УДК 51-76:612

К ВОПРОСУ О ФИКСАЦИИ ТКАНЕ-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ НА ПОВЕРХНОСТИ ГИАЛИНОВОГО ХРЯЩА

Ю.В. Жеребцова¹, В.В. Трушников², Ю.А. Нащекина¹, П.О. Никонов¹,
Д.Б. Вчерашний³, С.В. Новосельцев⁴, В.Н. Круглов⁵

¹Институт Цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург

²ФГБУ «НМИЦ ТО им. Р.Р. Вредена» Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Санкт-Петербург

³ФГБУН «Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе» Российской академии наук, Санкт-Петербург

⁴ЧАНО ДПО «Северо-Западная академия остеопатии и медицинской психологии», Санкт-Петербург

⁵Частное учреждение образовательная организация высшего образования
«Медицинский университет «Реавиз», Самара

Резюме. Работа посвящена экспериментальному обоснованию методик фиксации ткане-инженерных конструкций на поверхности гиалинового хряща в эксперименте.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Ключевые слова: тканевая инженерия; экспериментальная физиология.

Для цитирования: Жеребцова Ю.В., Трушников В.В., Нащекина Ю.А., Никонов П.О., Вчерашний Д.Б., Новосельцев С.В., Круглов В.Н. К вопросу о фиксации ткане-инженерных конструкций на поверхности гиалинового хряща. *Вестник медицинского института «Реавиз». Реабилитация, Врач и Здоровье.* 2020;6(48):32–37. <https://doi.org/10.20340/vmi-rvz.2020.6.4>

ON FIXATION OF TISSUE-ENGINEERED STRUCTURES ON THE SURFACE OF HYALINE CARTILAGE

Y.V. Zherebtsova¹, V.V. Trushnikov², Y.A. Nashchekina¹, P.O. Nikonov¹,
D.B. Vcherashniy³, S.V. Novoseltsev⁴, V.N. Kruglov⁵

¹Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg

²NMITS TO im. R.R. Harmful, St. Petersburg

³Physico-Technical Institute named after A.F. Ioffe Russian Academy of Sciences, St. Petersburg

⁴North-West Academy of Osteopathy and Medical Psychology, St. Petersburg

⁵Medical University "Reaviz", Samara

Abstract. The work is devoted to the experimental substantiation of the techniques for fixing tissue-engineered structures on the surface of the hyaline cartilage in the experiment.

Conflict of interest. The authors declare that they have no conflicts of interest.

Financing. The study was conducted without sponsorship.

Key words: tissue engineering; experimental physiology.

Cite as: Zherebtsova Yu.V., Trushnikov V.V., Nashchekina Yu.A., Nikonov P.O., Vcherashniy D.B., Novoseltsev S.V., Kruglov V.N. On fixation of tissue-engineered structures on the surface of hyaline cartilage *Bulletin of the Medical Institute Reaviz. Rehabilitation, Doctor and Health.* 2020;6(48):32–37. <https://doi.org/10.20340/vmi-rvz.2020.6.4>

Введение

Повреждение гиалинового хряща является актуальной проблемой для миллионов пациентов. Существующая консервативная терапия не полностью решает данную задачу, а эндопротезирование крупных суставов является сложной высокоинвазивной дорогостоящей процедурой.

Одной из перспективных технологий представляется метод тканевой инженерии (ТИ), который является динамично развивающимся направлением науки [1]. Этот метод особенно актуален в травматологии и ортопедии, поскольку в этой области медицины на первое место выходят биофизические параметры трансплантированного объекта, и только во вторую очередь – характеристики его клеточной составляющей [2].

Для внедрения данной методики в клиническую практику необходима серия экспериментов по трансплантации и фиксации продукта ТИ в области повреждения с целью анализа эффективности его применения у экспериментальных животных в течение длительного времени.

