

В. И. СЕВАСТЬЯНОВ¹, Н. В. ПЕРОВА²,

¹ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В. И. Шумакова» МЗ РФ, Москва

²АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий», Москва

Композиция гетерогенного имплантируемого геля Сферо[®]гель для лечения заболеваний опорно-двигательного аппарата

Севастьянов Виктор Иванович

д. б. н. профессор, заведующий отделом биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В. И. Шумакова» МЗ РФ

E-mail: viksev@yandex.ru

Резюме: статья суммирует результаты проведенных экспериментально-клинических исследований и многолетний опыт применения композиции гетерогенного имплантируемого геля Сферо[®]гель при лечении заболеваний опорно-двигательного аппарата. Обсуждаются механизм регенераторного действия Сферо[®]геля относящегося к классу резорбируемых гидрогелевых миметиков внеклеточного матрикса, оптимальные схемы и способы его использования при травмах и заболеваниях опорно-двигательного аппарата. Представленные результаты о составе, свойствах, механизме взаимодействия Сферо[®]гель с живыми тканями смогут помочь практикующим врачам и исследователям в поиске новых областей применения биополимерных микрогетерогенных коллагенсодержащих гидрогелей в практической медицине, в том числе в области тканевой инженерии и регенеративной медицине.

Ключевые слова: биомиметик, внеклеточный матрикс, биополимерный гидрогель, гетерогенность, резорбция, регенерация, опорно-двигательный аппарат, остеоартроз суставов.

V. I. SEVASTIANOV¹, N. V. PEROVA²

¹FSBI «Federal research center of transplantation and artificial organs named after academician V. I. Shumakov» the Ministry of health of the Russian Federation, Moscow

²ANO «Institute of biomedical research and technology», Moscow

Applications of biopolymer microheterogeneous collagen contained gel in injuries and diseases of the musculoskeletal system

Viktor I. Sevastianov

head and professor of the department of biomedical technology and tissue engineering FSBI «Federal research center of transplantation and artificial organs named after academician V. I. Shumakov» the Ministry of health of the Russian Federation

E-mail: viksev@yandex.ru

Summary: the paper summarizes the results of the experimental and clinical research and our experience in the application of the composition of a heterogeneous implantable gel SPHERO[®]gel in the treatment of diseases of musculoskeletal system. Discusses the mechanism of the regenerative action of the SPHERO[®]gel belonging to the class of resorbable hydrogel mimetics of the extracellular matrix, the optimal schemes and methods of its use for injuries and diseases of the musculoskeletal system. Presents the results on the composition, properties, mechanism of interaction of the SPHERO[®]gel with living tissues can help clinicians and researchers in finding new applications of collagen biopolymer microheterogeneous hydrogels in the practice of medicine, including in the field of tissue engineering and regenerative medicine.

Key words: biomimetics, extracellular matrix, biopolymer hydrogel, heterogeneity, resorption, regeneration, musculoskeletal system, osteoarthritis.

Известно, что 10 – 12 % населения в России (примерно 15 млн человек) имеют остеоартроз (ОА), манифестация которого приходится на возраст 60 лет и старше, а к 80 годам заболевание является обязательным атрибутом «букета» всех болезней человека. ОА является второй

по частоте причиной инвалидизации после сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). По данным Центра контроля за заболеваемостью в США, ОА представляется более существенным фактором в ограничении активности пожилых людей, чем артериальная гипертензия, ИБС,

слепота или сахарный диабет [1]. Заболевания опорно-двигательной системы, особенно дегенеративные процессы в суставах, занимают основную позицию в списке хирургических заболеваний. Независимо от образа жизни, пациентом травматолога-ортопеда становится каждый четвертый человек планеты в возрасте до 40 лет, каждый второй в возрасте после 60 лет и каждый первый в возрасте после 80 лет.

Одним из наиболее распространённых способов лечения на настоящий момент являются инъекции вязкоупругого геля – протеза синовиальной жидкости. В большинстве своем это препараты гиалуронового ряда.

