ISSN 2524-0684 ISSNe 2524-0692

УДК 616.71:616-003.93-036.838
DOI 10.53065/kaznmu.2022.56.71.008

ТУЛЕУБАЕВ Б.Е.[1], ТАШМЕТОВ Э.Р.[1], САГИНОВА Д.А.[2], КОШАНОВА А.А.[1]

[1] Медицинский университет Караганды, Караганда.
[2] Национальный научный центр травматологии и ортопедии им. академика Н.Д.Батпенова, Нур-Султан.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОГО ДЕФЕКТА ПРИ ПРИМЕНЕНИИ КОСТНОГО АЛЛОГРАФТА В СОЧЕТАНИИ С АУТОПЛАЗМОЙ, ОБОГАЩЁННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ

Аннотация.

Плазма, обогощенная тромбоцитами, широко используется для регенерации костной ткани, так как факторы роста, высвобождаемые из активированных тромбоцитов, оказывают остеоиндуктивное действие на костные клетки. Хотя большинство доклинических и клинических исследований показывают, что концентраты тромбоцитов улучшают результаты процедур регенерации костей, в некоторых исследованиях сообщается о противоречивых результатах и даже о негативном влиянии на заживление костной ткани.

Исследование проводилось на 32 лабораторных кроликах одного вида, сопоставимого веса и возраста. Костные аллографты полдготовлены по Марбурской системе костного банка. Обогащенную тромбоцитами плазму (PRP) получали методом двойного центрифугирования. У кроликов под общим обезболиванием моделировался костный дефект бедренной кости диаметром 5 мм и глубиной 10 мм. В зависимости от материала, использованного для замещения костного дефекта, сформированы 2 группы: в 1 группе – дефект заполнялся аллографтом; во 2 группе – аллографтом в сочетании с аутоплазмой, обогощенной тромбоцитами. После имплантации, по истечении 14 и 30 дней, по 8 кроликов из каждой группы выводились из эксперимента для забора материала. Репаративную регенерацию костной ткани оценивали с помощью гистологического, гистохимического методов исследования.

ISSN 2524-0684 ISSNe 2524-0692

Результаты показали, что в костном дефекте в разной степени образовывалась новая кость. В группе с PRP на 14 сутки среднее количество остеобластов и остеоцитов было значительно больше (p <0,05), чем в 1 группе, в то время как по количеству остеокластов различий не обнаружено (p=686). Также в группе с PRP отмечалось большее количество новообразованной костной ткани в зоне дефекта по сравнению с группой без PRP (p=0,04). На 30-сутки по количеству остеобластов и остеоцитов статистически значимой разницы между группами не обнаружено (p=0.343 и p=0,716 соответственно). Соотношение костной ткани в зоне дефекта в группе с PRP было выше, чем в группе без PRP (p=0,987). Использование аллогенной кости в сочетании с PRP может стать частью комплексной стратегии в лечении костных дефектов.

Ключевые слова: Костный аллографт, костный дефект, PRP, Марбургская система костного банка.

Ежегодно увеличивается количество дефектов костной ткани больших размеров, требующих заполнения их костно-пластическим материалом, , что связано с ростом не только высокоэнергетических травм, сопровождающихся большими разрушениями костей, но и костно-пластических операций и их осложнений [1, 2].

Аутокость является «золотым стандартом» заполнения костно-пластическим материалом. Аутокость не вызывает иммунологических реакций, одновременно она обладает как остеоиндукторными, так и остеокондукторными свойствами, причем остеоиндуктивные представлены клетками костной ткани и факторами роста. Однако, недостаточное количество получаемой аутокости и дополнительная травма, наносимая при заборе, ограничивают ее применение в клинической практике [3,4]. Альтернативным методом является применение костных аллотрансплантатов, которые помогают сохранить присущие аутотрансплантату остеокондуктивные свойства и минимизировать распространение болезни трансплантата против хозяина. Остеоиндуктивная способность обработанной (лиофилизированной, замороженной или термически обработанной) аллогенной кости все еще остается неопределенной; поскольку клетки-остеопрогениторы разрушаются во время обработки ткани. В результате остеоиндуктивный материал сохраняется только частично, что может привести к неоптимальным клиническим эффектам [5,6].

Исследование процессов регуляции остеогенеза позволило отметить роль факторов роста как в инициации остеогенеза, так и в ее регулировании [7]. В данный процесс вовлечено огромное множество различных цитокинов.

ISSN 2524-0684 ISSNe 2524-0692

На данном этапе применение потенциала цитокинов возможно при использовании обогащенной тромбоцитами плазмы (PRP) [8]. При активации тромбоциты изменяют свою форму и выделяют специфические биологические факторы роста. Благодаря обилию факторов роста плазма, обогащённая тромбоцитами, обладает потенциалом, стимулирующим процессы остеогенеза и регенерации как в твердых, так и в мягких тканях. Помимо факторов роста, плазма, обогащённая тромбоцитами, содержит некоторые белки плазмы - фибриноген, протромбин и др., которые также оказывают влияние на процессы регенерации, являясь матрицей для миграции клеток [9,10].

В настоящее время накоплен большой объем исследований, касающихся влияния PRP на регенерацию костной ткани экспериментальных животных. Ученые используют различные комбинации PRP с имплантационными материалами, трансплантатами, биологически активными веществами. Однако эти исследования дают противоречивые результаты относительно формирования и созревания костной ткани [11-13]. Проведение дальнейших исследований в данном направлении является одним из актуальных вопросов современной травматологии и ортопедии. Целью данного исследования является изучение морфологических признаков репаративной регенерации костной ткани при применении костного аллографта, заготовленного по Марбурской системе костного банка в комбинации с аутоплазмой, обогощенной тробмоцитами, на модели костного дефекта у кроликов.

