

## БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КОСТНОЙ ТКАНИ ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ КОМПОЗИТНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ГИДРОКСИАПАТИТА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

*В статье проанализированы имплантационные возможности современных имплантатов, использующихся для пластики пустотных дефектов костей, изучены биохимические аспекты метаболизма костной ткани в условиях замещения дефекта пластическими материалами. Экспериментально доказаны преимущества кальций-фосфорного композита над другими синтетическими пластическими материалами, обоснованы возможности его использования для пластики пустотных дефектов костей.*

**Ключевые слова:** биохимия, костная ткань, композитные материалы

### Введение

Широкое применение искусственных имплантатов-биоматериалов для пластики дефектов и замены поврежденных тканей и органов – свидетельство достижений современной медицины. Наибольшая часть среди них представлена имплантатами для замещения дефектов костей [1].

Костная ткань – это уникальный по составу и свойствам биогенный материал с многоуровневой структурной организацией компонентов на основе ультрадисперсного минерала – карбонатсодержащего нестехиометрического гидроксиапатита и белка коллагена [10]. Поэтому требования, предъявляемые к создаваемым костным имплантатам, выглядят взаимно исключаящими. В идеале пластический материал должен быть биохимически совместимым с тканями организма, пористым, при этом с высокой прочностью (малыми модулями Юнга), обеспечивающим вращение и пролиферацию на поверхности костной ткани (остеокондукция), а также активировать процессы остеогенеза (остеоиндукция) [4].

Следовательно, на первом плане современного биоматериаловедения стоит не только изучение процессов оптимизации условий течения репаративного восстановления тканей и органов (регенерационный подход), а также механических характеристик имплантатов, одновременно с их биодеградацией.

Таким образом, химическое и морфологическое соответствие биоматериала и костной ткани являются одним из основных принципов, лежащих в основе создания новых остеопластических материалов [5].

Традиционно в ортопедии для замещения дефектов костей используются костные аутотранс-

плантаты – «золотой стандарт». Наряду с аутологичной костной тканью, для остеопластики используют различные материалы биологического (тутопласт, ОСТАП) и синтетического (КЕРГАП) происхождения.

В последнее время все больше появляется в медицинской литературе сведений о разработке нового синтетического биорезорбирующегося пластического материала – фосфорно-кальциевого композита [7,11].

Наиболее информативными биохимическими показателями регенерации костной ткани являются данные обмена коллагена, гликозаминогликанов (ГАГ), которые составляют органическую основу костного матрикса. Однако, при замещении костных дефектов разными пластическими материалами, корреляция этих показателей в зависимости от вида и способа пластики недостаточно изучена.

Процессы анаболизма и катоболизма органической основы соединительной ткани в динамике перестройки используемых материалов имеют также теоретическое значение для расширения представлений о метаболизме коллагена и ГАГ в условиях пластики. С практической точки зрения это раскрывает новые возможности прогнозирования эффективности замещения дефектов кости после резекции патологических очагов и целенаправленного воздействия на динамику перестройки применяемых имплантов.

Поэтому **целью** настоящего исследования явилось изучение метаболизма костной ткани в условиях имплантации современных пластических материалов на основе гидроксилапатита.

### Материалы и методы

В экспериментальном исследовании использовали 75 взрослых кроликов породы шиншилла, массой 2,7–2,9 кг. Оперативное вмешательство выполняли в стерильных условиях (операционная вивариума) под комбинированной анестезией: внутримышечно вводили 2 мл 3% раствора кетамина, местно – 5 мл 0,5% раствора новокаина. Путем сквозной перфорации проксимального эпиметафиза большеберцовой кости хирургическим кортикальным сверлом, диаметром 3 мм, получали дефект. Образовавшийся

Биохимические показатели сыворотки крови первой основной и контрольной групп животных (кролики)

