

Т. В. Дружинина<sup>1</sup>, В. В. Бочкарёв<sup>2</sup>, В. Н. Виденин<sup>2</sup>, А. А. Климентьев<sup>3</sup>, В. П. Попов<sup>4,5</sup>

## ЗАМЕЩЕНИЕ КОСТНОЙ ТКАНИ У ЖИВОТНЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОДЕГРАДИРУЕМОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ ГИДРОКСИАПАТИТА

T. V. Druzhinina, V. V. Bochkarev, V. N. Videnin, A. A. Klimentyev, V. P. Popov

## REPLACEMENT OF BONE TISSUE IN ANIMALS USING BIODEGRADABLE MATERIAL BASED ON HYDROXYAPATITE

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский филиал ГУП «Экспериментально-производственные мастерские» ФМБА России, г. Санкт-Петербург<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» Минздрава РФ, г. Санкт-Петербург<sup>3</sup>ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава РФ, г. Санкт-Петербург<sup>4</sup>ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, г. Томск<sup>5</sup>ФГБУЗ «Клиническая больница № 81» ФМБА России, г. Северск

С целью оценки результатов применения биodeградируемого материала на основе гидроксиапатита для замещения дефекта костной ткани было исследовано 15 кроликов, 10 – в экспериментальной группе, 5 – в группе контроля. Кроликам экспериментальной группы была выполнена пластика искусственно созданного дефекта бедренной кости материалом для замещения костной ткани. В группе контроля была проведена аналогичная операция без остеозамещающей пластики дефекта. Динамику репаративной регенерации кости определяли с помощью биохимического исследования сыворотки крови и рентгенографии места дефекта через 1, 2, 4, 8 нед после операции. Гистологическое исследование зоны дефекта выполняли через 4 и 8 нед после операции. Результаты исследования свидетельствуют о стимулирующем влиянии биodeградируемого материала на процессы репаративной регенерации кости.

**Ключевые слова:** биodeградируемый материал, дефект костной ткани, репарация, маркеры регенерации.

In order to assess the results of use of the biodegradable material on the basis of replacement for hydroxyapatite bone defect was studied in rabbits 15, 10 – in the experimental group, 5 – in the control group. Rabbits experimental group was performed plastic artificially created defect femoral replacement material for bone tissue. 5 rabbits was carried out a similar operation without plastics defect in the control group. Reparative regeneration of bone dynamics determined by biochemical analysis radiologic investigation defect in terms of 1, 2, 4, and 8 weeks after surgery. Histological examination of the area of the defect was performed after 4 and 8 weeks after surgery. The findings suggest that the stimulating effect of biodegradable material in the process of reparative regeneration of bone.

**Key words:** biodegradable material, bone defect, reparation, markers of regeneration.

УДК УДК 616-018.4-089.844:[615.462:661.635.41] -092.9

### ВВЕДЕНИЕ

В мире ежегодно проводится более 450 тыс. операций по устранению дефектов костной ткани и замене различных суставов. В России это количество составляет более 70 тыс. в год. При этом доля костнопластических операций с применением искусственных материалов составляет менее 10 % из-за их недостатка [1, 2]. В связи с этим разработка новых костнозамещающих материалов, технологии их изготовления и применения в медицинской практике является актуальной задачей [3]. Наиболее перспективными

материалами для изготовления носителей в тканевой инженерии являются полимеры биологического происхождения. Продукты деградации таких полимеров не оказывают токсического действия, а иногда могут служить высокоэффективными биостимуляторами [4]. Основные требования, которым должны соответствовать новые материалы для замещения костной ткани:

- заполнение всего объема дефекта;
- наличие свойства остеоиндуктивности, то есть активно побуждать остеобласты и, возможно, другие мезенхимальные клетки к формированию кости;

– наличие показателей биоинтеграции и биосовместимости, то есть быть биодеградируемым и не вызывать у реципиента воспалительных и иммунных реакций [5, 2].

Цель исследования – оценка результатов применения биодеградируемого материала на основе гидроксиапатита для замещения дефекта костной ткани у кроликов.