Материалы и методы. Подготовка костных аллотрансплантатов. Для данного исследования в качестве костного аллографта использовались головки бедренных костей, полученные от живого донора (у пациентов после эндопротезирования тазобедренного сустава) в соответствии с законодательством Республики Казахстан. В эксперимент включались головки бедренных костей диаметром 50-55 мм, без видимых повреждений. Костные аллотрансплантаты перфорировали по разработанной методике [14]. В головке бедренной кости с помощью специального приспособления были сделаны перфорации на равном расстоянии друг от друга. Далее проводили термообработку по системе Marburg Bone Bank System в стерилизаторе Lobator sd-2 (фирма Telos, Германия) согласно инструкции [15].

Подготовка PRP. Перед операцией (примерно за 30 мин до трансплантации) из сердца кроликов отбирали примерно 5 мл крови в силиконовые пробирки, содержащие 3,8% цитрата натрия в соотношении кровь: цитрат- 9:1 [16]. Обогащенную тромбоцитами плазму (PRP) получали методом двойного центрифугирования с помощью лабораторной центрифуги (ОПн-12 «Плазма», Дастан, Кыргызстан). На первом этапе проводили

ISSN 2524-0684 ISSNe 2524-0692

разделение элементов клеток крови. Пробирки центрифугировали при 1500 G в течение 10 минут при комнатной температуре, в результате чего образовались два основных компонента: компонент клеток крови (ККК) в нижней фракции и компонент сыворотки (КС) в верхней фракции. Чтобы увеличить общее количество тромбоцитов, проведено второе центрифугирование. Компонент сыворотки (КС), собранный выше точки разделения двух компонентов, был перенесен в другую вакуумную пробирку на 5 мл без антикоагулянта. Затем образец повторно центрифугировали при 100 G в течение 10 минут с получением двух компонентов: обедненной тромбоцитами аутоплазмы и обогащённой тромбоцитами аутоплазм. PRP (примерно 0,5 мл) отделили от остальной плазмы. 0,5 мл PRP в сочетании с 0,3 г костного аллотрансплантата заполнили созданный дефект.

Процедуры и животные. Для исследования приобретено 32 беспородных взрослых кролика массой 2225 ± 63 г. Все животные были помещены в клетки и акклиматизированы в течение 2 недель. На всех этапах исследований соблюдалась Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (2010 г.). Все процедуры одобрены Этическим комитетом Карагандинского медицинского университета (№6 от 30.09.2020). На протяжении всего исследования кроликов содержали при комнатной температуре (22 ± 2 °C), влажности 40-50% и 12-часовом цикле света-темноты. Кроликов кормили стандартными гранулами питания кроликов и водопроводной водой.

Случайным образом животных разделили на 2 экспериментальные группы (n=16 в каждой группе), и все они подверглись одинаковым хирургическим манипуляциям. За 3 часа до операции кроликам внутримышечно (в/м) вводили гентамицин 0,1 мл/кг (MAPICHEM, Швейцария). Затем животным вводили наркоз внутримышечным Золетила 0,1 мг/кг (Вирбак, США) и Рометара 5 мг/кг (Биовета, Чехия). Костные дефекты формировали в метафизе бедренной кости при помощи сверла диаметром 5 мм на глубину 10 мм. В 1 группе костные дефекты были заполнены перфорированным костным аллотрансплантатом. Во 2 группе - перфорированным костным аллотрансплантатом с PRP. Операционную рану ушивали рассасывающимися швами (5-0 Vicryl, Ethicon, Johnson & Johnson, США). После операции каждое животное получало в.м. инъекции гентамицина 0,1 мл/кг (MAPICHEM, Швейцария) и кетонала 0,04 мл/кг (Sandoz, Словения) один раз в сутки в течение 3 дней. Послеоперационное наблюдение проводили ежедневно для контроля процесса заживления по заранее спланированному графику в течение 30 дней. Осложнений и летальных исходов в послеоперационном периоде не наблюдалось. На 14-й и 30-й день животных выводили из эксперимента передозировкой анестетиков и проводили забор ткани из дистального отдела бедренной кости.

ISSN 2524-0684 ISSNe 2524-0692

Гистопатологическое исследование. Объектом для гистопатологического исследования являлся костный фрагмент со сформированным дефектом. После проведения макроскопического исследования репрезентативного фрагмента бедренной кости, полученный материал фиксировали в 10% растворе нейтрального забуферизированного формалина на 24 часа и декальцинировали в растворе «Biodec R» (Bio-Optica Milano SPA) в течение 24 ч., после чего выполнялась промывка образцов в фосфатном буфере (pH = 7,4). После оптимального размягчения костной ткани (декальцинации) проводился фронтальный разрез кости. Ткань фиксировали в 10% формалине при 4°C на 24 часа, промывали водопроводной водой и обезвоживали серией возрастающих концентраций этилового спирта (70%, 90%, 95%, 100%), затем погружали в раствор ксилола и заливали в парафиновые блоки. Срезы тканей толщиной 5 мкм делали на санном микротоме «Leica SM 2000R». Срезы трижды промывали водопроводной водой и окрашивали гематоксилином в течение 40 секунд. Срезы депарафинировали в растворе ксилола, а затем обезвоживали в серии растворов этилового спиртапонижающихся концентраций (100%, 96% и 70%). Затем срезы окрашивали гемотоксилином и эозином и по трихромной окраской по Массону. Окраску гематоксилином и эозином использовали для определения общей морфологии тканей, клеточного состава дефекта костной пластинки и воспалительной модели. Для гистологической оценки остеогенеза использовали трихромную окраску по Массону. По Массону костная ткань и коллаген окрасились в синий цвет.

Микроскопическое исследование препаратов производилось при помощи микроскопа Zeiss AxioLab 4.0 при увеличениях x100, x200 и x400. Для анализа и фотографирования изображений использована программа AxioVision 7.2 для Windows. Морфометрическую оценку проводили в том же месте, где проводилось оперативное вмешательство (сформированный дефект). Подсчет клеточного состава дефекта костной пластинки (остеокласты, остеобласты и остеоциты) проводили на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином: при помощи сетки Автандилова на площади дефекта подсчитано число остеокластов, остеобластов и остеоцитов на 1000 клеток , и полученные средние значения выражены с точностью до 2 десятичных знаков после запятой для каждой группы.

