетических белков кости (bone morphogenetic proteins, BMP-2, BMP-3... - BMP-15), входящих в суперсемейство ростовых факторов TGF- β [3]. BMPs содержатся в костях, хряще и некоторых других соединительных тканях,

где они определяют интенсивность физиологического ремоделирования и регенерации [7]. Костный морфогенетический белок-2 является гликопротеином, который последовательно производит индукцию развития костей. BMP-2 оказывают плеiotропную функцию, которая варьирует от внескелетного органогенеза к скелетному росту и регенерации. До настоящего времени не сложилось полного представления о регуляторных событиях при восстановлении костной ткани, однако ключевая роль BMP-2 в управлении физиологической регенерацией кости уже не вызывает сомнений. Именно поэтому на основе BMP-2 предпринимаются попытки создать остеоиндуктивные материалы нового поколения.

Цель работы – изучить в эксперименте возможность улучшения заживления костных дефектов за счет создания временных депо BMP-2 в области заживления.

Методика исследования

Исследование проводили на 16 лабораторных животных – самцах крысы линии Wistar 8-месячного возраста массой 240–290 г. Под наркозом (Золетил в дозе 40 мг/кг массы внутривенно) из разреза кожных покровов до 5 мм по наружной поверхности нижней трети

бедра животных путем прокола осуществляли чрезмышечный доступ к эпифизу бедренной кости. С помощью сверла диаметром 1,7 мм формировали канал на глубину 3,0 мм. В первой группе животных в канал пипеткой вводили 5 мг пасты, полученной из разведенного в 2 мл стерильного физиологического раствора порошка препарата «**Gamalant™-паста-ФОРТЕ Плюс**», содержащий ВМР-2 производства в НИИ ЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. В группе сравнения каналы наполняли биоинертным гелевым наполнителем. Через 3 и 6 недель эксперимента животных выводили из эксперимента передозировкой Золетила (200 мг/кг массы), для морфологического исследования забирали костный фрагмент в объеме нижней трети бедра.

Материал фиксировали в 10 % забуференном нейтральном формалине в течение 24 часов, промывали 6 часов в проточной водопроводной воде комнатной температуры. Декальцинацию проводили в аналоге коммерческого препарата «**Cal-Ex ®**» (Fisher Scientific), который представлял собой водный раствор 1,35 N соляной кислоты и 0,003 M ЭДТА, полная декальцинация наступала через 15-20 часов [7]. Промывкой в проточной воде до нейтральной реакции промывочных вод добивались полной отмычки материала от декальцинирующей жидкости. После быстрой проводки материала по спиртам и полного обезвоживания, последний через ксилол заключали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5–7 мкм после депарафинирования окрашивали гематоксилином и эозином, трехцветным методом по Масону, пикрофуксином по Ван-Гизону и заключали в канадский бальзам.

Готовые препараты анализировали с использованием микроскопа «**БИМАМ-13**» (ЛОМО, Россия) и цифровой камеры «**FMA050**» (TopCam, Китай). Морфометрический анализ проводили с применением программного обеспечения «**ImageJ**» (США).

Иммуногистохимическое исследование включало в себя определение маркеров макрофагов/остеокластов CD-68 и клеток остеогенного ряда – остеоостеонектина (наборы Novocastra, Великобритания), подсчитывали численную плотность этих клеток в костной ткани. Для видео документирования и количественного морфологического анализа был

использован компьютерный комплекс «**Видеотест-Морфо**» 3.0 (Россия), программное обеспечение которого позволяло количественно определить градиенты численной плотности клеточных элементов в регенерате и оптической плотности матрикса. Их выражали как отношение между абсолютными показателями в глубокой и поверхностных зонах регенерата/имплантата в безразмерных единицах.

Обработку количественных данных проводили непосредственно из общей матрицы данных Excel 7.0 (Microsoft, USA) с привлечением возможностей программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA) с учетом общепринятых требований для медико-биологических исследований. Для анализа различий между выборками использовали критерий Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение

На месте дефекта кости к 3-й неделе в первой группе обнаруживался практически закрытый надкостницей смешанный регенерат. В поверхностных его слоях происходило образование рыхлой волокнистой соединительной ткани с большим количеством кровеносных сосудов. Глубже лежащие слои содержали островки хрящевой и костной тканей, окруженные соединительной тканью. В группе сравнения в те же сроки ткань представляла собой тонкие пучки коллагеновых волокон и плотно прилежащих друг к другу широких пучков, имеющих продольную ориентацию, многочисленных групп малодифференцированных клеток, большого количества сосудов капиллярного типа с минимальным присутствием истинных островков остеогенеза.