В настоящее время существует широкий спектр имплантируемых гелей гиалуроновой кислоты, применяемых в ортопедии и имеющих существенные различия как в технологии производства, так и в значениях концентрации и молекулярной массы действующего вещества. Сколько бы ни пытались исследователи определить, какой препарат лучше, сделать этого невозможно, так как проявлений деформирующих артрозов много, а значит, каждый из предложенных имплантатов найдет своего потребителя. Но все исследователи сходятся в одном мнении: препараты гиалуронового ряда не обладают функциями восстановления поврежденных тканей, а экзогенные гиалуронаты начинают покидать сустав спустя 2 часа после инъекции, хотя некоторые способны находиться там до 3 дней (главным образом это относится к высокомолекулярным продуктам).

Быстрая резорбция искусственной синовиальной жидкости, может быть объяснена тем, что в имплантате гиалуронозная кислота находится в чистом виде, а во внеклеточном матриксе организма она является его компонентом. На молекуле гиалуронозной кислоты находятся так называемые «коровые» (центральные) белки. Тонкая структура гликозаминогликанов на разветвлённых окончаниях протеогликанов создаёт узкую трёхмерную сетку, выполняющую функцию биофизического фильтра. Все это составляет сложную конструкцию, которая в организме подвергается «ремонт», а не полной замене. Процесс же обновления занимает до 120 дней.

Внеклеточный матрикс (ВКМ), играет важную роль в регенераторных процессах, протекающих в организме, обеспечивает необходимое микроокружение (нишу) для пролиферации и дифференцировки клеточных компонентов органов и тканей.

Одним из перспективных направлений в регенеративной медицине является воссоздание (имитация) нативного микроокружения, нарушенного при патологическом процессе, с использованием так называемых биомиметиков ВКМ – биоинженерных резорбируемых гидрогелей, обеспечивающих сходные с внеклеточным матриксом условия для жизнедеятельности клеток [2].

К таким биомиметикам ВКМ относится биополимерный микрогетерогенный коллагенсодержащий гидрогель (БМКГ) – многокомпонентный продукт из природных соединений, зарегистрированный в 2006 г. на территории Российской Федерации как инъекционный имплантат «Композиция гетерогенного коллагенсодержащего геля «СФЕРО®гель», (ФСР 2012/13033) производитель АО «БИОМИР сервис», Россия (Рис. 1).

Резорбируемый гидрогелевый имплантат СФЕРО®гель, временно замещающий функции ВКМ, предназначен для восстановления структуры и объема тканей за счет стимулирования клеток синтезировать собственный внеклеточный матрикс.

В состав гетерогенного биоимплантата СФЕРО®гель входят практически все низко- и высокомолекулярные компоненты внеклеточного матрикса тканей животного происхождения, включая как основные (коллаген, протеогликаны и гликопротеины), так и множество других биологически активных веществ. Так как в составе находится

гидролизированный коллаген, то СФЕРО®гель по аминокислотному составу соответствует полноценному ВКМ [3].

Конечный продукт СФЕРО®гель представляет собой находящийся в шприце стерильный прозрачный, слегка опалесцирующий, вязкий, рН-сбалансированный вязкоупругий гидрогель, имеющий, в ряде случаев, видимую зернистую структуру (Рис. 2). Содержание связанной воды в СФЕРО®гель не менее $32,8 \pm 0,5$ мас.%, набухаемость – не ниже $86,6 \pm 3,0$ мас.%, рН $6,8 - 7,2$ [3, 4].

СФЕРО®гель получают из гидролизата коллагенсодержащих тканей животного происхождения с использованием технологии ультрадиспергирования гидрогелей с последующей радиационной сшивкой [3]. Биополимерный гидрогель состоит из двух составляющих: твердой (микрочастиц из сшитого гидролизата) и жидкой (из исходного гидролизата), взятых в определенном соотношении. Для увеличения времени биодеградации СФЕРО®гель в ряде случаев микрочастицы изготавливают из высокоочищенного коллагена животного происхождения, что исключает проявление нежелательных иммунных реакций [3, 4].

