УДК 616-001.46:54.03,615.46

РЕГЕНЕРАЦІЯ КІСТКИ В УМОВАХ ІМПЛАНТАЦІЇ КОМПОЗИЦІЙНОГО БІОМАТЕРІАЛУ НА ОСНОВІ ПОЛІМОЛОЧНОЇ КИСЛОТИ, ГІДРОКСИЛАПАТИТУ ТА ТРИКАЛЬЦІЙФОСФАТУ

Проф. О. М. Хвисюк, О. Д. Павлов, канд. мед. наук В. В. Пастух

Харківська медична академія післядипломної освіти

На 25 щурах проведено дослідження регенерації кісткової тканини після введення в метафізарний дефект композиційного біоматеріалу на основі L-полімолочної кислоти, гідроксилапатиту та трикальційфосфату у співвідношенні 70 : 10 : 20, виготовленого на 3D-принтері Ultimaker Original Plus. Строки дослідження: 7, 14, 30, 60, 90 та 180 днів після оперативного втручання. Доведено, що використання імплантів на основі полімолочної кислоти, гідроксилапатиту та трикальційфосфату сприяє оптимізації остеоінтеграції.

Ключові слова: *імплант, L-полімолочна кислота, гідроксилапатит, трикальційфосфат, експеримент, щури, дефект кістки, регенерація.*

РЕГЕНЕРАЦИЯ КОСТИ В УСЛОВИЯХ ИМПЛАНТАЦИИ КОМПОЗИЦИОННОГО БИОМАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ ПОЛИМОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ, ГИДРОКСИЛАПАТИТА И ТРИКАЛЬЦИЙФОСФАТА

Проф. А. Н. Хвисюк, А. Д. Павлов, канд. мед. наук В. В. Пастух

На 25 крысах проведено исследование регенерации костной ткани после введения в метафизарный дефект композиционного биоматериала на основе L-полимолочной кислоты, гидроксилапатита и трикальцийфосфата в соотношении 70 : 10 : 20, изготовленном на 3D-принтере Ultimaker Original Plus. Сроки исследования: 7, 14, 30, 60, 90 и 180 дней после оперативного вмешательства. Доказано, что использование имплантов на основе полимолочной кислоты, гидроксилапатита и трикальцийфосфата способствует оптимизации остеоинтеграции.

Ключевые слова: *имплант, L-полимолочная кислота, гидроксилапатит, трикальцийфосфат, эксперимент, крысы, дефект кости, регенерация.*

BONE REGENERATION AFTER IMPLANTATION OF COMPOSITE BIOMATERIAL BASED ON POLYLACTIDE, HYDROXYLAPATHITE AND TRICALCIUM PHOSPHATE

O. M. Khvisiuk, O. D. Pavlov, V. V. Pastukh

The study was conducted on 25 rats in conditions of modeling the distal femur area defects and filling them with biomaterial implants. The implants were made by 3D-printing Ultimaker Original Plus of L-polylactic acid, hydroxylapatite and tricalcium phosphate (with a ratio of 70 : 10 : 20). The terms of study are 7, 14, 30, 60, 90 and 180 days after operation. Our study shows that the use of L-polylactic acid, hydroxylapatite and tricalcium phosphate implants optimized the osteointegration.

Keywords: *implant, L-polylactic acid, hydroxylapatite, tricalcium phosphate, experiment, rat, bone defect, regeneration.*

В ортопедії та травматології як гвинти та фіксаційні штифти, пластини й анкери, кейджі використовують полімерні матеріали, що резорбуються та розчиняються в біологічних рідинах [1, 10, 11, 12].

У клінічних випадках у разі заміщення дефектів кісток у практику входить метод індивідуальної кісткової пластики з використанням об'ємного 3D-друку, тобто створення індивідуального імпланта для пацієнта, що точно заміщає кістковий дефект в анатомічній ділянці скелета [4]. Серед таких матеріалів частіше використовують імпланти з L-полімолочної кислоти (L-полілактид), особливістю яких є біодеградація, остеоінтеграція, здатність індукувати процеси утворення кісткової тканини та висока біосумісність з організмом [1, 8, 9]. Перевагою таких імплантів є їх повне розсмоктування, що позбавляє необхідності операції з видалення імпланта або фіксуючого пристрою, що відповідно, запобігає пошкодженню тканин. Підвищити якість біоматеріалів на основі полілактидів можна введенням до їх складу керамічних матеріалів, зокрема гідроксилапатиту [3, 7]. Створення імплантів на основі композитів із полілактидів і біоактивних керамік дає

змогу виконувати не тільки замісну функцію, а й оптимізувати регенерацію кістки, за рахунок поповнення дефіциту кальцію, особливо в умовах остеопорозу й інших метаболічних захворювань. Однак імпланти з різним відсотковим співвідношенням та складом керамічного матеріалу розрізняються властивостями міцності та поведінки в кістці.