Подсчет количества сосудов проводился на площади репрезентативного среза ткани в пределах зоны дефекта в 10 полях зрения. Ангиогенез оценивался в соответствии со следующей шкалой «0 баллов» - отсутствует, «1 балл» - единичные сосуды (от 1 до 5), «2 балла» более 5 сосудов, расположенные хаотично, «3 балла»- множественные пучки, равномерное распределение.

ISSN 2524-0684 ISSNe 2524-0692

Репаративная модель (полиморфноядерные лейкоциты и лимфогистиоцитарная инфильтрация) оценивалась в баллах по следующей шкале: «0 баллов» - отсутствует, «1 балл» - от 1 до 5 клеток, «2 балла» - очаговая (фокальная) инфильтрация, «3 балла» - диффузная инфильтрация.

При гистопатологическом анализе тканевого состава области сформированного дефекта оценивалось процентное соотношение фиброзной, хрящевой и костной тканей. Вся поверхность каждого места дефекта кости изучена микроскопически при х10-кратном увеличении.

Статистический анализ. Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ Excel 2016 (Microsoft Corporation, USA) и программного обеспечения STATISTICA 13.0 (StatSoft, USA). Описание каждого критерия проводилась с помощью метода описательной статистики. Все экспериментальные значения представлены в виде среднего и стандартного отклонения (SD). Сравнения между двумя группами выполнены с помощью критерия хи-квадрат с коррекцией непрерывности Йетса, множественные сравнения выполнены с помощью критерия хи-квадрат Пирсона. Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью IBM SPSS Statistics 20.0. Значение $p < 0,05$ сочтено статистически значимым.

Результаты. В таблице 1 представлены результаты гистологической и морфометрической характеристик реактивной воспалительной модели и ангиогенеза, ассоциированных с репарацией костного дефекта.

Как видно из таблицы 1, количество полимофноядерных лейкоцитов и лимфогистиоцитарная инфильтрация в обоих группах незначительны, а статистических значимых различий на 14 и 30 сутки между группами не обнаружено. Эозинофилов, очагов некроза и апоптоза, ассоциированных с воспалением в обеих группах также не выявлено. В группе, где применялась PRP, ангиогенез сосудов на 14 сутки выражен значительнее, отмечалось наличие множественных пучков сосудов, равномерно распределенных. В группе с аллографтом в области костного дефекта сосуды были расположены хаотично в небольшом количестве ($p < 0.05$). На 30 сутки гистологическая характеристика реактивной воспалительной схемы и ангиогенеза статистически значимо в группах не различалась ($p > 0.05$).

ISSN 2524-0684 ISSNe 2524-0692

Таблица 1 - Гистологическая и морфометрическая характеристика реактивной воспалительной модели и ангиогенеза, ассоциированных с репарацией костного дефекта (окраска гематоксилином и эозином)

№ п/п	Наименование показателя	1 группа	2 группа	p-value
День 14				
1	Полиморфноядерные лейкоциты*	1.25±0.5	1.0±0.0	0,686
2	Лимфогистиоцитарный инфильтрат*	2.5±0.5	1.8±0.5	0.686
3	Эозинофилы	-	-	-
4	Ангиогенез**	1.6±0.5	2.5±0.5	<0.001
5	Некроз и апоптоз, ассоциированные с воспалением	-	-	-
День 30				
1	Полиморфноядерные лейкоциты*	-	-	-
2	Лимфогистиоцитарный инфильтрат*	1.5±0.5	1.0±0.0	0.686
3	Эозинофилы	-	-	-
4	Ангиогенез **	2.2±0.5	2.6±0.4	0.343
5	Некроз и апоптоз, ассоциированные с воспалением	-	-	-
* «0 баллов» - отсутствует, «1 балл» - от 1 до 5 клеток, «2 балла» - очаговая (фокальная) инфильтрация, «3 балла» - диффузная инфильтрация. ** «0 баллов» - отсутствует, «1 балл» - единичные сосуды (от 1 до 5), «2 балла» - более 5 сосудов, расположенные хаотично, «3 балла» - множественные пучки, равномерное распределение. Данные представлены как среднее значение ±стандартная ошибка среднего				

Однако, во 2-й группе формирующееся микроциркуляторное русло имело тенденцию равномерного распределения (рисунок 1).