Наличие микрогетерогенной структуры гидрогеля (Рис. 2) позволило увеличить время его биодеградации до нескольких месяцев по сравнению с биоимплантатами из коллагена, рассасывающимися в течение 3 – 4 недель и повышающими риск формирования рубцовой ткани [5].

По данным СЭМ (сканирующей электронной микроскопия), СФЕРО®гель обладает развитой структурой диффузионных пор от 200 до 400 мкм, что позволяет клеткам свободно прикрепляться к поверхности микрочастиц (Рис. 3).

Варьируя степень сшивки, размер микрочастиц в геле и отношение твердой (микрочастицы) и жидкой фаз, был создан линейный ряд имплантатов, отличающихся временем резорбции и реологическими свойствами. Как видно из Табл. 1, СФЕРО®гель обладает ярко выраженными упругими свойствами, увеличивающимися в зависимости от размера микрочастиц [6].

Время резорбции биогеля зависит от размера микрочастиц и места его имплантации

Преобладание упругих свойств над вязкостными свойствами позволяют СФЕРО®гелю оставаться в области имплантации до полной резорбции, что было доказано, например, в экспериментах на крысах при имплантации в подкожно-жировую клетчатку (Рис. 4) [5].

Уникальными свойствами СФЕРО®геля являются:

1. микрогетерогенность, обеспечивающая его биостимулирующие свойства более длительное время по сравнению с существующими инъекционными средствами на основе гиалуронозной кислоты или гомогенных коллагенсодержащих гелей;
2. ярко выраженный регенерирующий эффект всех типов здоровой ткани на клеточном и молекулярном уровнях;
3. возможность формировать объем тканей за счет введения на разную глубину имплантата с разной консистенцией;
4. гипоаллергенность за счет использования при его изготовлении компонентов внеклеточного матрикса эмбриональных или постнатальных коллагенсодержащих тканей животного.

Биологическая безопасность СФЕРО®гель была доказана в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, проведенных в соответствии с международными стандартами серии ГОСТ ISO 10993 в лаборатории, аккредитованной для доклинических испытаний медицинских изделий.

В настоящее время известен целый ряд работ [4 – 5, 7 – 16], посвященных исследованию функциональной эф-

Рисунок 1. Общий вид инъекционной формы СФЕРО®гель



Рисунок 2. Микрофотография гетерогенной структуры СФЕРО®гель. Оптическая микроскопия, ув. X40