Задачи исследования:

– оценить биосовместимость материала на основе гидроксиапатита с костной тканью на модели с животными по уровню биохимических маркеров, а также на основании данных рентгеновского исследования;

– провести оценку эффективности использования биодеградируемого материала на основе гидроксиапатита для замещения костной ткани на модели с лабораторными животными.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В ходе проведения эксперимента было прооперировано 15 кроликов-метисов, помесь ангорской породы и декоративного кролика, возраст 1,5 мес, самцы, помет от одной матери. Животные содержались в одинаковых условиях в соответствии с требованиями биоэтики. Режим содержания всех групп животных соответствовал стандартным условиям: средняя температура в помещении 20–22 °С, ежедневное трехразовое кормление. В качестве корма использовались сено, комбикорм.

Применяемый материал для замещения костной ткани представляет собой смесь порошков фосфатов кальция и магния и раствор фосфопротеина. При их смешении образуется пластичная масса и при 37 °С в ходе затвердевания формируется пористая структура с высокой удельной поверхностью порядка 96 м<sup>2</sup>/г. Время схватывания биодеградируемого материала составляет 10 мин. Ему можно придать любую форму, что удобно при заполнении костных дефектов.

Операцию проводили под наркозом (изофлоран, 3 %). После обработки операционного поля бедра 0,5 % спиртовым раствором хлоргексидина из наружно-бокового доступа послойно рассекали мягкие ткани. В средней трети бедренной кости формировали отверстия 0,4 см диаметром. Сформированный костный дефект заполняли биодеградируемым материалом на основе гидроксиапатита (рис. 1). Операционную рану зашивали послойно наглухо. После операции каждому животному вводили бициллин 3 по 200 тыс. ЕД, 0,5 мл этамзилата (20 мг/кг) и 0,3 мл кетофена (0,1 мл/кг).

Формула крови была подсчитана на световом микроскопе фирмы Nikon после окрашивания



Рис. 1. Биодеградируемый материал для заполнения костного дефекта

мазков крови по стандартной методике азуром II-эозином. Кровь забиралась у животных прижизненно из краевой вены уха.

В целях выявления системных реакций организма на биодеградируемый материал во все сроки наблюдения было проведено исследование показателей периферической крови. Для выяснения локального действия материала выполнялись рентгенологические исследования. Кроме того, готовились и изучались гистологические препараты тканей, окружающих материал (у пяти кроликов – через 4 нед и у пяти кроликов – через 8 нед после операции).

Определение уровней общего кальция и неорганического фосфора проводили на биохимическом анализаторе фирмы Verno (Electa Lab., Италия). Контроль качества осуществляли в каждой серии исследований контрольными материалами SERODOS PLUS (Human GmbH, Германия). Кальций определяли реактивами фирмы Sentinel (Италия), фосфор – реактивами фирмы Human (Германия).

Гистологическое исследование тканей, окружающих материал, выполняли по общепринятой методике. Декальцинацию в трихлоруксусной кислоте проводили после предварительной фиксации в формалине, жидкости Боуэна. К 5–10 %-му водному раствору кислоты добавляли 10–20 %-й раствор формалина. Через 7 сут материал промывали в 96 %-м спирте в течение 3–4 сут при ежедневной его смене. Метод окраски: гематоксилин и эозин. Увеличение × 100.

Результаты лечения оценивали на основании общего состояния животных и рентгенографии области бедра через 2, 4 и 8 нед после операции.

Оценка полученных результатов проводилась с помощью методов вариационной статистики с использованием пакетов стандартных статистических программ Microsoft Excel XP, а также с помощью программы Statistica for Windows Version 6.0 (StatSoft Inc., США). Определялись среднее значение ( $\bar{X}$ ), статистическая девиация (SD), значение вероятности ( $p$ ). Для анализа имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (критерий Колмогорова–Смирнова). Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, применяли непараметрический критерий Манна–Уитни (U-критерий). Различия двух сравниваемых величин считали статистически значимым, если вероятность их тождества составляла менее 5 % ( $p < 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В послеоперационном периоде в течение первых 2 сут у всех экспериментальных животных отмечалась выраженная гиподинамическая реакция, сопровождающаяся значительным отеком оперированной области. Затем в период до 7 сут двигательная активность животных нормализовалась с сохранением отека мягких тканей бедра. Через 2 мес после операции наступало полное восстановление.