ISSN 2524-0684 ISSNe 2524-0692

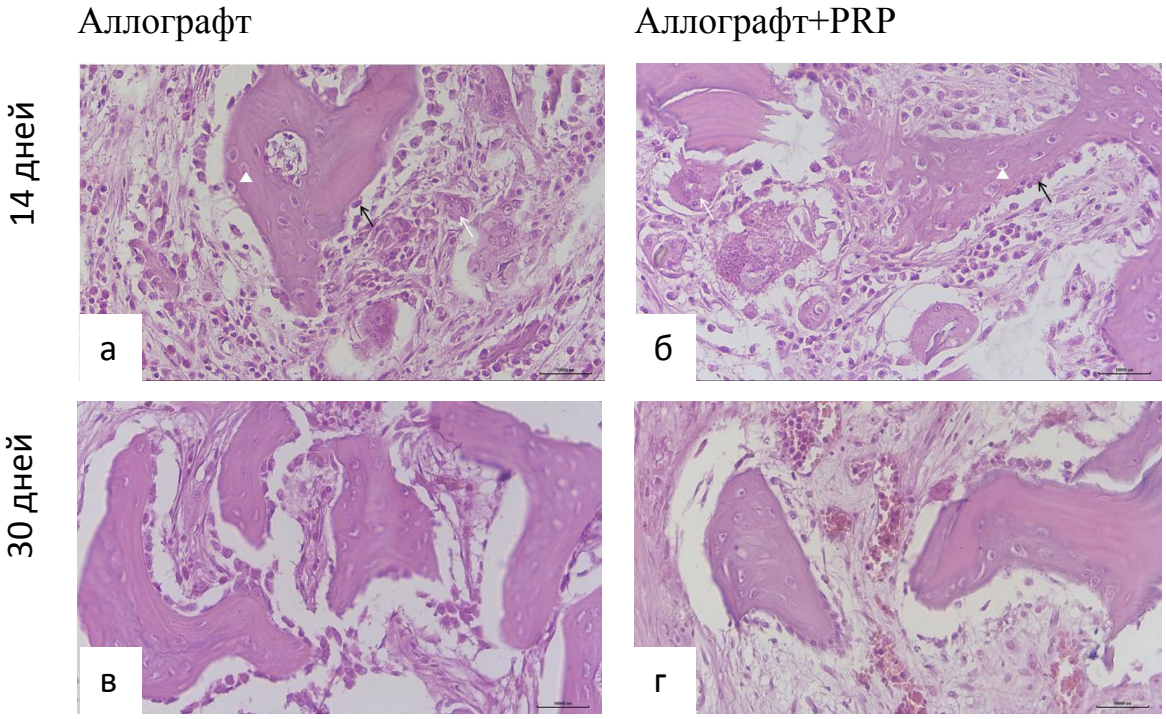


Рисунок 1 - Гистологические срезы через 14 и 30 дней после имплантации: а, б - на поверхности кости наблюдаются остеобласты (черная стрелка) и гигантские многоядерные остеокласты (белая стрелка); остеоциты (наконечник стрелки), окруженные костным матриксом; в, г - костная ткань представлена в виде хаотично расположенных костных балок и шнуров для организации пластинчатых структур (ГЭ × 100)

Среднее количество костных клеток в области дефекта на 14 день в первой группе было статистически значимо выше по сравнению со второй (таблица 2). В 1 группе количество остеобластов составило 296±25.4 клеток, остеокластов 10.0±7.4 клеток и остеоцитов - 212.5±24.7 клеток на 1000 клеток в площади зоны дефекта. Во 2 группе количество остеобластов, остеокластов и остеоцитов составило 395 ± 18.7, 8.3 ± 5.6 и 320.3± 38.9, соответственно. На 30 сутки во второй группе превалировало количество остеобластов и остеоцитов.

ISSN 2524-0684 ISSNe 2524-0692

Таблица 2 - Гистологическая и морфометрическая характеристика клеточного состава дефекта костной пластинки (окраска гематоксилин и эозин)

№ п/п	Наименование показателя*	1 группа	2 группа	p-value
День 14				
1	Остеобласты	296 ± 25.4	395 ± 18.7	<0.05
2	Остеокласты	10.0 ± 7.4	8.3 ± 5.6	0.686
3	Остеоциты	212.5 ± 24.7	320.3 ± 38.9	<0.05
День 30				
1	Остеобласты	357.5 ± 63.2	405.5 ± 43.9	0.343
2	Остеокласты	18.7 ± 11.9	5.5 ± 2.4	<0.05
3	Остеоциты	405.5 ± 21.9	434.7 ± 21.8	0,716
* на 1000 клеток на площади зоны дефекта данные представлены как среднее ± стандартное отклонение				

В обеих группах на 14 сутки у всех животных в области дефекта наблюдалось образование новой кости (рисунок 2). Однако, средняя площадь костной ткани в первой группе составляла 43.3 ± 6.5, а во второй 55,5± 9.5 (таблица 3).

Таблица 3 - Гистологическаяи морфометрическая характеристика тканевого состава дефекта костной пластинки (окраска трихромом Массона)

№ п/п	Наименование показателя, %	1 группа	2 группа	p-value
День 14				
1	Фиброзная ткань	45.1 ± 4.4	37.4 ± 4.3	0.200
2	Хрящевая ткань	11.6 ± 1.2	7.1 ± 3.9	0.057
3	Костная ткань	43.3 ± 6.5	55.5 ± 9.5	0.04
День 30				
1	Фиброзная ткань	11.6±4.5	7.7±4.3	0.200
2	Хрящевая ткань	9.2±4.2	9.4±3.3	0.200
3	Костная ткань	79.2±5.5	82.9±6.4	0.987
данные представлены как среднее ± стандартное отклонение				

ISSN 2524-0684 ISSNe 2524-0692

Новообразованная кость в первой группе в виде трабекулярной сетки примыкала к частицам трансплантата и представляла жизнеспособную кость, лакуны с остеоцитами и многочисленными сосудистыми каналами. Костные балки новообразованной костной ткани гетерогенные, преимущественно тонкие с фокальными мостовидными участками и единичными контактами, преимущественно на полюсах костных балок. Присутствие фиброзной ткани характеризовалось фокальным образованием волокон грубой волокнистой соединительной ткани, преимущественно на периферии костного аллографта, без распространения за пределы репрезентативной зоны костного дефекта. Средняя площадь фиброзной ткани на 14 сутки в группе с перфорированным аллографтом составила 45.1 ± 4.4%, а хрящевой ткани - 11.6 ± 1.2%.