На 6-й неделе эксперимента в основной группе обнаруживали признаки интенсивного остеогенеза: формирующиеся на более ранних сроках очаги хрящевой ткани оссифицировались и сливались с ранее образованными участками губчатой кости. Поверхность регенерата была покрыта надкостницей. В группе сравнения на месте закрытия дефекта остеопластической массой без факторов роста обнаруживали плотный смешанный регенерат с преобладанием костной ткани разной степени зрелости и довольно большими участками неоссифицированного хряща и соединительной ткани. Количество сосудов в глубоких слоях регенерата уменьшалось незначительно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Весьма показательной была динамика градиента численной плотности клеточных элементов. При всей неоднородности и вариабельности распределения клеток в каждом отдельном регенерате, использование этого безразмерного показателя оказалось информативным. В основной группе на 3-й неделе остеогенные клетки были распределены в имплантате равномерно или с некоторым преобладанием в глубоких слоях, то к 6-й неделе их число в глубоких слоях четырехкратно превышало таковое в поверхностных. В группе сравнения градиент плотности остеоцитов к 6-й неделе не превышал 2,5. При использовании BMP-2 градиент численной плотности остеокластов был значительно выше 1,0 уже к 3-й неделе, а к 6-й неделе был зафиксирован градиент более 6. В группе сравнения наблюдали более равномерное распределение остеокластов в регенерате при более высоких абсолютных значениях их численной плотности.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в условиях замещения дефектов костной ткани остеопластической массой, содержащей гидроксиапатит, коллаген и BMP-2, регенеративный процесс имеет лучшие количественные и качественные характеристики, в сравнении с пастой без факторов роста. Процесс ремоделирования в большей степени приближается к органотипичному восстановлению и практически завершается на тканевом уровне к 6-й неделе эксперимента. Полученные нами доказательства выраженного остеоиндуктивного эффекта BMP-2, позволяют использовать его в качестве компонента бесклеточных матриц при замещении области дефектов костной ткани.

1. Калита, В. И. Модификация поверхностных внутрикостных имплантатов: современные исследования и нанотехнологии / В. И. Калита и др. // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2009. – № 4 (32). – С. 17–23.

2. Лябин, М. П. Совершенствование технологии получения хитозана / М. П. Лябин, П. С. Семенов // Вестник Волгоградского государственного университета. Серия 11, Естественные науки. – 2011. – №2 (2). – С. 17–22.

3. Маланин, Д. А. Восстановление повреждений хряща в коленном суставе. / Д. А. Маланин, В. Б. Писарев, В. В. Новочадов. – Волгоград : Волгоградское научное издательство, 2010. – 518 с.

4. Новочадов, В. В. Ремоделирование костной ткани в условиях эндогенной интоксикации / В. В. Новочадов, Н. М. Гайфуллин, Д. М. Фролов, А. А. Бачурин // Вестник Волгоградского государственного университета. Серия 11, Естественные науки. – 2012. – Вып. 2 (4). – С. 19–28.

5. Новочадов, В. В. Остеоинтеграция имплантатов с биоактивной поверхностью, модифицированной напылением хитозана в эксперименте у крыс / В. В. Новочадов, Н. М. Гайфуллин, Д. А. Залевский, П. С. Семенов, В. И. Шемонаев // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. – 2013. – №2. – С. 30–35.

6. Novochadov, Growth factor technologies in cartilage tissue engineering (review) / V. V. Novochadov / V. V. Novochadov // European Journal of Molecular Biotechnology. – 2013. – Vol. 1, №1. – P. 5–10.

7. Wang, Q. Bone morphogenetic protein 2 activates Smad6 gene transcription through bone-specific transcription factor Runx2 / Q. Wang, X. Wei, T. Zhu et al. // J. Biological Chemistry. – 2007. – Vol. 282. – № 14. – P. 10742–10748.

USE OF BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-2 FOR OSSEOREGENERATION STIMULATION

Semenov Pavel Sergeevich

Postgraduate Student, Bioengineering and Bioinformatics Department,
Volograd State University
medbiolab@gmail.com
Prospect Universitetsky, 100, 400062 Volgograd, Russian Federation

Abstract. Filling of bone defects with paste containing the growth factor BMP-2 in the experiment on rats optimized the reparative process towards the formation of the regenerate similar to the surrounding intact bone in cellular composition, three-dimensional organization, and matrix density.

Key words: implant, bone, tissue remodeling, bone morphogenetic protein 2.