При анализе динамики показателей периферической крови у кроликов были выявлены изменения, зафиксированные в табл. 1.

Понижение количества эритроцитов вероятно связано с проведенной операцией и кровопотерей, в то время как повышение количества тромбоцитов является достаточным фактором для остановки кровотечения. Увеличение уровня лейкоцитов говорит о возникновении воспалительного процесса, который сохраняется в течение 2–3 нед. Изменения в лейкоцитарной формуле свидетельствуют о наличии аллергической реакции, более выраженной при применении материала по сравнению с группой контроля, но постепенно затухающей в динамике наблюдения. Отсутствие миелоцитов, юных клеток и палочкоядерных указывает на отсутствие инфекционных заболеваний.

При анализе изменений биохимических показателей крови у кроликов получены данные, свидетельствующие об увеличении содержания кальция в крови уже через 2 нед наблюдения и наиболее выраженные через 1 мес после операции при применении материала для замещения костной ткани. Это позволяет предположить, что материал в организме начинает деградировать, что приводит к локальному и системному насыщению этими элементами. В группе контроля, напротив, содержание кальция в крови уменьшалось на поздних сроках наблюдения (табл. 2).

Таблица 1  
Среднестатистические значения гематологических показателей крови у кроликов в динамике наблюдения,  $\bar{X} \pm SD$

Показатель	До операции	Срок, нед							
		Эксперимент				Контроль			
		1	2	4	8	1	2	4	8
Эритроциты, $10^{12}/\text{л}$	$6,4 \pm 0,9$	$5,9 \pm 0,8$	$5,09 \pm 0,8$	$5,1 \pm 0,9$	$5,4 \pm 1,6$	$5,1 \pm 0,8$	$4,5 \pm 0,9$	$5,0 \pm 1,2$	$5,1 \pm 1,5$
Тромбоциты, $10^9/\text{л}$	$133 \pm 8,2$	$145 \pm 8,6$	$135 \pm 10,2$	$155 \pm 10,7$	$147 \pm 8,9$	$167 \pm 10,4$	$146 \pm 8,9$	$150 \pm 10,7$	$145 \pm 9,5$
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	$5,4 \pm 0,8$	$8,3 \pm 1,3$	$8,8 \pm 1,1$	$7,9 \pm 0,9$	$5,6 \pm 1,5$	$7,3 \pm 1,4$	$7,7 \pm 0,8$	$6,5 \pm 0,6$	$5,3 \pm 0,4$
Лимфоциты, $10^9/\text{л}$	$4,03 \pm 0,4$	$4,15 \pm 0,7$	$3,56 \pm 0,9$	$3,95 \pm 0,6$	$3,25 \pm 0,7$	$4,56 \pm 0,5$	$5,3 \pm 0,7$	$4,36 \pm 0,5$	$3,58 \pm 0,4$
Сегментоядерные нейтрофилы, $10^9/\text{л}$	$2,8 \pm 0,3$	$1,08 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,14$	$0,95 \pm 0,15$	$1,53 \pm 0,21$	$1,31 \pm 0,19$	$1,56 \pm 0,12$	$1,4 \pm 0,3$
Эозинофилы, $10^9/\text{л}$	$0,2 \pm 0,01$	$2,66 \pm 0,07$	$2,59 \pm 0,02$	$2,37 \pm 0,13$	$1,4 \pm 0,08$	$1,2 \pm 0,05$	$0,77 \pm 0,12$	$0,46 \pm 0,01$	$0,27 \pm 0,06$
Базофилы, $10^9/\text{л}$	$0,9 \pm 0,05$	0	$0,26 \pm 0,09$	$0,08 \pm 0,01$	0	0	$0,15 \pm 0,01$	0	0
Моноциты, $10^9/\text{л}$	$0,15 \pm 0,02$	0	$0,18 \pm 0,016$	$0,08 \pm 0,015$	0	0	$0,15 \pm 0,01$	0	0