Изучаемые показатели	Норма	Сроки наблюдения (сут)			
		контрольная группа		опытная группа	
		7	28	7	28
Коллагеназа, мкмоль/л·ч	1,52±0,16	1,80±0,10	1,48±0,30	1,40±0,20	1,50±0,10
Свободная фракция ГП, мкмоль/л	11,63±0,28	11,70±0,30	11,90±0,40	11,40±0,20	11,80±0,30
Белковосвязан. фракция ГП, мкмоль/л	10,14±0,55	10,60±0,60	10,80±0,20	10,70±0,30	10,90±0,20
ГАГ, г/л	0,057±0,003	0,063±0,003	0,068±0,003	0,071±0,001	0,069±0,004

канал у животных первой основной группы заполняли фосфорно-кальциевым композитом (КФК) – 21 кролик; у животных второй основной группы – 21 кролик – биологическим гидроксиапатитом (пористый ОСТАП); у животных третьей основной группы – 21 кролик – синтетическим гидроксиапатитом (пористый КЕРГАП).

Девяти прооперированным животным остеопластику не выполняли – группа контроля. Трое животных без оперативного вмешательства были определены в интактную группу. Послеоперационную рану послойно ушивали шелковыми нитками. Имобилизацию прооперированной конечности не проводили. Сроки наблюдения за кроликами были 7 и 28 сут. после оперативного вмешательства.

Эксперименты на животных проводили в соответствии с правилами «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, которые используются в экспериментальных и других целях».

В сыворотке крови животных интактной, контрольной и основных групп определяли активность коллагеназы по методу Lindy [8] (в качестве субстрата использовали коллаген производства фирмы Sigma); фракции гидроксипролина (ГП) выделяли по методу Frey [5], гидроксипролин у них определяли по Stegemann [9] и гликозаминогликаны (ГАГ) по методу Кляцкина С.А. и Лифшиц Р.И. [2], а в костной ткани – коллаген и ГАГ.

Содержание ГАГ в костной ткани определяли карбазоловым методом по составу урановых кислот; коллагена – по методу Крель А.А., Фурцева Л.Н. [3].

Полученные биохимические данные обрабатывали статистически по Стьюденту.

## Результаты исследования

Биохимические показатели, отражающие метаболизм соединительной ткани у экспериментальных животных с дефектом эпиметафиза большеберцовой кости выявили повышение активности одного из ключевых ферментов в метаболизме коллагена – коллагеназы. На 7 сут после начала опыта у животных контрольной группы ее активность возросла до  $1,80 \pm 0,10$  мкмоль/л·ч, тогда как этот показатель у интактных живот-

ных был равен  $1,52 \pm 0,16$  мкмоль/л·ч, и составлял по отношению к активности интактных животных 118%. Активность этого фермента в сыворотке крови у животных первой основной группы была несколько ниже, чем у животных контрольной группы, но выше чем у интактных животных, и достигала 112%. Можно утверждать, что активность, изучаемого фермента при имплантации в дефект кости, кальций фосфатного композита не вызывает каких-либо отклонений, а его уровень даже несколько ниже, чем у животных контрольной группы (табл. 1, рис. 1).

Анализ показателей содержания свободного гидроксипролина – биохимического маркера распада коллагена – свидетельствуют о том, что количество этой аминокислоты в сыворотке крови на 7 сут наблюдения животных контрольной и первой основной групп остается на уровне интактных животных. Это указывает на то, что в катаболической фазе метаболизма основного белка соединительной ткани отклонений не происходит. Следовательно, применяемый для замещения дефекта кальций-фосфатный композит не вызывает какое-либо влияние на метаболические процессы белка коллагена (табл.1, рис. 2).