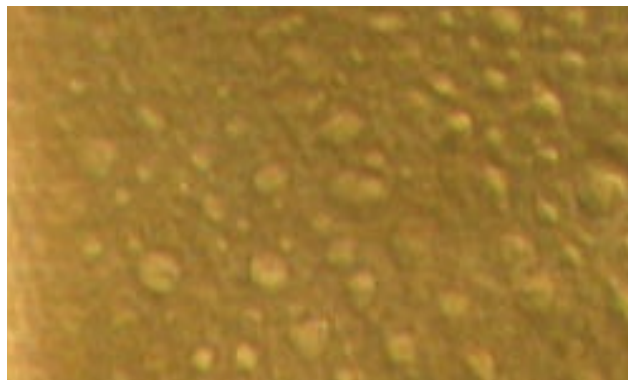
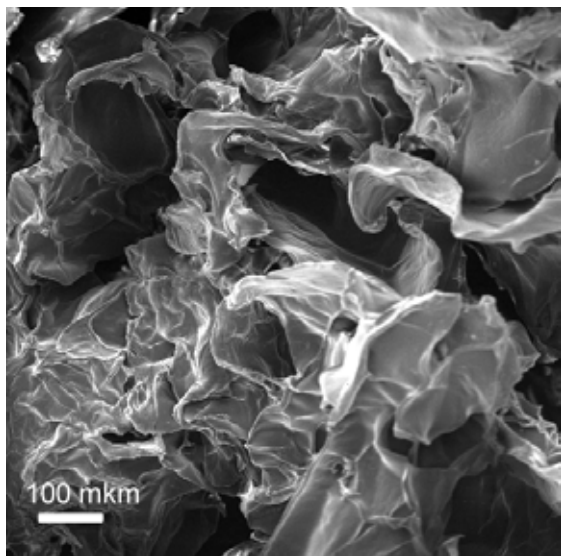
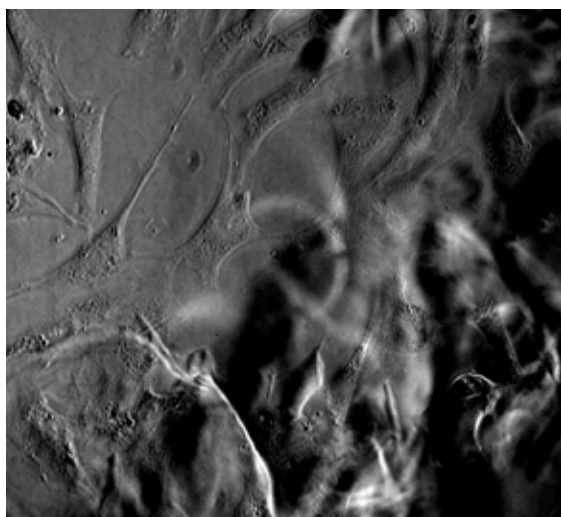


Рисунок 3. а – структура СФЕРО®гель, сканирующая электронная микроскопия; б – фибробластоподобные мезенхимальные стволовые клетки костного мозга крыс (Вистар) на поверхности СФЕРО®гель. Время культивирования – 7 суток. Оптическая микроскопия, ув. X400

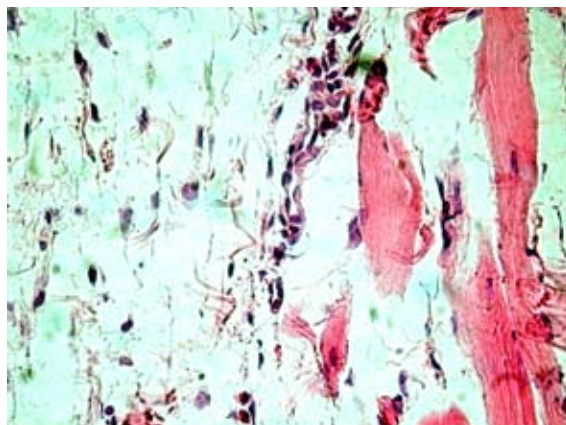


а

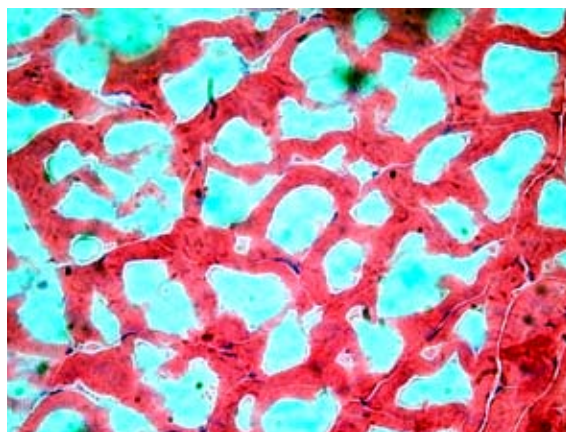


б

Рисунок 4. Биорезорбция СФЕРО®гель (красный цвет) при имплантации в подкожно-жировую клетчатку крысы. а – гистологическая картина после имплантации в подкожно-жировую клетчатку на сроке 1 месяц. (Ув. X200) гематоксилин – эозин; б – гистологическая картина после имплантации в подкожно-жировую клетчатку на сроке 3 месяца. (Ув. X200) гематоксилин – эозин