Таблица 2

Среднестатистические значения содержания макроэлементов в периферической крови кроликов в различные сроки наблюдения после замещения дефекта бедренной кости биодеградируемым материалом,  $X \pm SD$

Показатель	До операции	Срок, нед					
		Эксперимент			Контроль		
		2	4	8	2	4	8
Общий кальций, мМ/л	$3,2 \pm 0,27$	$3,99 \pm 0,18$	$5,71 \pm 0,07^*$	$4,14 \pm 0,16$	$3,81 \pm 0,11$	$4,9 \pm 0,18$	$3,65 \pm 0,15$
Неорганический фосфор, мМ/л	$0,96 \pm 0,2$	$1,18 \pm 0,14$	$0,94 \pm 0,08$	$1,18 \pm 0,12$	$1,47 \pm 0,09$	$1,22 \pm 0,16$	$1,5 \pm 0,08$

\* – статистически значимые различия согласно U-критерию Манна–Уитни с соответствующим показателем до операции

Известно, что концентрация кальция в крови оказывает огромное влияние на такие процессы в организме, как пролиферация и дифференциация клеток, адгезия клеток на матриксе. Кроме того, его повышенный уровень увеличивает активность ключевых метаболических ферментов митохондрий, считается, что обратимое поглощение  $Ca^{2+}$  в митохондрии координирует энергетическую продукцию для обеспечения нужд клетки. Уровень содержания кальция имеет огромное значение для процесса репарации костной ткани.

Любое нарушение гомеостаза кальция вызывает расстройство остеогенеза. Если его количества недостаточно, то эндостально-трабекулярная резорбция усиливается, баланс между костеобразованием и резорбцией снижается.

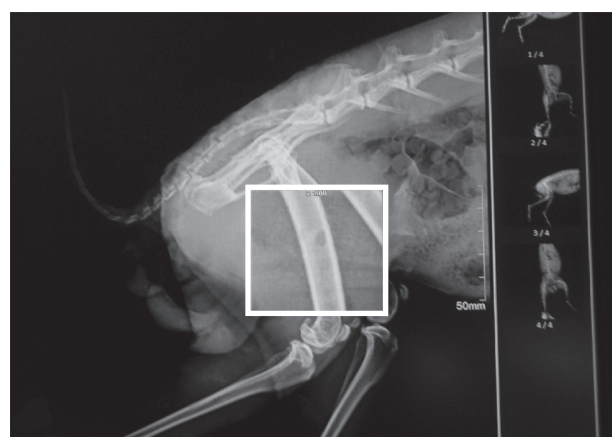
Данные биохимического исследования подтверждаются рентгеновскими снимками. Ввиду небольшого размера животного оценку образования костной мозоли проводили по изменению размера отверстия бедренной кости (рис. 2).

После 1-го мес реабилитации подопытных животных искусственно вызванное отверстие уменьшается в размерах и зарастает костной тканью, чего нельзя сказать о животных контрольной группы (рис. 3).

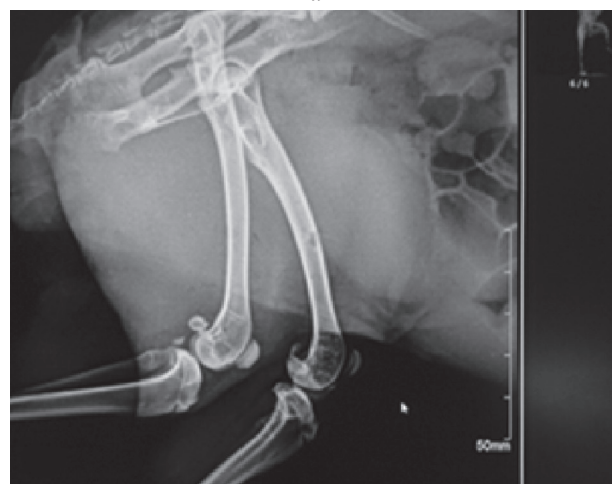
Об образовании костной мозоли можно судить по интенсивности заполнения искусственно сформированного отверстия костной тканью, которое более выражено у животных экспериментальной группы.