Целью этой работы являлась оценка фиксации ткане-инженерной конструкции на основе полилактида (PLA) в дефектах гиалинового хряща.

Материалы и методы исследования

Приготовление биodeградируемого носителя. При изготовлении полимера в качестве основы использовали поли-L-лактид-полимер вязкостью 4.0 дл/г (Sigma, США). Полимер растворяли в диоксане («Реактив», Россия) до конечной концентрации 5 %. В этот раствор при перемешивании добавляли 5 % раствора коллагена концентрацией 0,1 мг/мл. Полученную суспензию замораживали при температуре –20 °С на 24 часа. После заморозки полученного полимера, его высушивали в лиофилизаторе при давлении 1 Торр в течение 6 часов. Далее приготовленные образцы стерилизовали в озонаторе в течение 90 мин., а непосредственно перед транс-

плантацией из него получали цилиндры высотой 3,0 мм и диаметрами 3,0 и 6,0 мм.

Создание дефекта у экспериментальных животных. Исследование выполнено на 8-ми половозрелых самках кролика породы «Советская Шиншилла». Экспериментальная работа прошла все необходимые этические экспертизы и соответствовала международным рекомендациям по проведению медицинских исследований с использованием животных. Все кролики были случайным образом разделены на 2 группы (4+4).

Наружным парapatеллярным способом вскрывали суставную сумку в области коленного сустава, отодвигали надколенник, обнажали мышелки бедра. В положении сгибания коленного сустава формировали дефект в нагружаемой зоне с помощью бор-машины и специально разработанного ограничителя [3] для создания повреждений заданного размера ($d = 3,0$ мм и $d = 6,0$ мм). Животным опытной группы в дефект трансплантировали полилактидный биodeградируемый носитель, в контрольной группе трансплантацию не осуществляли. Далее коленный сустав разгибали, рассасывающейся нитью 3/0 сшивали суставную сумку, окружающие ткани послойно ушивали, на кожу накладывали швы по Холстеду.

После операции животных помещали по одной особи в клетке при температуре 18–26 °С и относительной влажности 30–70 % в условиях принудительной вентиляции и искусственного освещения (по 12 часов темного и светлого времени). На седьмые сутки выполняли эвтаназию животных с помощью раствора тиопентала натрия.

Фиксация и вырезка препаратов для дальнейших гистологических исследований. С целью предотвратить разложение тканевых структур все образцы были на 72 часа помещены в 10 % забуференный формалин. После этого с помощью фрезы толщиной 0,5 мм на частоте вращения 30000 оборотов в минуту в условиях

охлаждения были вырезаны фрагменты тканей. Охлаждение необходимо во избежание локального перегрева тканей в непосредственной близости от места разреза. Степень фиксации ТИК внутри созданного повреждения гиалинового хряща оценивали визуально.

Результаты и их обсуждение

Через 7 суток с момента создания дефекта все повреждения диаметром как 3,0 мм, так и 6,0 мм, созданные на поверхности гиалинового хряща, были явно визуализированы (рис. 1). В образцах без применения полимера регенеративных изменений не отмечено в отличие от образцов с трансплантированным PLA. Полимер инте-

грировался в области хирургического вмешательства только в области дефектов диаметром 3 мм. На сроке 7 суток при трансплантации полимера в область дефекта диаметром 6,0 мм он не закреплён прочно в области повреждения.

С целью уменьшения времени декальцинации, для снижения нагрева и улучшения теплоотвода была использована фреза толщиной 0,5 мм. Промежуточный этап создания таких препаратов представлен ниже на рис. 2.

В данной работе выполнено моделирование двух различных дефектов диаметрами 3,0 и 6,0 мм. В качестве экспериментального животного использовались кролики породы Шиншилла.