Мета роботи — вивчити перебудову кістки після імплантації композиційного біоматеріалу на основі L-полімолочної кислоти, гідроксилапатиту і трикальційфосфату.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єктом дослідження було вивчення перебудови кістки в умовах імплантації композиційного біоматеріалу на основі L-полімолочної кислоти, гідроксилапатиту та трикальційфосфату зі співвідношенням 70 : 10 : 20. Імплант було виготовлено на 3D-принтері Ultimaker Original Plus (Ultimaker, Netherlands).

Дослідження виконано за темою НДР Харківської медичної академії післядипломної освіти «Клітинно-молекулярні механізми запалення, асоційованого із хронічними захворюваннями», номер державної реєстрації 015U 001186.

Експерименти на 25 тваринах були виконані у віварії ХМАПО з дотриманням правил гуманного ставлення до експериментальних тварин та асептики згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, та Законом України [2, 5]. Протокол експериментального дослідження на тваринах було затверджено Комітетом із біоетики ХМАПО (протокол № 23 від 14.09.2017 р.).

Техніка моделювання дірчастого дефекту в кістці. За допомогою стоматологічного бору відтворювали стандартний дірчастий дефект діаметром 2 мм та глибиною 3 мм у дистальному метафізі лівої стегнової кістки. У дефект імплантували композиційний біоматеріал. Обробляли антибіотиком, шкірну рану вшивали.

Виводили з експерименту по 5 тварин на 7, 14, 30, 90 та 180 добу.

Гістологічні методи. Дослідження кістки з біоматеріалом проводили після гістологічної проводки. Матеріал фіксували в 10 % розчині формаліну, проводили декальцинацію 5 % азотною кислотою, після зневоднення в спиртах та укладення в целоїдин виготовляли зрізи кістки з імплантом на мікротомі Reichert (товщиною 7–9 мкм), забарвлювали гематоксиліном та еозином, керуючись методичними рекомендаціями [7].

Визначення індексу остеоінтеграції проводили вимірюванням периметру імпланта відповідно до відсотків частки прилеглих тканин.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Спостереження за тваринами. Після операції на всі терміни дослідження щурам дозволяли навантаження на оперовану кінцівку. Не було зафіксовано перелому або явищ набряку кінцівки. У всіх тварин рана зажила первинним натягом.

Макроскопічне дослідження. Після оперативного втручання на терміни дослідження з зовнішнього боку дистального відділу стегнової кістки в дослідних щурів визначали місце введення імплантів у вигляді горбка, покритого шаром сполучної тканини, яка з'єднувалася з періостом. Ознак запалення, набряку та деструкції тканин на ранніх термінах (7 та 14 доба) біля імплантів не спостерігали. На 30, 90 і 180 добу імпланти щільно утримувалися в дефекті.

Мікроскопічний аналіз. 7 доба. У тварин навколо імплантів були розташовані вузькі поля грануляційної та фіброретикулярної тканин, площа яких була підвищена в ділянках кортексу та періосту (рис. 1).

Грануляційна тканина становила низькодиференційні стромальні клітини та фібробласти різної зрілості. Поява клітин фібробластичного диферону в грануляційній тканині є показником неоангіогенезу. У міжклітинній речовині грануляційної тканини були безладно розташовані тонкі волокна та розширені кровоносні судини. У фіброретикулярній тканині, яка оточувала імплант у ділянках губчастої кістки, підвищено щільність клітин фібробластичного диферону. Колагенові волокна формували невеликі пучки, окремі з них були розташовані паралельно до імпланта. Навколо

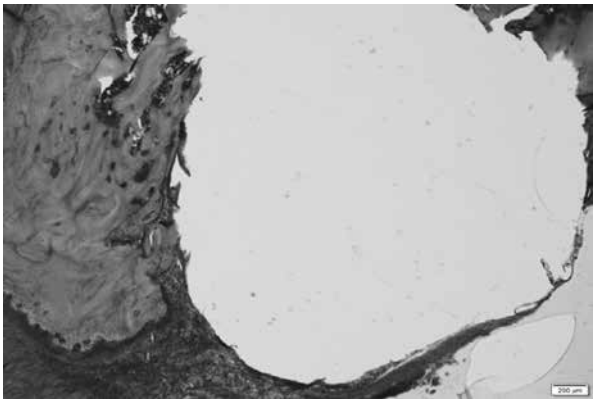

Рис. 1. Фотовідбиток із гістологічного препарату. Фіброретикулярна тканина в ділянках кортексу. Імплант із композиту на основі L-полімолочної кислоти. Гематоксилін та еозин. × 40