Содержание белковосвязанного гидрокси-

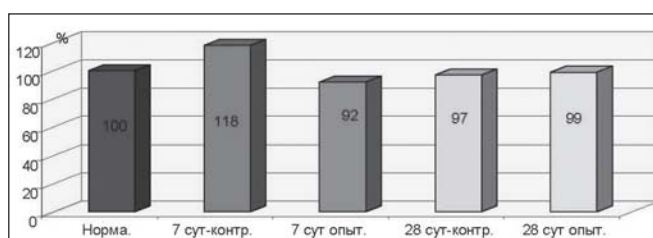


Рис. 1. Активность коллагеназы в сыворотке крови у животных первой основной и контрольной групп

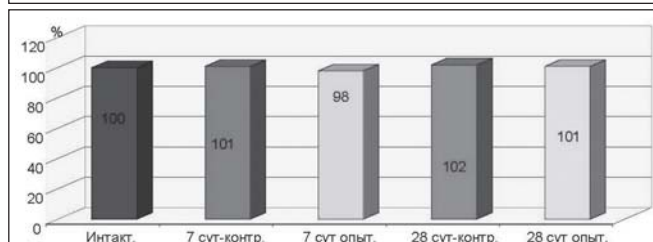
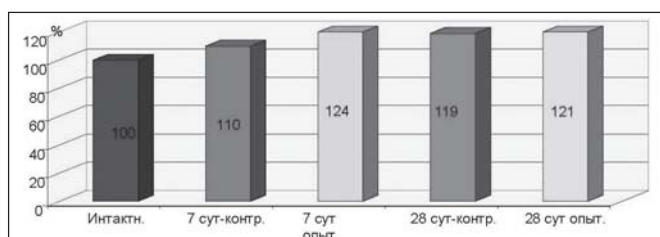


Рис. 2. Содержание свободного гидроксипролина в сыворотке крови у животных

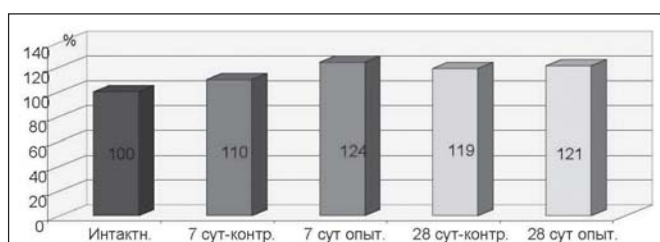
пролина – биохимического маркера синтеза коллагена – на 7 сут после начала опыта находится на уровне его концентрации в сыворотке крови у интактных животных. При этом у первой основной группы содержание белковосвязанного гидроксипролина имело тенденцию к возрастанию и достигало 105% по отношению к норме. Таким образом, показатели синтетической фазы коллагена свидетельствуют о том, что применяемые кальций-фосфатный композит не оказывает достоверного влияния на синтез коллагена (табл. 1, рис. 3).



**Рис. 3.** Содержание белковосвязанного гидроксипролина в сыворотке крови экспериментальных животных

Концентрация гликозаминогликанов в сыворотке крови на 7 сут наблюдения у животных контрольной группы составила 110% по отношению к норме, а в абсолютных показателях –  $0,060 \pm 0,003$  г/л при норме  $0,057 \pm 0,003$  г/л (табл. 1, рис. 1). У животных основных групп этот показатель несколько выше и достигал 124%. Иначе говоря, на 7 сут от начала опыта интенсивность синтеза гликозаминогликанов у животных опытной группы несколько выше, чем у животных контрольной группы. Однако, из-за небольших отличий показателей содержания гликозаминогликанов у животных контрольной и основных групп исследований (табл. 1, рис. 4), нельзя достоверно утверждать, что применяемый композит для замещения дефекта кости не оказывает активного влияния на их синтетическую активность и метаболизм костной ткани.

Анализ биохимических показателей сыворотки крови животных, которым замещали дефект костной ткани кальций-фосфатным композитом (КФК), на 7 сут после начала опыта не выявило каких-либо отличий в показателях активности коллагеназы и в показателях, отра-



**Рис. 4.** Содержание ГАГ в сыворотке крови экспериментальных животных

жающих концентрацию биохимических маркеров резорбции коллагена (свободная фракция гидроксипролина) и его синтеза (белково-связанная фракция).