Дефект 3 мм без полимера. Визуализируется сферическое повреждение без признаков замещения дефекта регенератом

Дефект 3 мм с полимером. Область дефекта заполнена адгезированным полимерным носителем (светлый регенерат на поверхности гиалинового хряща)

Дефект 6 мм без полимера. Визуализируется сферическое повреждение без признаков замещения дефекта регенератом

Дефект 6 мм с полимером. Область дефекта заполнена полимерным носителем, но недостаточна адгезия к зоне дефекта

Рис. 1. Фото области повреждения после 7-ми суток с момента создания дефекта

Дефект 3 мм без полимера. Визуализируется сферическое повреждение без признаков замещения дефекта регенератом

Дефект 3 мм с полимером. Область дефекта заполнена прочно адгезированным полимерным носителем (светлый регенерат на поверхности гиалинового хряща)

Дефект 6 мм без полимера. Визуализируется значительное сферическое повреждение без признаков замещения дефекта регенератом

Дефект 6 мм с полимером. Область дефекта заполнена полимерным носителем без достаточной адгезии к зоне дефекта

Рис. 2. Фото области повреждения после 7-ми суток с момента создания дефекта после вырезки перифокальной области дефекта

Следует обратить внимание, что помимо кролика, для эксперимента доступны мышь, крыса и овца. Мышь и крыса, в связи с доступностью, являются популярными объектами для таких исследований. Однако, геометрические размеры коленного сустава, на котором в основном и проводятся оперативные вмешательства, накладывают операционные сложности как на создание дефекта, так и анализ полученных результатов. Выбор овцы в качестве объекта для моделирования дефекта и применения ТИК наиболее предпочтителен, однако стоимость таких экспериментов значительно выше [4].

Биодеградируемым носителем являлся поли-L-лактид. В настоящее время именно

PLA является золотым стандартом для тканевой инженерии [5].

Другим важным вопросом является выбор вида, размера и формы создаваемого дефекта, а также способа фиксации ТИК конструкции на поверхности гиалинового хряща. В результате создания повреждения 6,0 мм в диаметре, граница повреждения почти достигает границ мышечка, и велик риск получить большее повреждение в ходе операционного вмешательства. Выбор 3,0 мм в качестве диаметра повреждения позволило получить стабильные дефекты на поверхности гиалинового хряща без потери биодеградируемого носителя, в отличие от выбора дефекта в 6,0 мм, где это наблюдается.

Для создания повреждения использовано фрезерное воздействие на высоких оборотах. По мнению авторов, адгезирование полилактидного носителя происходит не только за счет трения, но и за счет пролиферации клеточной культуры на границе сред (неповреждённый хрящ – полимер). Данный вопрос требует проведения дополнительных исследований. При анализе результатов на 7-е сутки наблюдения не было отмечено признаков воспалений, нагноений и (или) смертей экспериментальных животных, что согласуется с результатами, полученными другими авторами [6, 7].

После выведения животных из экспериментов, была выполнена декальцинация образцов тканей для получения гистологических срезов. С целью уменьшения зоны декальцинации было использовано фрезерное воздействие с охлаждением образцов путем периодического смачивания в растворе формалина. Область дефекта не повреждалась за счёт высокой скорости вращения фрезы и охлаждения. В результате удалось добиться снижения линейных размеров образца до 8,0×8,0×8,0 мм. Это позволило уменьшить время декальцинации до 4 недель, поскольку выведение кальция наиболее эффективно из более тонких образцов, уместить образец в стандартную гистологическую кассету для последующей проводки, одновременно сохранив зону дефекта (и регенеративных образований) для последующего анализа.

Заключение

Метод фиксации биodeградируемого носителя в области смоделированного цилиндрического поверхностного дефекта хряща коленного сустава кролика диаметром 3,0 мм является эффективным, что и было продемонстрировано в опытной группе животных.