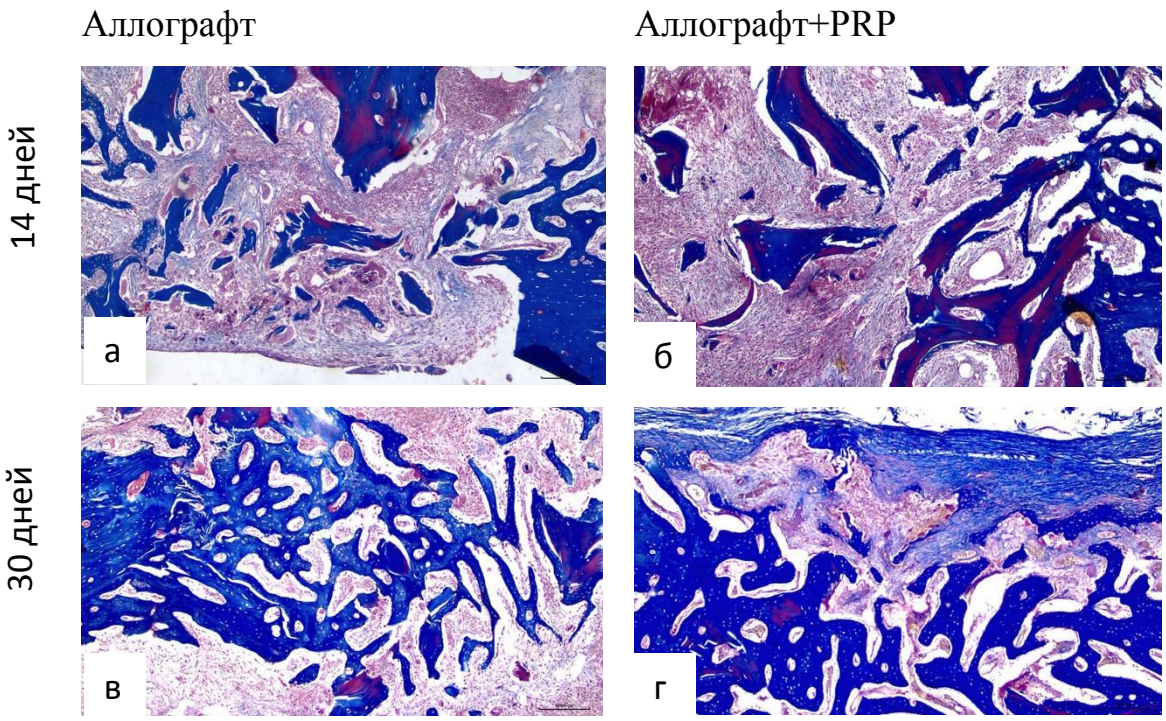


Рисунок 2 - Гистологические срезы через 14 и 30 дней после имплантации: а, б - фиброзный слой окружает поверхность аллотрансплантата с различной степенью ремоделирования и новообразованной костной тканью; в, г - новообразованная кость с большим количеством остеоцитов и остеобластов интегрируется с аллотрансплантатом (трихромное окрашивание по Массону × 40)

Во 2 группе на 14 сутки морфологические признаки репаративного процесса в кортикальном слое кости характеризовались прогрессивным увеличением зрелой костной ткани с наличием хаотично расположенных Гаверсовых каналов и поперечно отходящих костных балок (рисунок 2). Костные балки новообразованной костной ткани широкие, с

ISSN 2524-0684 ISSNe 2524-0692

множественными широкими мостовидными контактами между новообразованными костными балками. Присутствие фиброзной и хрящевой ткани было минимальным 37.4 ± 4.3% и 7.1 ± 3.9% от площади, соответственно.

На 30 сутки в 1 группе костная ткань распознавалась по плотной базофильной линии и наличию остеоцитов в лакунах вновь сформированной кости. Костная ткань представлена в виде хаотично расположенных костных балок и тяжей, формирующих пластинчатые структуры (рисунок 2). Костные балки с высокой степенью минерализации и активным продольным ростом. Средняя площадь костной ткани составила 79.2±5.5%, фиброзной и хрящевой ткани 11.6±4.5% и 9.2±4.2%, соответственно (таблица 3). Во 2 группе на 30 сутки зона дефекта представлена компактной минерализованной костной тканью 82.9±6.4% с Гаверсовыми каналами различных размеров и неоваскуляризацией. Средняя площадь фиброзной и хрящевой ткани составила 7.7±4.3% и 9.4±3.3%, соответственно (таблица 3).

Ни на одном из участков гистологических срезов в группе с перфорированным аллографтом и группе с перфорированным аллографтом с PRP не было обнаружено никаких признаков гиперплазии хондроидной или костной мозоли. Обнаружены тонкие слои фиброзной ткани и кровеносных сосудов с различной степенью резорбции аллографта с наличием остеокластов и фиброваскулярных структур. Эти находки одинаково наблюдались в обеих группах. Использование PRP не вызывало каких-либо дополнительных гистологических изменений.

Обсуждение. Все больше исследований демонстрирует, что аутоплазма, обогащённая тромбоцитами, улучшает регенеративные свойства соединительной и эпителиальной ткани за счет повышения активности фибробластоподобных клеток и стимулирования их пролиферации [8, 9, 16]. Возможность комбинированного применения такой плазмы с различными заполнителями костной ткани позволяет применять ее и при различных видах дефектов костной ткани [11-13, 17]. Проведенное исследование показало, что применение PRP в сочетании с перфорированным аллографтом улучшает и усиливает остеогенез в сравнении с группой применения перфорированного аллографта без дополнительных биокомпонентов. Усиление репаративных процессов в костной ткани продемонстрировало стабильное увеличение количества остеобластов в течение всего периода наблюдения по сравнению с группой, где PRP не использовалось. Остеобласты тотально и циркулярно выстилали костные фрагменты аллографта новообразующейся костной тканью и формировали множественные пучки остеобластных клеток с разнонаправленным ростом костной ткани и выраженным феноменом «bridging» костных фрагментов. Мы полагаем что перфорированный аллографт в сочетании с PRP улучшает

ISSN 2524-0684 ISSNe 2524-0692

остеокондуктивный потенциал и вызывает остеоиндуктивный эффект, что выражается усилением и ускорением роста и созревание костной ткани в зоне дефекта.

Помимо остеобластов и остеокластов, традиционно считающихся ключевыми участниками процессов ремоделирования костной ткани, важную роль в регулировании и контроле процессов играют остеоциты [18-20]. Действие остеоцитов формирует «контролируемую костную стратегию», направленную на репарацию и ремоделирование кости [21, 22]. Остеоциты производят сигналы для контроля функций клеток остеобластов, тем самым регулируя моделирование кости, и помогая формированию новой [23, 24]. Исследования in vitro показали, что остеоциты являются негативным регулятором активности остеокластов и могут играть важную роль в запуске местного ремоделирования кости [25, 26]. Наличие достаточного количества живых остеоцитов является облигатным условием ремоделирующей активности костной ткани в зоне дефекта. Более высокое количество остеоцитов, обнаруженное в настоящем исследовании в кости при использовании PRP, по сравнению с использованием перфорированного аллографта, свидетельствует о том, что PRP улучшает репарацию и костное ремоделирование.