а



б

фективности биоимплантата СФЕРО®гель в различных областях заместительной и регенеративной медицины:

- биоактивная искусственная синовиальная жидкость при лечении деформирующих артрозов коленных суставов;
- лечение эрозий роговицы при синдроме «сухого» глаза;
- профилактика формирования грубых послеоперационных рубцовых тканей;
- создание объема тканей при хирургическом лечении синдромальных больных с липодистрофией;
- ревитализация кожи для создания омолаживающего и косметического эффекта;
- хирургическое лечение травм периферических нервов и сухожилий;
- регенерация миометрия матки;
- носитель и депо биологически активных веществ при лечении мочевого пузыря;
- тканеинженерные конструкции и регенеративная медицина.

В экспериментальных работах по созданию биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) в последнее время для получения эквивалента хрящевой ткани разрабатывают тканеинженерные конструкции с применением различных трехмерных полимерных матриц [13 – 15].

В проведенных нами экспериментальных исследованиях в условиях *in vitro* и *in vivo* была доказана перспективность данного подхода для формирования тканеинженерной конструкции хрящевой ткани (ТИК ХТ) в условиях *in situ* при имплантации клеточно-инженерной конструкции

Таблица 1. Характеристические параметры линейного ряда инъекционных форм композиции биополимерного гетерогенного гидрогеля СФЕРО®гель

Наименование композиции	Средний размер частиц мкм	Модуль упругости Па	Модуль вязкости Па	Время резорбции
Сферо®гель -long	145.79 ± 0.09	1170 ±12	62.9 ± 7.9	6 – 12 месяцев
Сферо®гель -medium	78.54 ± 0.06	97.0 ± 8.9	13.3 ± 2.4	1 – 3 месяца
Сферо®гель -light	42.31 ± 0.15	49.1 ± 4.7	17.7 ± 3.1	3 недели – 1 месяц

Рисунок 5. ТИК ХТ: А – 28 дней хондрогенной дифференцировки. Окрашивание гематоксилином и эозином. Б – 28 дней хондрогенной дифференцировки. Окрашивание по методу Маллори. В, Г – 42 дня хондрогенной дифференцировки. Окрашивание гематоксилином и эозином. Микросфероподобные структуры указаны стрелками; 1 – МСК ЖТч, 2 – биополимерный матрикс СФЕРО®гель. Ув. X200.