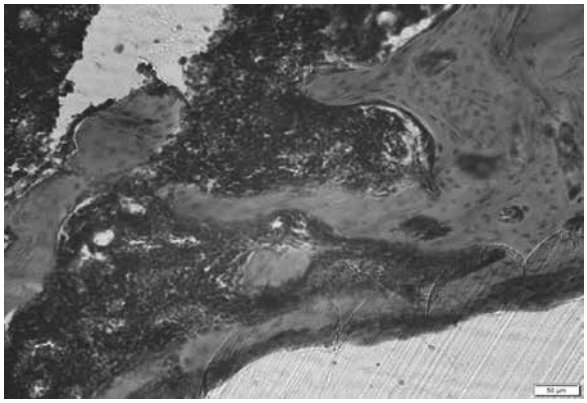

Рис. 2. Фотовідбиток із гістологічного препарату. Прошарки сполучної тканини між імплантом та новоутвореною кісткою. Висока щільність остеоцитів на поверхні кісткових трабекул. Гематоксилін та еозин. × 200

імпланта з композиту були виявлені не лише вогнища фіброретикулярної тканини з високою щільністю клітин фібробластичного й остеобластичного диферонів, а й осередки остеоїда, що нашарувалися безпосередньо на імплант.

На деяких ділянках, де імпланти щільно прилягали до крайових відділів дефекту, не виявлено ознак формування регенерату. На інших територіях материнська кістка мала ознаки реактивної перебудови. Виявлено як порожні лакуни без остеоцитів, так і ділянки без клітин. Відмічено ознаки репарації, які полягали в тому, що невеликі тріщини в кортексі материнської кістки навколо імплантів були заповнені фіброретикулярною тканиною. У ділянках дефекту, розташованого в глибоких відділах губчастої кісткової тканини, виявлено невеликі вогнища деструкції кісткових трабекул з ознаками репарації. На відстані від травматичного ураження на окремих ділянках кісткових трабекул визначали нашарування остеоїда та новоутворену кісткову тканину, а в міжтрабекулярних просторах виявлено ретикулофіброзну тканину. У глибших відділах губчастої кістки розташовувався червоний кістковий мозок із численними кровоносними капілярами. Ознак деструкції імплантів не виявлено.

14 доба. По периметру імпланта були розташовані новоутворені кісткові трабекули, які вростали з боку ложа материнської кістки, вони щільно прилягали до його поверхні, були вкриті остеоцитами. Однак переважала фіброретикулярна тканина остеогенного типу з високою щільністю фібробластів і вогнищами остеобластів, яка була розташована між новоутвореними кістковими трабекулами та на поверхні імпланта (рис. 2).

Виявлено відмітні риси в процесі перебудови кісткової тканини на ділянках ложа імпланта. У губчастій кістці навколо імпланта підвищена щільність кісткових трабекул. У ділянках контакту імпланта з кортексом була розташована переважно фіброретикулярна тканина.

30 доба. Імплант у дефекті був оточений кістковими трабекулами з високою щільністю остеоцитів на поверхні (рис. 2). Кісткова тканина щільно прилягала до поверхні біоматеріалу на більшій частині його периметра, однак визначено формування прошарків фіброретикулярної тканини (рис. 3).

На новоутворених кісткових трабекулах щільність остеоцитів була високою. Клітини мали гіпохромні великі ядра, вузьку цитоплазму й розташовувалися в лакунах. Чітко зберігалася межа між материнською та новоутвореною кістковою тканиною. Звертала на себе увагу висока щільність кісткових трабекул, що не лише контактують безпосередньо з імплантом, а й поблизу нього.

90 доба. По периметру імпланта розташовувалися кісткові трабекули, утворюючи на ділянках щільний комплекс (рис. 3). Лише на невеликих територіях виявлено прошарки фіброретикулярної тканини.