При анализе репаративной моделивыявлено, что относительное количество микрососудов в группе с PRP статистически значимо выше ($p < 0.05$), чем в группе сравнения перфорированного аллографта без PRP. В группе с PRP микрососуды имели относительно равномерное распределение по всей зоне дефекта уже на 14 день, тогда как в группе сравнения активный ангиогенез носил неравномерный характер, отмечался более плотно в периферических зонах дефекта (рисунок 1). Процесс ангиогенеза является значимым и необходимым для трофики, роста и созревания костной ткани [20, 27]. Использование PRP в регенерации мягких тканях усиливает ангиогенез, что является его основным главным биоэффектом [28]. Выявлено, что формирование более плотных зон созревающей и зрелой костной ткани отмечалось в зонах с относительно большим количеством микрососудов. Предполагается, что PRP индуцированный эффект активности роста и созревания костной ткани наиболее вероятно связан с прямым действием на ангиотрофику и косвенно - на остеоиндуктивный эффект.

Далее, показано, что в группе с PRP не выявлено отклонений репарации костной ткани, ассоциированной с недостаточным или избыточным формированием кости. Новообразованная костная ткань в обоих группах характеризовалась нормальным гистопаттерном: (1) костная пластинка на выходила за пределы толщины костного дефекта и не переходила на костную пластинку вне дефекта, (2) имела ламинарное слоистое строение с фокальной хаотичной моделью в области

ISSN 2524-0684 ISSNe 2524-0692

преимущественно гаверсовых каналов, (3) относительное количество костной ткани и гаверсовых каналов не отличалось между группами и по строению кости вне костного дефекта.

Вопросы использования биологических и синтетических препаратов, влияющих на рост и созревание костной ткани, обширны и давно рассматриваются. Ранее опубликовано, что применение различных биологических и синтетических препаратов проводится без явно достоверных данных воздействия на тонкий механизм эндогенной регуляции роста костной ткани [16, 17, 28], что патологический рост и отклонения созревания костной ткани ассоциируется с фиброзной дисплазией и экзостозами [29]. В группах настоящего эксперимента - как с PRP, так и в группе сравнения- патологии или избыток формирования костной ткани не выявлены. Предполагается, что применение PRP не вызывает изменения центральной или эндогенной регуляции механизмов прямой и обратной передачи сигналов, в частности, нейроэндокринной и нейрогуморальной, но более вероятно улучшает локо-региональный механизм и микроокружение зоны дефекта с усилением остеоиндуктивных и кондуктивных эффектов биоаллографта.

Гистоморфометрический анализ репаративной модели не выявил активного воспалительного, аллергического или некротического пути в зоне репарации дефекта костной ткани с применением PRP перфорированного алографта и группе сравнения. Можно считать, что биокомплекс PRP-аллографт является биосовместимым и не вызовет иммунологического ответа макроорганизма. Обнаруженная лимфогистиоцитарная инфильтрация периаллографтных зон является реактивным процесом в рамках репарации зоны дефекта. Ранее данный феномен показан как феномен репаративного реактивного микроокружения для ремоделирования аллографта [30]. В настоящем исследовании также обнаружен незначительно пониженный уровень лимфогистиоцитарного инфильтрата в группе PRP -аллографта по сравнению с группой перфорированного аллографта. Мы полагаем, что PRP способствует ускорению процесса ремоделирования аллографта, после чего лимфогистиоцитарный инфильтрат рассасывается.

Сильной стороной данного исследования является сравнительная характеристика использования перфорированного аллографта с применением PRP, что позволило выявить позитивные стороны PRP в костной регенерации.

Слабые стороны: в обсуждении остаетсянепосредственный эффект воздействия PRP на костную ткань. Действует ли он непосредственно на остеосинтез и созревание кости или опосредованно через формирование благоприятного макроокружения с высоким индексом ангиогенеза? Для получения ответа на этот вопрос необходимы дальнейшие исследования.

ISSN 2524-0684 ISSNe 2524-0692

Таким образом, показано, что комплекс PRP-аллографт улучшает репарацию костной ткани в зоне индуцированного дефекта в эксперименте на кроликах. Выявлено, что PRP усиливает процесс ангиогенеза и формирование новообразованной костной ткани. Предполагается, что основной эффект улучшения остеокондуктивных и остеоиндуктивных потенциалов аллографта PRP связан с формированием локорегионального благоприятного микроокружения с активным префузионным и диффузионным потенциалом стромального каркаса, что способствует более активному росту и созреванию костной ткани.

Конфликт интересов

Не заявлен.

Вклад авторов

Все авторы внесли равноценный вклад в разработку концепции, выполнение, обработку результатов и написание статьи.

Заявляем, что данный материал ранее не публиковался и не находится на рассмотрении в других издательствах.

Финансирование

Настоящее исследование финансировалось Комитетом науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант №AP09260954)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Winkler T., Sass F.A., Duda G.N., Schmidt-Bleek K. A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering: The unsolved challenge // Bone Joint Res. - 2018. - V 7(3). - P.232-243.
2. Molina C. S., Stinner D. J., Obremskey W. T. Treatment of traumatic segmental long-bone defects: a critical analysis review // Journal of Bone and Joint Surgery Reviews. - 2014. - V 2(4-e1). – P.1-11.
3. Chiarello E., Cadossi M., Tedesco G., Capra P., Calamelli C., Shehu A., Giannini S. Autograft, allograft and bone substitutes in reconstructive orthopedic surgery// Aging Clin Exp Res. - 2013. - V 25(1). - P.101-103.
4. Lauthe O., Soubeyrand M., Babinet A., Dumaine V., Anract P., Biau D. J. The indications and donor-site morbidity of tibial cortical strut autografts in the management of defects in long bones // Bone Joint J. - 2018. - V 100-B. - P. 667-674.
5. Godavitarne C., Robertson A., Peters J., Rogers B. Biodegradable materials // Orthop Trauma. - 2017. - V 31. - P.316-320.
6. Moreno M., Amaral M.H., Lobo J.M.S., Silva A.C. Scaffolds for bone regeneration: state of the art // Current Pharmaceutical Design. - 2016. - V 22(18). - P.2726–2736.
7. Platelet-rich plasma: Growth factors and pro- and anti-inflammatory properties // Journal of Periodontology. - 2007. - V 4. - P. 661-669.