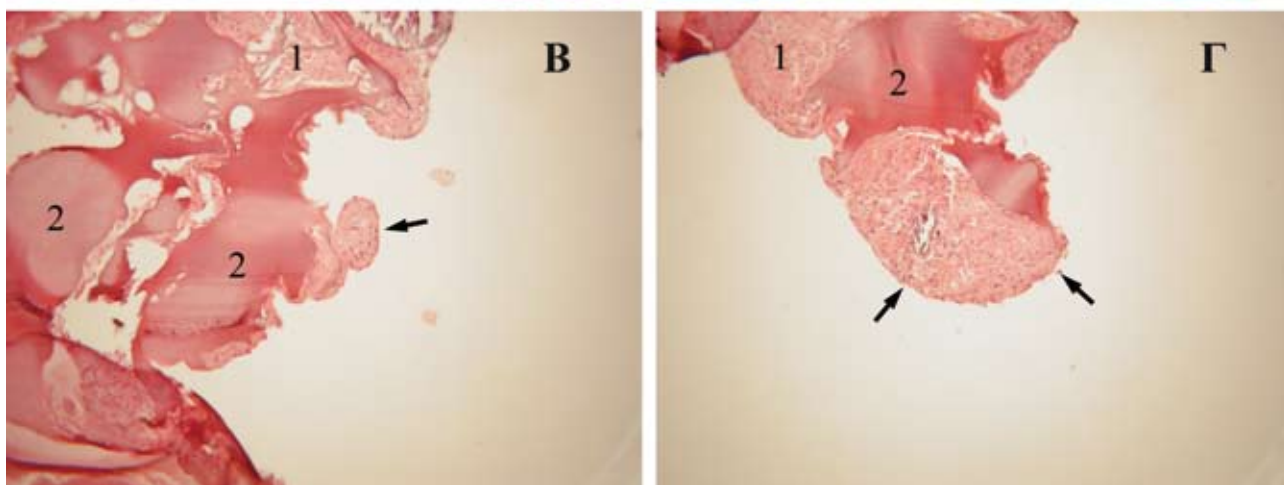
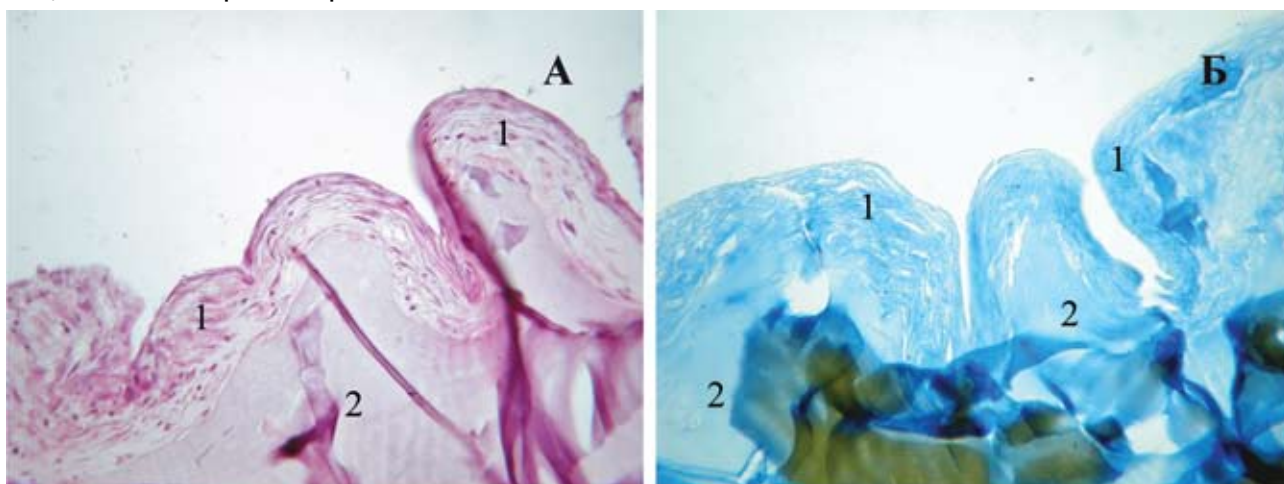
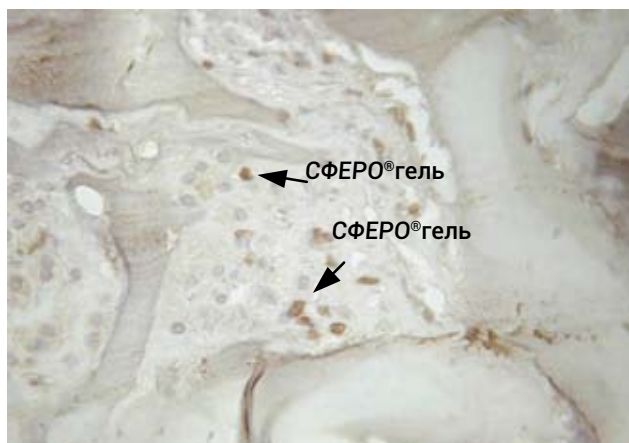


Рисунок 6. ТИК ХТ, 42 дня хондрогенной дифференцировки. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к коллагену человека II типа (показано стрелками). Ув. X1000.