Восьмая неделя наблюдения сопровождается полным восстановлением костной ткани у животного экспериментальной группы. В то время как у животных контрольной группы сохраняются дефекты костной ткани (рис. 4).

Эти данные подтверждаются гистологическими исследованиями (рис. 5). Через 4 нед после имплантации внутри материала формируется костная ткань. Единичные костные балки присутствовали в глубоких слоях. На представленных снимках



а

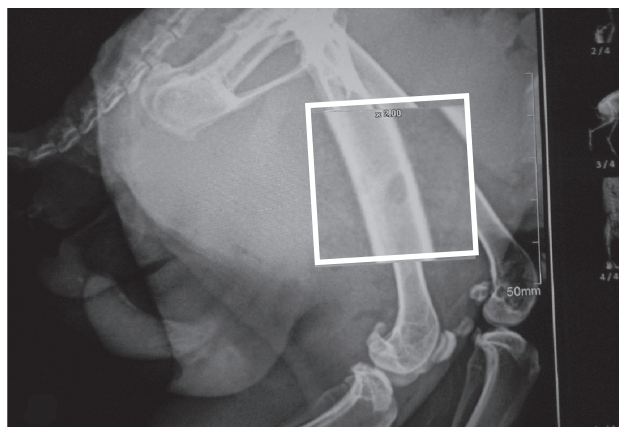


б

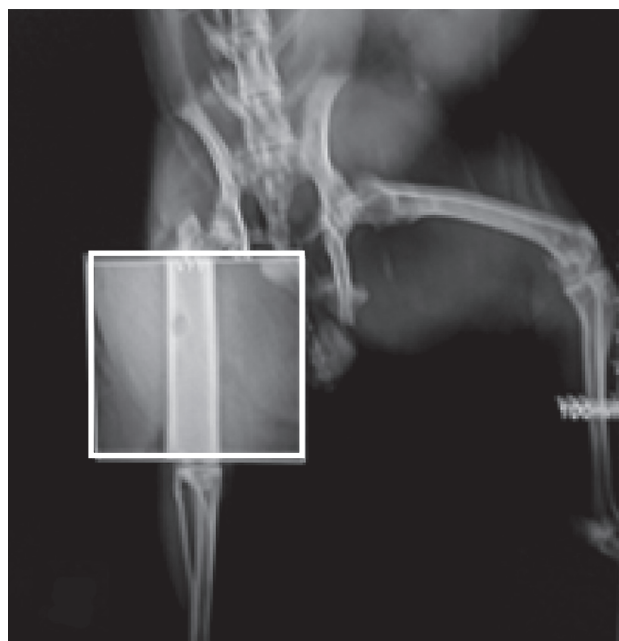
Рис. 2. Рентгенограмма, 2 нед после операции (а – контроль, б – эксперимент)

видно, что поверхность материала (1) частично покрыта фибробластами. Матрикс (1), местами покрытый остеогенными клетками, контактирует со зрелой костью (2), места контакта указаны стрелками. Полости между фрагментами матрикса и костными балками заполнены клетками соединительной ткани (3). Многоядерная клетка на выделенном фрагменте – контактирующий

с материалом матрикса остеокласт. Рядом на поверхности матрикса располагаются остеогенные клетки.