ISSN 2524-0684 ISSNe 2524-0692

8. Malhotra A., Pelletier M. H., Yu Y., Walsh W. R. Can platelet-rich plasma (PRP) improve bone healing? A comparison between the theory and experimental outcomes // Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery. - 2013. - V 133(2). - P.153-165.
9. Solakoglu O., Heydecke G., Amiri N., Anitua E. The use of plasma rich in growth factors (PRGF) in guided tissue regeneration and guided bone regeneration. A review of histological, immunohistochemical, histomorphometrical, radiological and clinical results in humans // Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger. - 2020. - V 231(151528). – P.1-11.
10. Nather A., Wong K. L., David V., Pereira B. P. Allografts with autogenous platelet-rich plasma for tibial defect reconstruction: a rabbit study // Journal of Orthopaedic Surgery. - 2012. – V 20(3). - P.375-380.
11. Peerbooms J. C., Colaris J. W., Hakkert A. A., Van Appeldorn M., Bruijn D. J., Den Oudsten B. L., Gosens T. No positive bone healing after using platelet rich plasma in a skeletal defect. An observational prospective cohort study // International Orthopaedics. - 2012. - V 36(10). - P. 2113-2119.
12. Tuleubaev B., Saginova D., Saginov A., Tashmetov E., Koshanova A. HEAT TREATED BONE ALLOGRAFT AS AN ANTIBIOTIC CARRIER FOR LOCAL APPLICATION // Georgian Med News. - 2020. - V 306. - P.142-146.
13. Pruss A., et al. Validation of the, Marburg bone bank system' for thermodisinfection of allogenic femoral head transplants using selected bacteria, fungi and spores // Biologicals. - 2003. - V 31(4). – P.287-294.
14. Davis V. L., Abukabda A. B., Radio N. M., Witt-Enderby P. A., Clafshenkel W. P., Cairone J. V., Rutkowski J. L. Platelet-Rich Preparations to Improve Healing. Part II: Platelet Activation and Enrichment, Leukocyte Inclusion, and Other Selection Criteria // Journal of Oral Implantology. - 2014. - V 40(4). - P.511-521.
15. Jethwa J., Ireland R. S., Chan D. Does a combination of platelet-rich plasma and decalcified freeze-dried bone allograft offer advantages over decalcified freeze-dried bone allograft alone when using pocket depth and clinical attachment level as markers for periodontal healing? A literature review // Journal of Investigative and Clinical Dentistry. - 2019. - V 10(2). - e12397.
16. Cullinane D.M. The role of osteocytes in bone regulation: Mineral homeostasis versus mechanoreception // J Musculoskelet Neuronal Interact. - 2002. - V2. - P.242–244.
17. Bonewald L. The amazing osteocyte // J Bone Miner Res. - 2002. - V26. - P.229–238.
18. Neve A., Corrado A., Cantatore F. Osteocytes: central conductors of bone biology in normal and pathological conditions // Acta Physiol. - 2012. – V 204. - P.317–330.
19. Kennedy O.D., Herman B.C., Laudier D.M., Majeska R.J., Sun H.B., Schaffler M.B. Activation of resorption in fatigueloaded bone involves both apoptosis and active pro-osteoclastogenic signaling by distinct osteocyte populations // Bone. - 2012. - V50. - P.1115–1122.
20. Qiu S., Rao D.S., Fyrhie D.P., Palmitkar S., Parfitt A.M. The morphological association between microcracks and osteocyte lacunae in human cortical bone // Bone. - 2005. - V37. - P.10–12.
21. Bonewald L.F. The amazing osteocyte // J Bone Miner Res. - 2011. – V 26. - P.229–238.
22. Martin R.B. Toward a unifying theory of bone remodeling // Bone. - 2000. – V 26. - P.1–6.
23. Gu G., Mulari M., Peng Z., Hentunen T.A., Väänänen H.K. Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption // Biochem Biophys Res Commun. - 2005. –V 335. - P.1095–1101.

ISSN 2524-0684 ISSNe 2524-0692

24. Kennedy O.D., Herman B.C., Laudier D.M., Majeska R.J., Sun H.B., Schaffler M.B. Activation of resorption in fatigueloaded bone involves both apoptosis and active pro-osteoclastogenic signaling by distinct osteocyte populations // Bone. - 2012. -V50. - P. 1115–1122.
25. Brownlow H.C., Reed A., Simpson A.H. The vascularity of atrophic non-unions// Injury. - 2002. – V 33(2). - P. 145–150.
26. Kakudo N., Morimoto N., Kushida S., Ogawa T., Kusumoto K. Platelet-rich plasma releasate promotes angiogenesis in vitro and in vivo // Med Mol Morphol. - 2014. – V 47(2). - P. 83-89.
27. Bates P., Ramachandran M. Bone injury, healing and grafting // In book: Basic Orthopaedic Sciences. – London: CRC Press, 2017. – 544 p.
28. Tuleubaev B.E., Kamyshansky E.K., Saginova D.A., Tashmetov E.R., Koshanova A.A. A Histologic and Histomorphometric Analysis of Bone Tissue Regeneration with Perforated Bone Allograft in Rabbit Femur Defect // Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences. - 2021. – V 05. - P. 12-18.
Поступил в редакцию 01.06. 2022

Поступил на редактирование 23.06.2022

Сведения об авторах

Ташметов Эльярбек Розматжанович – магистр медицинских наук, докторант, Медицинский университет Караганды. ; tashmetov.e@gmail.com; +77020079494.
ORCID: 0000-0002-2614-4710 - автор для корреспонденции

Тулеубаев Берик Еркебуланович – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой хирургических болезней Медицинского университета Караганды. Караганда. berik-karaganda@rambler.ru; 87013322468, ORCID: 0000-0002-9640-2463

Сагинова Дина Азимовна – PhD, заведующая центром прикладных научных исследований, Национальный научный центр травматологии и ортопедии им. академика Н.Д.Батпенова. Нур-Султан. saginova_d@nscto.kz; 87015998758
ORCID: 0000-0001-9551-5354

Кошанова Амина Амантаевна – ассистент кафедры, Медицинский университет Караганды. Караганда. koshanova87@mail.ru; 87023516940
ORCID: 0000-0001-8620-2196

ТУЛЕУБАЕВ Б.Е.[1], ТАШМЕТОВ Э.Р.[1], САГИНОВА Д.А.[2], КОШАНОВА А.А.[1]

[1] Қарағанды медицина университеті, Қарағанды қ.
[2]Академик Н.Д.Батпенов атындағы ұлттық ғылыми травматология және ортопедия орталығы, Нұр-Сұлтан қ.

