

Остеогенная активность озонированного костного матрикса в зависимости от времени стерилизации

Т. В. Ханамирян

Центр травматологии, ортопедии, ожогов и радиологии МЗ РА

375047, Ереван, 9-я ул. Мараш

Ключевые слова: костный матрикс, стерилизация, озон, остеогенез, эктопический очаг, замещение костных дефектов

Адекватность выбора трансплантационного материала остается актуальной проблемой реконструктивной хирургии. В травматологии и ортопедии большое внимание уделяется биотрансплантатам, обеспечивающим замещение костных дефектов различной этиологии. Основным критерием выбора являются остеоиндуктивные свойства трансплантата и сроки восполнения дефекта органотипичной костью. В свою очередь, остеогенные свойства во многом зависят от методов стерилизации и консервации и могут варьировать в широком диапазоне.

За последние годы физические методы стерилизации все шире внедряются в медицину, конкурируя с традиционными химическими реагентами [6,8,9,11,17,19,27]. По мнению многих авторов, они считаются экологически более чистыми, экономически выгодными и, что особенно важно, наименее влияющими на естественные свойства биотрансплантатов.

На протяжении многих лет нами ведется поиск щадящих методов стерилизации костного матрикса (КМ) [10,14]. Заготовленный по нашей методике КМ успешно применяется при оперативном лечении замедленной консолидации ложных суставов, остеомиелита, при замещении пострезекционных костных дефектов опухолевого генеза, а также при лечении воспалительно-деструктивных заболеваний челюстных костей [1,3,4,18,20,21,23]. В настоящее время ведутся исследования по изучению возможности и целесообразности стерилизации КМ методом озонирования [24–26]. Выбор озона (O_3) в качестве стерилизующего средства обусловлен его физико-химическими параметрами и широким применением в медицине как в промышленных целях, так и в клинической практике [2,5,7,12,13,15,16,28,29].

Цель данного исследования состоит в попытке дать сравнительную оценку зависимости остеоиндуктивных свойств костного матрикса от экспозиционного времени стерилизации озоном.

Материал и методы

Эксперименты проводились на 170 половозрелых крысах линии Wistar в двух сериях опытов. Для осуществления экспериментальных работ нами заготавливался КМ из проксимальных отделов бедренных костей белых крыс. Изъятые кости после механической обработки, пройдя стандартную биотехнологическую процедуру [14,22], подвергались стерилизации. Стерилизация проводилась для животных контрольной группы в растворе 0,25% нашатырного спирта, для исследуемых групп – в озонаторе «Арег-309», обеспечивающем 20 мг/л O_3 . Время экспозиции 30 и 20 минут. Консервация проводилась при температуре – 12°C. КМ трансплантаты средней массой 25 мг имплантировались в мышцы передней брюшной стенки крыс по одному кусочку по обе стороны под эфирным наркозом. Остеогенные свойства биотрансплантатов и морфоструктура имплантатов изучались гистологическими, гистохимическими и количественными методами. Анализ срезов, окрашенных гематоксилин-эозином, пикрофуксинном по Ван-Гизону, определение активности щелочной фосфатазы (ЩФ) по методу Гомори, сукцинат- и лактатдегидрогеназы (СДГ, ЛДГ) – по методу Нахласа, а также сухого веса имплантов производился на 7-, 14-, 21-, 30-, 60- и 90-е постимплантационные сутки. Полученные данные обрабатывались статистически по методу Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение

Морфологические исследования I опыта (40 животных), где изучались импланты КМ, озонированного в течение 30 минут, показали:

7-е сутки → аморфная эозинофильная масса, инфильтрованная небольшим количеством соединительнотканых элементов; начальные явления резорбции с проникновением капилляров и миграцией

крупных мезенхимальных клеток с овальным светлым ядром.

14–21-е сутки → активация процессов рассасывания и замещения молодой остеобластической тканью; трансформация последней, сопровождающаяся биосинтетическим генезом; усиление активности ЩФ, СДГ, ЛДГ. Основное вещество отличается метакромазией и при постановке ШИК-реакции яркой диффузной окраской. В очагах хондрогенеза наблюдается энхондральный остеогенез с образованием полей грубоволокнистой кости.