хрящевой ткани (КИК ХТ), состоящей из биополимерного микроструктурированного гидрогелевого матрикса (СФЕРО®гель-long) и мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека (МСК ЖТч) [13, 14].

Было доказано, что оптимальными условиями формирования ТИК ХТч *in vitro* являются хондрогенная дифференцировка МСК ЖТч в процессе культивирования непосредственно в СФЕРО®гель-long при плотности посева 2×10^6 кл/мл матрикса. При культивировании КИК ХТ выбранного состава (СФЕРО®гель-long, МСК ЖТч, хондрогенная среда) к 42 суткам хондрогенной дифференцировки наблюдали увеличение клеточной массы, прорастание клеток в толщу биоимплантата и увеличение количества внеклеточного матрикса, вырабатываемое клетками. Клетки активно пролиферировали и вырабатывали компоненты собственного внеклеточного матрикса, в частности гликозаминогликаны (ГАГ) и коллаген 2 типа, которые постепенно замещали резорбирующий гидрогелевый матрикс (фиолетовая окраска) к коллагену человека II типа, что может говорить о начале формирования *in vitro* тканеинженерной конструкции ХТ (Рис. 5) [13].

Клеточно-инженерную конструкцию хрящевой ткани помещали в подкожно-жировую клетчатку. Через 28 суток в препаратах опытной группы наблюдали более выраженную, по сравнению с предыдущим сроком наблюдения, резорбцию биополимерного гидрогеля с замещением его рубцовой тканью.

Фрагменты геля окружены гетерогенной клеточной массой с явным преобладанием фибробластоподобных клеток, в некоторых участках формирующих соединительнотканную капсулу. Выявлено прогрессивное увеличение массы коллагеновых волокон и локальное синезеленое окрашивание, характерное для ГАГ. В отдельных участках имплантата встречаются немногочисленные лакунообразные структуры, характерные для хрящевой ткани. Можно предположить, что на более поздних сроках собственный внеклеточный матрикс ТИК ХТ постепенно заместит резорбирующийся временный биополимерный матрикс СФЕРО®гель-long с образованием полностью биологической хрящевой ткани (Рис. 6) [13].

В основе самой распространённой формы поражения суставов остеоартроза лежит изнашивание, истончение и гибель суставного хряща с выпадением его амортизационной функции с последующими дегенеративно-дистрофическими изменениями. При неэффективности или недостаточной эффективности противовоспалительной нестероидной терапии традиционно назначают внутрисуставные инъекции кортикостероидов, препаратов гиалуроновой кислоты, внутрисуставное введение протеза синовиальной жидкости, которые приходится повторять до 3 и более раз в год. Благодаря высоким биостимулирующим свойствам биоимплантата СФЕРО®гель восстановление нарушенной структуры и функции сустава, возможно, происходит за счет инициирования процессов собственной регенерации гиалинового суставного хряща [15].

При проведении проспективного, двойного слепого, плацебо-контролируемого, рандомизированного исследования было достоверно установлено положительное действие внутрисуставного введения СФЕРО®гель-light в течение не менее 3 месяцев пациентам с гонартрозом, которые выразились в уменьшении боли и улучшении функциональной активности сустава при хорошей переносимости инъекции препарата [16]. В данном случае инъекционная композиция гетерогенного имплантируемого геля СФЕРО®гель применяется не только как искусственная синовиальная жидкость, но и как имплантат с регенераторным действием, доказанным на экспериментальной модели остеоартроза коленных суставов [15]. СФЕРО®гель эффективен не только в лечении самих суставов, но и при повреждении сухожилия после тенорафии и/или реинсерции. СФЕРО®гель-medium вводили в объеме 2 – 4 мл в сухожильное влагалище или непосредственно вокруг сухожилия в конце операции (при помощи катетера 21 G для внутривенных инфузий). При закрытом повреждении связок вводили пролонгированную форму СФЕРО®гель-long в объёме от 0,5 до 2 мл (в зависимости от локализации и вида повреждения). При закрытом повреждении сухожилия разгибателя пальца на уровне дистального межфалангового сустава 0,5 – 1 мл и частичного повреждения мышц применяли СФЕРО®гель-medium от 1 до 4 мл, а для ускорения регенерации ран – СФЕРО®гель-light. При impingement синдроме плеча, бедра; при эпикондилитах и других не инфекционных бурсопатиях и этензитах, после купирования воспаления вводили СФЕРО®гель-light как в сам сустав, так и параартикулярно. Препарат вводили как во время оперативного лечения (сухожильное влагалище, n=5), так и в окружающие ткани при вяло заживающих ранах (n=4), в места дефекта мышечных (n=6), сухожильных (n=5) волокон и связок (n=6). При оценке результатов лечения, не зависимо от диагноза, учитывались скорость заживления раны, время восстановления функции конечности и данные ультразвукового исследования [9].