Выводы:

1. Применение PLA в качестве скаффолда для клеточной культуры является эффективным и безопасным на экспериментальной модели поверхностного дефекта гиалинового хряща у кролика.
2. Использование высокооборотного фрезерного воздействия позволяет подготовить вышеописанные образцы препаратов для декальцинации и дальнейших гистологических исследований.
3. В проведенных экспериментах по трансплантации ТИК в область дефектов гиалинового хряща коленного сустава у кроликов оптимальным размером повреждения суставной поверхности является дефект цилиндрической формы диаметром 3,0 мм.

Список сокращений

ТИ – тканевая инженерия
ТИК – ткане-инженерная конструкция
PLA – полилактид

Литература/Reference

- 1 R. Langer JV. Tissue enginneging. *Science* (80-). 1993;260(5110):920-926. <https://doi.org/10.1126/science.8493529>.
- 2 Bozhokin M., Bozhkova S., Netyl'ko G. Vozmozhnosti sovremennyh kletochnyh tekhnologij dlya vostanovleniya povrezhdenogo sustavnogo hryashcha (analiticheskij obzor literatury). *Travmatologiya i ortopediya Rossii*. Published online 2016.
- 3 Bozhokin M.S., Bozhkova S.A. Ustrojstvo dlya formirovaniya standartizirovannyh defektov hryashchevoj poverhnosti sustavov v eksperimente. VAA Published online 2017.
- 4 Nashchekina Yu., Veselova T.V., Nikonov P.O. BMI. The study of the effect of polylactide scaffold and bone marrow stromal cells on reparative bone formation of the defect in the rabbit's mandible. No Title. *Hum Gene Ther*. 2015;26(10):195.
- 5 Araque-Monrós MC, García-Cruz DM, Escobar-Ivirico JL, Gil-Santos L, Monleón-Pradas M, Más-Estellés J. Regenerative and Resorbable PLA/HA Hybrid Construct for Tendon/Ligament Tissue Engineering. *Ann Biomed Eng*. Published online 2020. <https://doi.org/10.1007/s10439-019-02403-0>

- 6 Nashchekina Yu., Samusenko I., Zorin I., Kukhareva L., Bilibin A. MB. Poly(D,L-lactide)/PEG blend films for keratinocyte cultivation and skin reconstruction No Title. *Biomed Mater.* Published online 2019. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ab3aa2>
- 7 Hominec V.V., Mihajlov S.V., Shakun D.A. et al. Rezul'taty ortotopicheskoy implantacii tkaneinzhenernogo ekvivalenta kosti na osnove polilaktidnogo matriksa i mul'tipotentnyh mezenhimal'nyh stromal'nyh kletokle. *Vestnik Rossijskoj Voenno-meditsinskoj akademii.* 2016;55(3):105-107.

Авторская справка

**Жеребцова Юлия
Владиславовна**

старший лаборант-исследователь, Институт Цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия
e-mail: juliazh@yandex.ru
ORCID 0000-0001-5459-4447

**Трушников Владислав
Вячеславович**

заведующий патологоанатомическим отделением, НМИЦ ТО им. Р.Р. Вредена Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия
e-mail: trushnikov@list.ru
ORCID 0000-0002-9067-5137

**Нащекина Юлия
Александровна**

старший научный сотрудник, Институт Цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия
ORCID 0000-0002-4371-7445

**Никонов Павел
Олегович**

лаборант-исследователь, Институт Цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия
ORCID 0000-0002-0821-8042

**Вчерашний Даниил
Борисович**

кандидат физико-математических наук, научный сотрудник, Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия
ORCID 0000-0003-1658-789X

**Новосельцев
Святослав Валерьевич**

доктор медицинских наук, ректор, Северо-Западная академия остеопатии и медицинской психологии», Санкт-Петербург, Россия
e-mail: snovoselcev@mail.ru
ORCID 0000-0002-0596-2343

**Круглов Валерий
Николаевич**

доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической медицины последипломного образования, Медицинский университет «Реавиз», Самара, Россия
e-mail: cvn01@mail.ru
ORCID 0000-0002-4415-5093