30-е сутки → гистограммы изменчивы. В одних персистирует лимфоидная инфильтрация и скопление мезенхимойдных клеток, увеличение очагов аппозиционного остеогенеза. В других в большей степени наблюдается формирование очагов хондрогенеза и энхондральный остеогенез.

60-е сутки → морфологическая картина индукционного процесса также варьирует. В имплантатах КМ отмечаются большие нерезорбированные участки. Часть имплантов представлена пластинчатой костью с очагами грубоволокнистой разной степени дифференцировки. Окраска по Ван-Гизону дает от розового до ярко-красного цвета. Неохондрогенез уменьшается. Превалирует энхондральный и аппозиционный остеогенез.

90-е сутки → часть имплантов представлена пластинчатой костью с очагами грубоволокнистой. В других участках неохондрогенез не затухает; наблюдается скопление хрящевых клеток и в незначительном объеме – аппозиционный остеогенез.

Данные количественного анализа (52 крысы) показали, что на 21-е сутки происходит незначительное уменьшение сухого веса имплантов, который возрастает в последующие сроки (табл. 1).

Таблица 1

Динамика изменения сухого веса имплантов КМ, стерилизованного O₃ в течение 30 мин

Исследуемый материал	Сухой вес + вес импланта	Сухой вес в %
Имплант, 21-е сутки	29,1 + 33,7	31,4 ± 1,0
Имплант, 30-е сутки	30,8 + 37,2	34,0 ± 1,4
Имплант, 60-е сутки	32,5 + 38,1	35,3 ± 1,2
Имплант, 90-е сутки	33,0 + 57,4	45,2 ± 5,3
Костный матрикс	35,5 + 40,5	38,0 ± 0,8
Кость	69,7 + 72,3	71,0 ± 0,4

Исследования морфоструктуры имплантов КМ, стерилизованного O₃ в течение 20 мин показали:

7-е сутки → процессы резорбции с инвазией сосудов и заполнением соединительнотканями клетками ложа; незначительный объем хондрогенеза.

14–21-е сутки → активация клеточных элементов типа фибробластов и остеобластов; подъем активности ЩФ, СДГ и ЛДГ. В очагах хондрогенеза – энхондральный остеогенез с образованием полей грубоволокнистой кости.

30-е сутки → образование полей грубоволокнистой кости с первичными остеонами; базофильные линии склеивания генеральных пластин; индукция костномозгового канала.

60-е сутки → продолжающиеся процессы перестройки участков с энхондральным окостенением, сочетающиеся уже с сформированной пластинчатой костью.

90-е сутки → большая часть имплантов представлена пластинчатой костью, хотя отмечаются очаги грубоволокнистой кости и участки нерезорбированного КМ.

Данные количественного анализа (42 крысы) показали, что уменьшение сухого веса, определенное на 14-е постимплантационные сутки, начинает нарастать с 21-х суток. Однако по сравнению с предыдущим опытом, на 30-е сутки отмечается некоторый спад показателей сухого веса, который варьирует в течение всего исследуемого срока. В конце эксперимента он приближается к показателям интактного КМ.

Результаты морфологических исследований и данные определения сухого веса имплантов КМ, стерилизованных O₃ в течение 30 и 20 мин, сравнивались с результатами исследований животных контрольной группы, где КМ был стерилизован 0,25% раствором нашатырного спирта. Сравнительная оценка полученных результатов свидетельствовала, что по сравнению с контрольной группой постимплантационный период протекал в целом однотипно, хотя гистокартинка варьировала. Остеогенные процессы в обоих опытах отставали от таковых по сравнению с контрольной группой. Заметное отставание в процессах резорбции и замещения новообразованной костной тканью приводило к десинхронизации процесса костеобразования, неомогенности морфоструктуры в имплантатах КМ, стерилизованного O₃ в течение 30 мин.

К концу эксперимента, несмотря на наличие участков сформированной пластинчатой кости, имплантат в большей степени был представлен очагами грубоволокнистой кости с продолжающимся процессом перестройки и зонами нерезорбированного КМ. Отставание в темпах остеиндукционных процессов в имплантатах КМ, стерилизованных O₃ в течение 20 мин., по сравнению с контрольной группой, проявлялось в ранние постимплантационные сроки. Это приводило к формированию значительного объема очагов хондрогенеза, обеспечивающих окостенение по энхондральному типу. К концу эксперимента большая часть им-

плантов была представлена пластинчатой костью, однако в центральных участках сохранялись очаги нерезорбированного КМ в стадии перестройки. Дан-

ные сравнительной оценки морфологических исследований совпадали с показателями сухого веса имплантов (табл. 2).