а



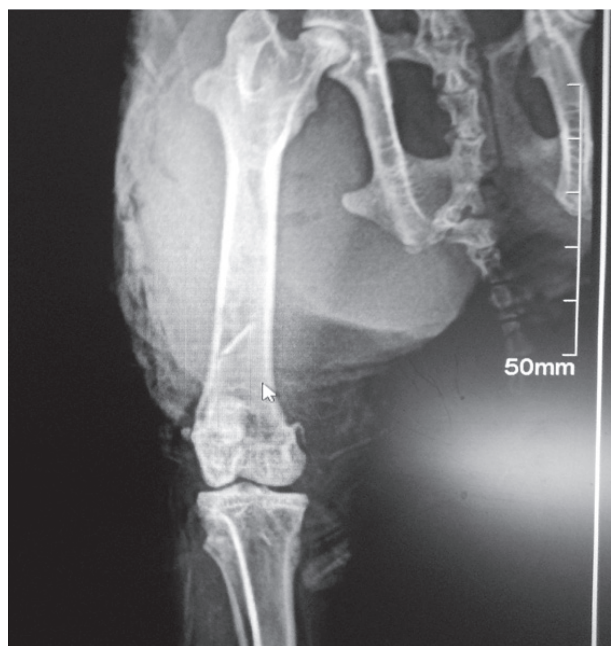
б

Рис. 3. Рентгенограмма, 4 нед после операции (а – контроль, б – эксперимент)

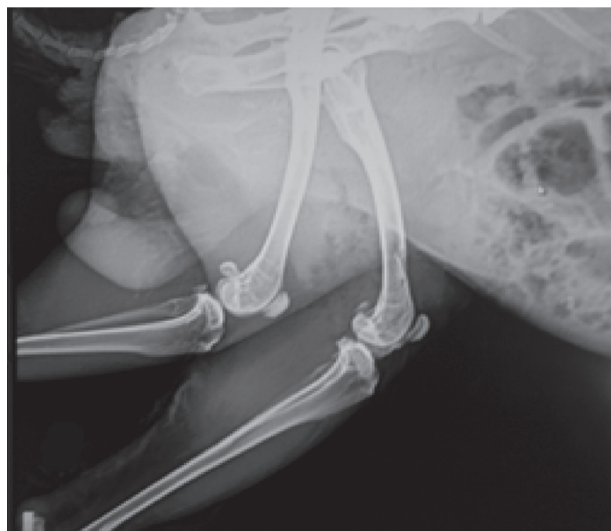
В то же время у животных контрольной группы признаков остеогенеза практически не наблюдалось даже через 8 нед после операции (рис. 6).

Внутренняя стенка дефекта была выстлана фиброзной тканью. На остальном протяжении дефект окружен костью типичного строения. При увеличении  $\times 200$  (рис. 7) отчетливо видно продуктивное воспаление с большим количеством фибробластов.

Биодеградируемый материал интенсифицирует процессы регенерации костной ткани, что наиболее выражено через 8 нед после оперативного вмешательства (рис. 5). Известно, что остеокласты осуществляют непрерывный управляемый процесс реконструкции и обнов-



а



б

Рис. 4. Рентгенограмма, 8 нед после операции (а – контроль, б – эксперимент)

ления костной ткани, обеспечивая необходимый рост и развитие скелета, структуру, прочность и упругость костей [6–8]. Активный остеокласт начинает резорбировать костную ткань (рис. 5). На стороне прилегания остеокласта к разрушаемой поверхности различают две зоны. Первая зона – наиболее обширная, называемая щеточной каемкой, или гофрированным краем. Через мембрану остеокласта освобождаются лизосомы, содержащие большое количество гидролитических ферментов (катепсины К, D, В, кислая фосфатаза, эстераза, гликозидазы и др.), с помощью которых остеокласты приступают к резорбции минерального матрикса кости, прежде всего, гидроксиапатита и искусственного материала,



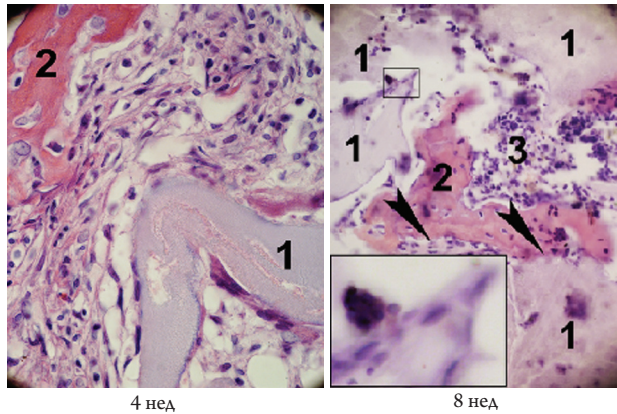


Рис. 5. Зона дефекта кости, 4 и 8 нед после операции с использованием материала: 1 – материал, 2 – костная балка, 3 – клетки костного мозга. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200