180 доба. Імплант було оточено переважно кістковою тканиною (рис. 4), лише на невеликих

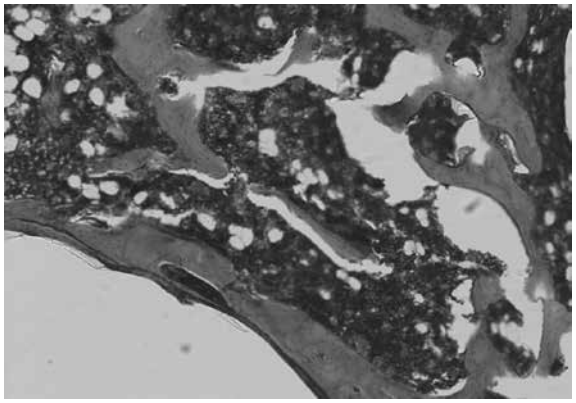

Рис. 3. Фотовідбиток із гістологічного препарату. Кісткові трабекули та фіброретикулярна тканина на поверхні імпланта. Гематоксилін та еозин. × 200

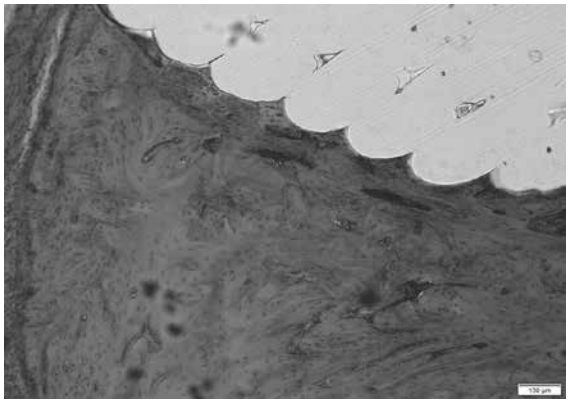

Рис. 4. Фотовідбиток із гістологічного препарату. Кісткова тканина на поверхні імпланта. Нерівномірні крайові відділи імпланта. Гематоксилін та еозин. × 100

ділянках спостерігали нашарування кісткового мозку або фіброретикулярної тканини. Площа імплантів у кісткових дефектах тварин практично не зменшилася, однак імпланти мали нерівномірні контури (рис. 4), що може свідчити про слабко виражене розчинення біоматеріалу в крайових відділах, можливо, за рахунок дії біологічних речовин. Клітинно-опосередкованої резорбції не спостерігали. Наведені дані свідчать про стабільну остеоінтеграцію імпланта з кісткою.

Проведено морфометричне дослідження остеоінтеграції імпланта з кісткою (рис. 5). Індекс остеоінтеграції на 30 добу навколо імпланта порівняно з 14 добою дослідження був підвищений у 2,1 разу, на 90 добу порівняно з 30 добою — в 1,3 разу, на 180 добу порівняно з 60 добою — також у 1,3 разу.

Установлення факту підвищеної щільності кісткової тканини, що безпосередньо контактує з композитом, свідчить про виражені остеоінтегративні властивості. Високі значення цього показника для імплантів із композиту свідчать про дію складових, що входять в імплант, на активацію регенерації, що важливо в умовах пластики кісток, а також у разі відновлення дефектів, навколо яких регенерація відбувається дуже повільно. У літературі наведено дані щодо аналітичного огляду 1458 статей із тематики тканинної інженерії кісткової тканини [8]. Доведено, що в умовах розробки композитів найчастіше до синтетичних біорозчинних полімерів додають білки природного позаклітинного матриксу кістки, кальційфосфатні біоматеріали та фактори росту. Визначено, що процеси остеоінтеграції виражені здебільшого в разі введення в кістковий дефект полілактиду з гідроксилапатитом порівняно з композитом на основі полілактогліколіду [6].

В умовах імплантації в кістковий дефект композиційного біоматеріалу на основі L-полімолочної кислоти, гідроксилапатиту та трикальційфосфату зі співвідношенням 70 : 10 : 20 на ранніх термінах спостереження виявлено комплекс перифокальних реактивних змін на межі «імплант–материнська кістка». У грануляційній тканині була підвищена щільність клітин не лише фібробластичних, а й остеобластичних диферонів. Формування кісткової тканини на поверхні імпланта було зафіксовано на 14 добу з підвищенням її площі