Таблица 2

Динамика изменения сухого веса имплантов КМ, стерилизованных разными методами

Исследуемый материал	Сухой вес в % / Сухой вес + вес импланта		
	КМ, стерил. 0,25% нашатыр. спиртом	КМ, стерил. Оз в теч. 20 мин	КМ, стерил. Оз в теч. 30 мин
Имплант, 14-е сут.	35,5 ± 2,34	34,4 ± 3,2	-
	29,8 ± 41,2	26,2 ± 42,6	
Имплант, 21-е сут.	33,2 ± 0,93	37,5 ± 2,1	31,4 ± 1,0
	31,05 ± 33,35	32,7 ± 42,3	29,1 ± 33,7
Имплант, 30-е сут.	34,5 ± 2,38	34,6 ± 1,5	34,0 ± 1,4
	29,0 ± 40,0	31,1 ± 38,1	30,8 ± 37,2
Имплант, 60-е сут.	39,1 ± 2,75	51,4 ± 2,9	35,3 ± 1,2
	22,75 ± 45,45	44,7 ± 58,1	32,5 ± 38,1
Имплант 90-е сутки	44,2 ± 3,7	48,5 ± 2,4	45,2 ± 5,3
	35,75 ± 52,65	39,0 ± 49,0	33,0 ± 57,4
Костный матрикс	38,0 ± 0,8	38,0 ± 0,8	38,0 ± 0,8
	35,5 ± 40,5	35,5 ± 40,5	35,5 ± 40,5
Кость	71,0 ± 0,4	71,0 ± 0,4	71,0 ± 0,4
	69,7 ± 72,3	69,7 ± 72,3	69,7 ± 72,3

Как видно из табл. 2, уменьшение сухого веса, фиксируемое на 14–21-е постимплантационные сутки, в последующие сроки возрастает и к концу эксперимента превосходит показатели интактного КМ.

Проведенные исследования показали возможность стерилизации костного матрикса озоном. Несмотря на окислительные свойства и вероятность пагубного воздействия на белковую основу КМ, нам удалось, изменяя экспозиционное время озонирования, найти режим стерилизации, незначительно влияющий на остеиндуктивную активность трансплантата.

Таким образом, проведенные исследования дают возможность утверждать, что разработка метода стерилизации, КМ озоном как альтернативного целесообразна и экономически более выгодна по сравнению с известными химическими методами. При уточнении щадящих режимов стерилизации можно добиться синхронности процессов резорбции и замещения, что, в свою очередь, приведет к трансформации импланта в органотипичную кость.

Поступила 14.06.04

Օգնացված ոսկրային մատրիքի օստրեոգեն ակտիվությունը՝ կախված ստերիլիզացման ժամանակից

Տ. Վ. Խանամիրյան

Ուսումնասիրված են օգնացված ոսկրային մատրիքի օստեոգենությունը հատկությունները էկոնայիկ օջախում փորձարարական պայմաններում մոֆոլոգիական, հիստոքիմիական և քանակական եղանակներով: Տրված է քիտորանսպլանտատի ոսկրածին

հատկությունների համեմատական գնահատումը՝ կախված ստերիլիզացման ռեժիմներից: Յույց է տրված ոսկրային մատրիքի օգնային ստերիլիզացման հնարավորությունը, որպես այլընտրանք ստերիլիզացման քիմիական մեթոդների համեմատ:

Osteogenous activity of the ozonated bone matrix depending on the time of sterilization

T. V. Khanamiryan

Osteoinductive properties of the ozonated bone matrix implanted into the anterior abdominal muscles of the linear white rats have been studied using morphological, histochemical and quantitative methods. Comparative assessment of biotransplant's osteogenous properties de-

pending on sterilization regimens is presented. The experiment has shown the possibility of bone matrix's ozone-sterilization as an alternative to the chemical methods.