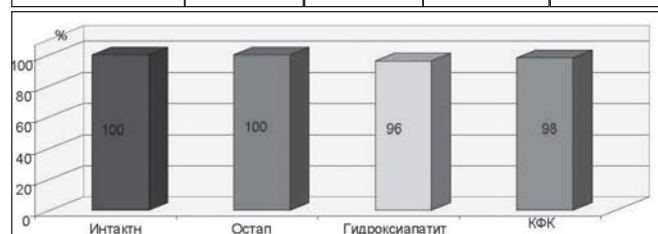
Такую же закономерность наблюдали на 28 сут после начала опыта, со стороны всех изучаемых показателей, за исключением содержания гликозаминогликанов, концентрация которых была выше у животных с имплантированным КФК. Так, содержание гликозаминогликанов у животных контрольной составило  $0,063 \pm 0,003$  г/л на 7 сут наблюдения, на 28 сут –  $0,068 \pm 0,003$  г/л, тогда как этот показатель у животных с КФК в эти же сроки наблюдения несколько выше и составил  $0,071 \pm 0,001$  на 7 сут, и  $0,069 \pm 0,004$  г/л на 28 сут.

Таким образом, можно утверждать, что биохимические показатели сыворотки крови первой основной группы животных, отражающие метаболизм основных органических компонентов костной ткани, не выявили какой-либо биологической активности используемого материала для замещения дефекта костной ткани. Эти данные подтверждают и показатели содержания коллагена и ГАГ, полученные при исследовании тканей всех групп животных (табл. 2, рис. 5).

Таблица 2.

**Биохимические показатели в тканях экспериментальных животных**

Исследуемые показатели	Интактн	остап	гидроксипатит	КФК
Коллаген, мг/г	$0,56 \pm 0,002$	$0,56 \pm 0,002$	$0,54 \pm 0,001$	$0,55 \pm 0,001$
ГАГ, мкг/мг	$2,60 \pm 0,10$	$2,70 \pm 0,09$	$2,30 \pm 0,08$	$2,90 \pm 0,10$



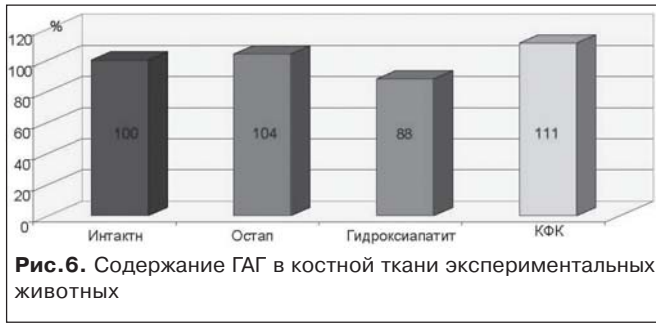
**Рис. 5.** Содержание коллагена в костной ткани экспериментальных животных

Так, содержание коллагена у животных, которым дефект кости замещали остеоapatитом, синтетическим гидроксипатитом или КФК было в пределах физиологической нормы и составляло от 100 до 96% по отношению к норме (табл. 2, рис. 5).

Аналогичные показатели получены и при исследовании содержания в межклеточном веществе костной ткани – ГАГ. Если принять содержание ГАГ в кости за 100%, то у животных, которым дефект костной ткани замещали остепом, гидроксил апатитом или КФК оно составило, соответственно 104, 88 и 111% (табл. 2, рис. 6).

Таким образом, данные полученные при исследовании сыворотки крови и костной ткани





**Рис. 6.** Содержание ГАГ в костной ткани экспериментальных животных

у экспериментальных животных, свидетельствуют о том, что при применении в качестве пластического материала остеоа, гидроксил апатита или КФК, каких либо отклонений от физиологической нормы в метаболизме основного белка костной ткани – коллагена и ГАГ не выявлено.