Удалось полностью восстановить целостность кожного покрова при глубоких вяло заживающих ранах, начать раннюю реабилитацию после шва и двухэтапной пластики сухожилия глубокого сгибателя пальца кисти с полным восстановлением подвижности пальца. Было восстановлено разгибание ногтевой фаланги пальца кисти при повреждении сухожилия разгибателя на уровне дистального межфалангового сустава. Положительный эффект был достигнут при лечении нестабильности в межфаланговом и пястно-фаланговом суставах в случае разрыва коллатеральной связки сустава и восстановления движения в плечевом суставе при частичном повреждении надостной мышцы. Во всех случаях с 16 пациентами была отмечена положительная динамика в скорости заживления ран, времени восстановления функции конечности. Результаты подтверждены ультразвуковым исследованием, динамометрией, гониометрией и планиметрией [10].

Заключение

Механизм терапевтического действия композиции гетерогенного имплантируемого геля СФЕРО®гель как резорбируемого биомиметика ВКМ заключается в стимулировании процессов пролиферации и дифференцировки клеток с последующим замещением ВКМ, синтезируемым клетками. Наличие регенераторных свойств композиции гетерогенного имплантируемого геля СФЕРО®гель – резорбируемого биомиметика ВКМ и обуславливает положительные результаты лечения пациентов с различными травмами и дегенеративно-дистрофическими заболеваниями опорно-двигательного аппарата.

Благодарность

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке АО «БИОМИР сервис», г. Краснознаменск, Московская область.

Литература

1. Вёрткин А. Л., Шамуилова М. М., Наумов А. В., Плескановская Н. В. Остеоартроз в общей медицинской практике. Методические рекомендации, Москва, 2008.
2. Fisher S. A., Tam R.Y., Shoichet M. S. Tissue mimetics: engineered hydrogel matrices provide biomimetic environments for cell growth. *Tissue Engineering*, 2014, part A, v. 20 (5, 6), p. 895 – 898.
3. Севастьянов В. И., Перова Н. В. Инъекционный гетерогенный биополимерный гидрогель для заместительной и регенеративной хирургии и способ его получения. Патент РФ № 2433828 (2010).
4. Перова Н. В., Севастьянов В. И. Биополимерный гетерогенный гидрогель СФЕРО®гель - инъекционный биодеградируемый имплантат. *Практическая медицина*, 2014, № 8 (84), с. 111 – 116.
5. Перова Н. В., Порунова Ю. В., Урьяш В. Ф., Фаминская Л. А., Крашенинников М. Е., Расулов М. Ф., Онищенко Н. А., Севастьянов В. И., Шумаков В. И. Биодеградируемый коллагенсодержащий матрикс СФЕРО®гель для клеточной трансплантации. *Перспективные материалы*, 2004, № 2, с. 52 – 59.
6. Применение инъекционных форм биополимерных гетерогенных гидрогелей при дегенеративно-дистрофических поражениях суставов. *Практическое пособие для врачей*. М., ООО Издательство Триада, 2012, с. 27.

Полный список литературы доступен по запросу в редакции