Литература

1. Айвазян В.П., Ханамирян Т.В. Тез. докл. XII съезда хир. завак. госуд. Тбилиси, 1999, с. 169.
2. Анфимов П.Е., Вазина И.Р., Денисов В.М. и др. Тез. докл. VI съезда травм. и орт. России. Н. Новгород, 1997, с. 894.
3. Болдырев А.И., Горничанинов О.Н., Копылов Е.В. Сб. тр. ЦНИИ протез. и протезостр. М., 1989, 87, с. 63.
4. Болтуркевич С.И., Калугин А.В., Шванцев В.И. Сб. науч. труд. СПб, 1996, с. 121.
5. Бояринов Г.А., Перетягин С.П., Мирошин С.И. и др. Озонотерапия босвой хирургической травмы. Мет. рек. Н. Новгород, 2002.
6. Векслер Н.Ю. Применение гипохлорита натрия и озонированного физиологического раствора в комплексе интенсивной терапии у больных с инфекционным эндокардитом. Дисс. к.м.н. М., 1998.
7. Горбунов С.Н. Озон в медицине. Н. Новгород, 1996.
8. Зайдман А.М., Этштейн Ю.В., Ливчак Г.В. Ортоп. травм., 1982, 6, с. 72.
9. Исачев Б.А., Вальшев А.В., Тарасевич А.В. и др. Ж. Вестн. хир., 1991, 3, с. 81.
10. Костандян Л.И., Саркисян А.И. Мет. рек. Ереван, 1987.
11. Лекишвили М.В., Исаева Е.И., Пономарев В.Н., Васильев М.Г. Ж. Вестн. травм. и ортоп. им. Н.Н. Приорова, 2002, 1, с. 75.
12. Маланчук В.А., Циделко В.Д., Копчак А.В. и др. Украинский медицинский часопис, 6 (20) – XII XII, 2000.
13. Меркулов В.Н., Лекишвили М.В., Дорохов А.И. Ж. Вест. травм. и ортоп. им. Н.Н. Приорова, 2000, 4, с. 22.
14. Осепян И.А., Козлова В.В., Айвазян В.П. и др. Заготовка и консервация губчатого и трубчатого костного матрикса. Мет. рек. Ереван, 1984.
15. Рикельми П., Франзини М., Вальденаси Л. Озон-кислородная терапия. Пер. с англ. М., 1999.
16. Риллинг З., Фибан Р. Практика озон-кислородной терапии. Пер. с нем. М., 1999.
17. Савельев В.И., Корнилов Н.В., Жирнов В.А. Орт., травм. и протез., 1990, 20, с. 5.
18. Сеинян С.Г., Айвазян В.П., Ханамирян Т.В. Ж. Вест. хир. Арм., 1995, 3, с. 38.
19. Сивков С.Н. Способ заготовки и консервации деминерализованных костных трансплантатов. Автореф. канд. дисс. Ленинград, 1988.
20. Стахеев И.В., Штин В.П., Плотникова В.А. Орт., травм. и протез., 1990, 2, с. 50.
21. Тарасов Н.И., Кузнецихин Е.П., Немсадзе В.П., Мат. XXVI н/п конф. дет. ортоп.-травм. М., 2003, с. 31.
22. Ханян А.А. Заготовка и консервация костного матрикса. Мет. рек. Ереван, 1978.
23. Ханамирян Т.В., Пашикян А.В. J. Cell. Proliferation, 1999, 2, p. 37.
24. Ханамирян Т.В., Ягджян Г.В., Сапонджян Л.Г. Стерилизация и консервация костного матрикса методом озонирования Тез. докл. XII съезда хир. завак. госуд. Тбилиси, 1999, с. 323.
25. Ханамирян Т.В., Ягджян Г.В., Айвазян А.В., Сапонджян Л.Г. Изучение возможности стерилизации костно-матричных трансплантатов методом озонирования. Сб: Акт. проблемы травматологии и ортопедии. Н. Новгород, 2001, с. 302
26. Ханамирян Т.В., Сапонджян Л.Г., Ягджян Г.В. и др. Ж. Вест. хир. Армении, 2002, 4, с. 10.
27. Шумада И.В., Кривенко В.М., Скрипнюк П.А. Орт., травм. и протез., 1990, 20, с. 3.
28. Sunnen G.V. Ozone in medicine. Proc. IX Ozone World Congress, 3, N. Y., 1989, p. 1.
29. Velio Bocei L.P. Studies on the biological effect of ozone, induction of interferon on the human leukocytes, Haematologica, 1990, 75, p. 10.