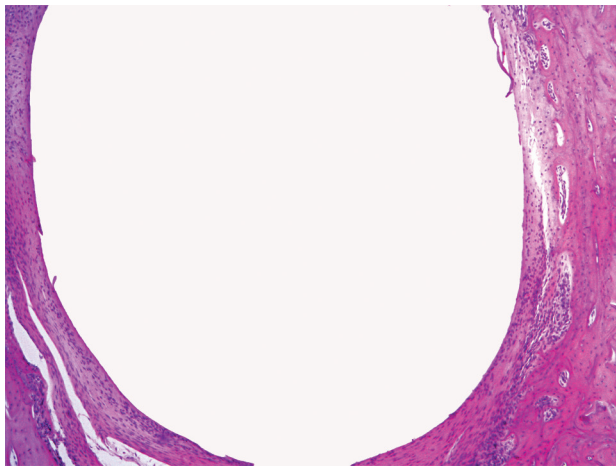


Рис. 6. Зона дефекта кости, 8 нед после операции, контроль. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100

находящегося в очаге повреждения [7, 8]. Во время этого процесса увеличивается концентрация ионов кальция, что способствует миграции остеобластов в поврежденный участок, активации ряда рецепторов на клеточной мембране, реорганизации цитоскелета клеток и усиления адгезии [8]. Остеобласты запускают образование вокруг и в веществе материала новых микрокристаллов кальцийфосфатов и осуществляют быстрое формирование полноценной кости. Таким образом, активация резорбтивных процессов параллельно приводит

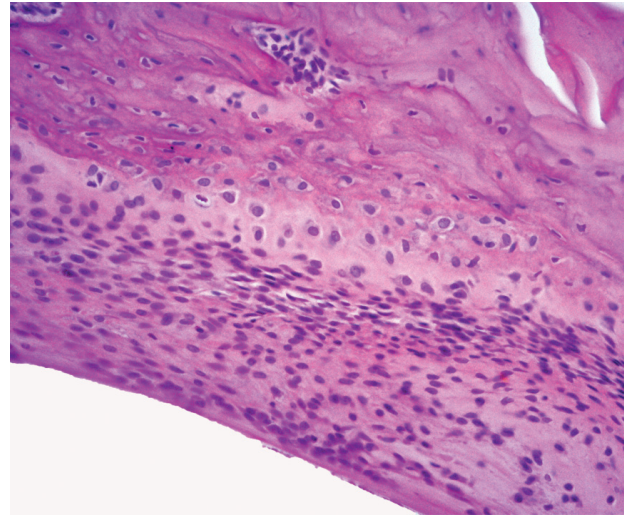


Рис. 7. Зона дефекта кости, 8 нед после операции, контроль. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200

к компенсаторному увеличению активности остеобластов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При анализе динамики формирования костной ткани при использовании биодеградируемого материала на основе гидроксиапатита для ее замещения было выявлено, что, благодаря его сходству с костной тканью, происходит выраженное восстановление полноценной костной ткани в зоне дефекта бедренной кости животных. При этом обеспечивается быстрая интеграция костной ткани и биодеградируемого имплантата с последующим ее восстановлением, что свидетельствует о биосовместимости материала на основе гидроксиапатита с костной тканью.

Введение биодеградируемого материала для замещения костной ткани интенсифицирует процессы регенерации кости в области оперативного вмешательства и является эффективным средством для замещения костных дефектов. Восстановительный послеоперационный период протекал у кроликов удовлетворительно, с быстрым снижением болевого синдрома, отсутствием локальных и системных осложнений в послеоперационном периоде.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Лекишвили М.В., Панасюк А.Ф. Новые биопластические материалы в реконструктивной хирургии // Вестник РАМН. – 2008. – № 9. – С. 33–36.
2. Швед С.И., Шевцов В.И., Сысенко Ю.М. Лечение больных с переломами костей предплечья методом чрескостного остеосинтеза. – Курган, 1997. – 294 с.
3. Convery F.R., Minter-Convery M. Acetabular augmentation in primary and revision total hip arthroplasty with cementless prosthesis // Clin. Orthop. – 1998. – V. 252. – P. 167–175.
4. Маршалл В. Дж. Клиническая биохимия. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Бином, 2002. – 384 с.