### Выводы

1. Фосфорно-кальциевый композит, биологический (ОСТАП) и синтетический (КЕРГАП) апатиты являются биологически инертными, и в настоящее время есть материалами выбора для пластики полостных дефектов костей.
2. Данные биохимического исследования коллагена, гидроксипролина, гликозаминогликанов в сыворотке крови и костной ткани указывают на более активные процессы биодеградации, формирования новой костной ткани и перестройку импланта из фосфорно-кальциевого композита по сравнению с имплантами из ОСТАПа и КЕРГАПа.
3. Разработка композитов на основе фосфатов кальция – перспективная область биоматериаловедения, так как именно синтетическим инертным композитным материалом возможно задать регенерационные и механические свойства, характерные для аутологичной костной ткани.

### Список литературы

1. Вересов А.Г., Пугляев В.И., Третьяков Ю.Д. Химия неорганических материалов на основе фосфатов кальция // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева), 2004, Т. 48, № 4. – С. 52-64.
2. Кляцкин С.А., Лифшиц Р.И. Методика определения гликозаминогликанов орциновым методом в крови больных // Лаб. дело. – 1989. – № 10. – С. 51-53.
3. Крель А.А., Фурцева Л.Н. Определение оксипролина в биологических жидкостях и их применение в клинической практике // Вопросы мед. химии. – 1968., N 6. – С.635-640.
4. Оковит В.С., Калиновский В.В., Зиман З.З., Мезенцев В.О. Визначення деяких механічних властивостей різновидів кальцій-

фосфатних керамік // Медицина и... – 2005. – № 2. – С. 44-47.

5. Bermudez O., Boltong M.G., Driessens F.C.M., et al. J. Mater. Sci. Mater. Med., 1994, V. 5. – P. 67-71
6. Frey S. Etude d'une methode d'exploration et du taux normal de l'hydroxyproline du serum // Biochem. Biophys. – 1965. – Vol. 3, № 2. P. 446-450.
7. Hench L.L. J. Am. Ceram. Soc., 1998, V. – 81, № 7. – P. 1705-1728.
8. Lindy S., Halme J. Collagenolytic activity in rheumatoid synovial tissue // Clin. Chim. Acta. – 1973. – 47, № 2. – P. 153-157.
9. Ooms EM, Wolke JGC, van der Waerden JPSM, et al. // Trabecular bone Response to injectable Ca-P Cement, 2002, 61: 9-18.
10. Stegemann H.J. A simple procedure for the determination of hydroxyproline in urine and bone // Biochem./Med.-1952./ – Vol. 3, N 1. – P. 23-30.
11. Suchanek W., Yoshimura M. J. Mater. Res., 1998, V. 13, № 1, P. 94-117

### Резюме

*Магомедов О.М., Герцен І.Г., Кузуб Т.А., Кравченко О.М.*

#### **Біохімічні показники кісткової тканини при імплантації композитних матеріалів на основі гідроксиапатиту (експериментальне дослідження)**

В статті проаналізовано імплантаційні можливості сучасних імплантатів, що використовуються для пластики порожнинних дефектів кісток, а також вивчено біохімічні аспекти метаболізму кісткової тканини в умовах заміщення дефекту даними пластичними матеріалами. Експериментально доведено переваги кальцій-фосфорного композиту над іншими синтетичними пластичними матеріалами, й обґрунтовано можливість його використання для пластики порожнинних дефектів кісток.

### Summary

*Magomedov A., Gertsen I., Kuzub T., Kravchenko E.*

#### **Biochemical parameters of bone tissue in the implantation of composite materials based on hydroxyapatite (experimental study)**

The article analyzes the possibilities of modern Implantation implants used in plastic cavitory bone defects, and also studied the biochemical aspects of metabolism of bone tissue in the defect replacement plastics data. Experimentally proved the benefits of calcium-phosphorus composite over other synthetic plastic materials, and proved able to use it for plastic cavitory bone defects.

**Key words:** biochemistry, bone, composite materials