ISSN 2524-0684 ISSNe 2524-0692

ТРОМБОЦИТТЕРГЕ БАЙЫТЫЛҒАН АУТОПЛАЗМАМЕН ҚОСА СҮЙЕК АЛЛОГРАФТЫН ҚОЛДАНУ КЕЗІНДЕ СҮЙЕК АҚАУЫ РЕГЕНЕРАЦИЯСЫНЫҢ МОРФОЛОГИЯЛЫҚ ЕРЕКШЕЛІКТЕРІ

Тромбоциттерге байытылған плазма сүйек регенерациясында кеңінен қолданылады, өйткені белсендірілген тромбоциттерден бөлінетін өсу факторлары сүйек жасушаларына остеоиндуктивті әсер етеді. Клиникаға дейінгі және клиникалық зерттеулердің көпшілігі тромбоциттер концентраттары сүйек регенерациясының нәтижесін жақсартатынын көрсеткенімен, кейбір зерттеулер сәйкес келмейтін нәтижелерді және тіпті сүйектің жазылуына теріс әсер ететінін мәлімдейді.

Материалдар мен әдістер. Зерттеу салмағы мен жасы салыстырмалы түрде бірдей 32 зертханалық қоянға жүргізілді. Сүйек аллографттары Марбургтік сүйек банк жүйесі бойынша дайындалды. Тромбоциттерге байытылған плазма (PRP) қос центрифугалау тәсілімен алынды. Жалпы анестезиямен ұйықтатылған қояндарда диаметрі 5 мм, тереңдігі 10 мм болатын ортан жілікке ақау модельденді. Сүйек ақауын толтыру үшін қолданылатын материалға байланысты барлық қояндар 2 топқа бөлінді: 1 топта ақау аллографтпен толтырылған; 2 топта – тромбоциттермен байытылған аутоплазмамен қосылған аллографт. Имплантациядан кейін 14 және 30 күндері әр топтан 8 қоян материал үлгісін алу үшін эксперименттен шығарылды. Сүйек тінінің репаративті регенерациясы гистологиялық, гистохимиялық зерттеу әдістерімен бағаланды.

Нәтижелері. Нәтижелер сүйек ақауында әртүрлі дәрежеде жаңа сүйек пайда болғанын көрсетті. 14-ші күні PRP тобында остеобласттар мен остеоциттердің орташа саны 1-топқа қарағанда айтарлықтай жоғары болды ($p<0,05$), ал остеокласттар санында айырмашылықтар табылмады ($p=686$). Сондай-ақ, PRP бар топта ақау аймағында жаңадан түзілген сүйек тінінің саны PRP жоқ топқа қарағанда көбірек болды ($p=0,04$). 30-шы күні остеобласттар мен остеоциттердің саны бойынша топтар арасында статистикалық маңызды айырмашылық жоқ (сәйкесінше $p=0,343$ және $p=0,716$). PRP бар топта ақау аймағында сүйек тінінің қатынасы PRP жоқ топқа қарағанда жоғары болды ($p=0,987$).

Қорытындылар. Аллогенді сүйекті PRP-мен бірге қолдану сүйек ақауларын емдеудегі кешенді стратегияның бөлігі болуы мүмкін.

Негізгі сөздер: Сүйек аллографты, сүйек ақауы, PRP, Марбургтік сүйек банк жүйесі

TULEUBAEV B.E.[1], TASHMETOV E.R.[1], SAGINOVA D.A.[2], KOSHANOVA A.A.[1]

[1]Karaganda Medical University, Karaganda.
[2]National scientific center of Traumatology and Orthopedics named after N.D. Batpenov

Morphological features of bone defect regeneration when using bone allograft in combination with platelet-rich plasma

ISSN 2524-0684 ISSNe 2524-0692

Abstract. Platelet-rich plasma is widely used for bone tissue regeneration because of growth factors released from activated platelets have an osteoinductive effect on bone cells. Although most preclinical and clinical studies show that platelet concentrates improve bone regeneration outcomes , some studies reported about controversial results and even negative effects on bone healing.

Materials and Methods. The study was conducted with 32 rabbits of the same species and comparable weight, and age. Bone allografts were prepared according to the Marburg bone bank system. Platelet-rich plasma (PRP) was obtained by double centrifugation. In rabbits a femoral bone defect of 5 mm in diameter and 10 mm deep was modeled in rabbits under general anesthesia. 2 groups were formed depending on the material used to replace the bone defect.: Group 1 - defect filled with allograft; Group 2 defect filled with allograft and platelete-rich plasma . At Days 14 and 30 after implantation , 8 rabbits from each group were selected to be sampled. The reparative regeneration of the bone tissue was estimated by means of histological, histochemical methods.

Results. New bone of different levels was formed in the bone defect. At Day 14 average number of osteoblasts and osteocytes was significantly more ($p<0,05$)in the PRP- group than in the 1st one, while the number of osteoclasts showed no difference ($p=686$). Also, a greater amount of newly formed bone tissue in the defect area was observed in PRP - group in copmparing with the no PRP-group ($p=0.04$). At Day 30 no statistically significant difference between the groups in the number of osteoblasts and osteocytes ($p=0,343$ and $p=0,716$ respectively) was observed. Ratio of bone tissue in defect zone was higher in PRP-groupthan in no PRP- group.($p=0,987$).

Conclusions. Use of allogeneic bone in combination with PRP may become a part of a comprehensive strategy of bone defects treatment..

Keywords: bone allograft, bone defect, PRP, Marburg bone bank system