5. Риггз Б. А., Мелтон Л. Дж. Остеопороз: этиология, диагностика, лечение: пер. с англ. – СПб.: Невский диалект, 2000. – 558 с.
6. Dickson G. F., Buchanan D. Marsh Orthopaedic tissue engineering and bone regeneration // Technol. Health Care. – 2007. – № 15 (1). – P. 57–67.
7. Hall T. J. Reappraisal of the effect of extracellular calcium on osteoblastic bone resorption // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1994. – V. 202. – P. 456–462.
8. Improvement of the bone pin interface strength in osteoporotic bone using hydroxyapatite-coated tapered external fixator pin. A prospective randomized clinical study in wrist fractures / A. Moroni et al. // 67<sup>th</sup> Ann. Meeting of the American Acad. Orthop. Surg. – Florida, 2000. – P. 15–19.

## REFERENCES

1. Lekishvili M. V., Panasiuc A. F. The new bioplastic materials in reconstructive surgery // Bulletin of Medical Sciences, 2008, no. 9, pp. 33–36 (in Russian).
2. Swed S. I., Shevtsov V. I., Sysenko Y. M. Treatment of patients with fractures of the forearm bones by transosseous osteosynthesis. Kurgan, 1997, 294 p. (in Russian).
3. Convery F. R., Minter-Convery M. Acetabular augmentation in primary and revision total hip arthroplasty with cementless prosthesis // Clin. Orthop. 1998, vol. 252, pp. 167–175.
4. Marshall V. J. Clinical biochemistry. 2<sup>nd</sup> ed., revised. and ext. Moscow, Binom Publ., 2002. 384 p. (in Russian).
5. Riggs B. L., Melton L. J. Osteoporosis: etiology, diagnosis, treatment, trans. Translated from English. SPb.: Nevsky Dialect Publ., 2000. 558 p.
6. Dickson G. F., Buchanan, D. Marsh Orthopaedic tissue engineering and bone regeneration // Technol. Health Care, 2007, no. 15 (1), pp. 57–67.
7. Hall T. J. Reappraisal of the effect of extracellular calcium on osteoblastic bone resorption // Biochem. Biophys. Res. Commun., 1994, vol. 202, pp. 456–462.
8. Improvement of the bone pin interface strength in osteoporotic bone using hydroxyapatite-coated tapered external fixator pin. A prospective randomized clinical study in wrist fractures / A. Moroni et al. // 67<sup>th</sup> Ann. Meeting of the American Acad. Orthop. Surg. Florida, 2000, pp. 15–19.

*Поступила в редакцию 25.11.2014  
Утверждена к печати 15.01.2015*

## Авторы:

**Дружинина Татьяна Валентиновна** – канд. мед. наук, зам. директора по науке Санкт-Петербургского филиала Федерального государственного унитарного предприятия «Экспериментально-производственные мастерские» Федерального медико-биологического агентства (г. Санкт-Петербург).

**Бочкарёв Владислав Витальевич** – аспирант ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» (г. Санкт-Петербург).

**Виденин Владимир Николаевич** – д-р. вет. наук, профессор кафедры акушерства и оперативной хирургии ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» (г. Санкт-Петербург).

**Климентьев Алексей Александрович** – студент ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» (г. Санкт-Петербург).

**Попов Владимир Петрович** – канд. мед. наук, ассистент кафедры травматологии, ортопедии и военно-полевой хирургии ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ (г. Томск), ФГБУЗ «Клиническая больница № 81» ФМБА России (г. Северск).

## Контакты:

**Попов Владимир Петрович**

тел.: 8-903-915-57-63

e-mail: ortopvp@mail.ru