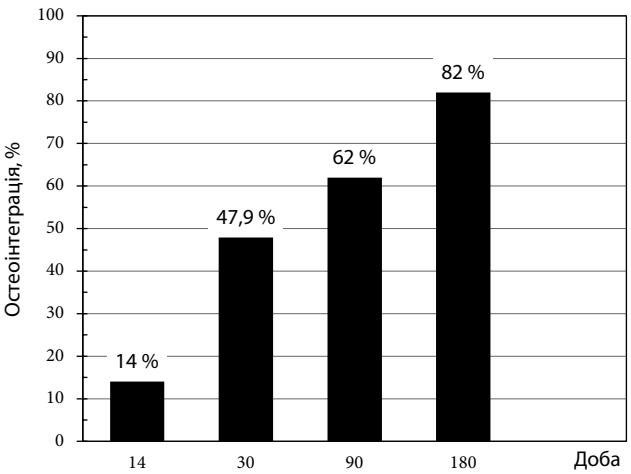

Рис. 5. Індекс остеоінтеграції імпланта з кістковою тканиною ложа

по периметру імпланта на подальші терміни. Проведене нами дослідження доводить, що використання імплантів на основі L-полімолочної кислоти з включенням трикальційфосфату та гідроксилапатиту сприяє оптимізації остеоінтеграції.

ВИСНОВКИ

1. Розроблений композиційний біоматеріал на основі L-полімолочної кислоти, гідроксилапатиту та трикальційфосфату у співвідношенні 70 : 10 : 20 має виражені остеоінтегративні якості.

2. Індекс остеоінтеграції імпланта з розробленого композиту на 30 добу складав (47,87 + 2,13), на 90 — (62 + 3,35), на 180 — (82 + 2,07), що свідчить про високі остеоінтегративні якості.

Вивчення біомеханічних властивостей кістки з розробленим імплантом на основі L-полімолочної кислоти, гідроксилапатиту та трикальційфосфату у співвідношенні 70 : 10 : 20 має *перспективне* значення для практичного застосування в травматології.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Биорезорбируемые полимеры в ортопедии и травматологии / В. А. Радченко, Н. В. Дедух, С. Малышкина, Л. М. Бенгус // Ортопедия, травматология и протезирование. — 2006. — № 3. — С. 116–124.

2. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей [Електронний ресурс]. Страсбург, 18 березня 1986 року: офіційний переклад // Верховна Рада України. — Офіц. веб-сайт. — (Міжнародний документ Ради Європи). — Режим доступу : http: zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994_137.

3. Имплантационные материалы и остеогенез. Роль индукции и кондукции в остеогенезе / Н. А. Корж, В. А. Радченко, Л. А. Кладченко, С. В. Малышкина // Ортопедия, травматология и протезирование. — 2003. — № 2. — С. 150–157.

4. Использование современных синтетических материалов при замещении костных дефектов методом индивидуальной контурной пластики / Т. З. Мамуладзе, В. А. Базлов, В. В. Павлов, М.А. Садовой // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. — 2016. — № 11. — С. 451–455.

5. Про захист тварин від жорстокого поводження : Закон України № 3447-IV від 21.02.2006 (Ст. 26) // Відомості Верховної Ради України. — 2006. — № 27, ст. 230.

6. *Саркисов Д. С.* Микроскопическая техника / Д. С. Саркисов, Ю. Л. Перов. — М. : Медицина, 1996. — 542 с.

7. *Семикозов О. В.* Экспериментальное обоснование применения для костной пластики пористого минералонаполненного композита полилактида, подвергнутого воздействию сверхкритической среды CO_2 : автореф. дисс. на соискание науч. степени канд. мед. наук : 14.00.16 / О. В. Семикозов. — М., 2008. — 25 с.

8. *Терещенко В. П.* Матрицы-носители в тканевой инженерии костной ткани / В. П. Терещенко, И. А. Кирилова, П. М. Ларионов // Успехи современного естествознания. — 2015. — № 8. — С. 66–70.

9. *Хонинов Б. В.* Возможности применения биодеградируемых материалов в травматологии и ортопедии (обзор литературы) / Б. В. Хонинов, О. Н. Сергунин, П. А. Скороглядов // Вестник Российского государственного медицинского университета. — 2014. — № 1. — С. 20–24.

10. Bioabsorbable materials in orthopaedics / G. M. Kontakis, J. E. Pagkalos, T. I. Tosounidis [et al.] // Acta Orthop. Belg. — 2007. — Vol. 73. — P. 159–169.

11. Biomedical Applications of Poly (Lactic Acid) / R. P. Pawara, S. U. Tekalea, S. U. Shisodiaa [et al.] // Recent Patents on Regenerative Medicine. — 2014. — Vol. 4. — P. 40–51.

12. Properties and medical applications of polylactic acid: A review / K. Hamad, M. Kaseem, H. W. Yang [et al.] // Express Polymer Letters. —2015. — Vol. 9, № 5. — P. 435–455.