

УДК: 616.71-003.93-089.844-092.9

Н.В. Дедух, Лу Чжоу, С.В. Малышкина РЕПАРАТИВНАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ КОСТНОГО ДЕФЕКТА, ЗАПОЛНЕННОГО «ВОЙЛОКОПОДОБНЫМ» УГЛЕРОДНЫМ БИОМАТЕРИАЛОМ

ГУ «Институт патологии позвоночника и суставов им. проф. М.И. Ситенко НАМН Украины»

Дедух Н.В., Лу Чжоу, Малышкина С.В. Репаративная регенерация костного дефекта, заполненного «войлокообразным» углеродным биоматериалом // Украинский морфологический альманах. – 2014. – Том 12, № 1. – С. 37-41.

В эксперименте на крысах изучена перестройка костной ткани в участке имплантации синтетического углеродного биоматериала. Установлено, что имплантированный в костный дефект углеродный биоматериал не нарушает стадийность остеорепарации. Остеорепаративный процесс характеризуется активным формированием новообразованной костной ткани как в дефекте среди фрагментов углеродного биоматериала, так и по периметру дефекта. Формирование костной ткани в участке дефекта зафиксировано на ранние сроки. На 45 сутки фрагменты углеродного биоматериала замурованы в новообразованной костной ткани без признаков деструкции окружающей кости и заживительных проявлений.

Ключевые слова: эксперимент, имплантация, углеродный

Дедух Н.В., Лу Чжоу, Малышкина С.В. Репаративна регенерація кісткового дефекту, заповненого «войлокоподібним» вуглецевим біоматеріалом // Український морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 1. – С. 37-41.

В експерименті на щурах вивчена перебудова кісткової тканини в ділянці імплантації синтетичного вуглецевого біоматеріалу. Встановлено, що імплантований у кістковий дефект вуглецевий біоматеріал не порушує стадійність остеорепарації. Остеорепаративний процес характеризується активним формуванням новоутвореної кісткової тканини як у дефекті серед фрагментів вуглецевого біоматеріалу, так і по периметру дефекту. Формування кісткової тканини в ділянці дефекту зафіксовано на ранні терміни. На 45 добу фрагменти вуглецевого біоматеріалу замуровані в новоутвореній кістковій тканині без ознак деструкції навколишньої кістки і запальних проявів.

Ключові слова: експеримент, імплантacja, вуглецевий біоматеріал, остеорепарація.

Deduch N.V., Lu Chkzou, Malyskina S.V. Reparative regeneration of the bone defect filled with "a felt" carbon biomaterial // Український морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 1. – С. 37-41.

In an experiment on rats studied restructuring bone tissue in the implantation of synthetic carbon biomaterial. Established that carbon biomaterial implanted into the bone defect does not violate the staging osteoreparation. Osteoreparative process is characterized by the formation of active newly formed bone in the defect of carbon fragments of biomaterial and the perimeter of the defect. Bone formation in the defect is fixed earlier. On day 45 the fragments of carbon biomaterial were surrounded by newly formed bone tissue and without signs of destruction of the surrounding bone and inflammatory manifestations.

Key words: experiment, implantation, carbon biomaterial, osteoreparation.

Введение. Рост числа пациентов, нуждающихся в реконструктивно-восстановительных операциях на скелете, сопровождается острой потребностью в разработке и совершенствовании пластических материалов как биологического происхождения, так и их заменителей. Среди замещающих материалов до настоящего времени “золотым” стандартом остаются аутотрансплантаты. Однако возможности получения их в достаточном количестве для замещения обширных костных дефектов весьма ограничены. Поэтому поиск заменителей, способных составить достойную альтернативу аутотрансплантатам, продолжается [2, 6, 8, 11, 12, 13, 17]. Одновременно возрастает и уровень предъявляемых к биоматериалам требований. Имплантационный материал должен выполнять не только замещающую функцию, но, постепенно интегрируясь в окружающую кость, поддерживать физиологический уровень остеобластической и остеокластической активности, способствуя формированию и remodelированию костной ткани [4, 5, 7, 14, 15, 16, 18].

Цель работы – изучить перестройку кост-

ной ткани в области имплантации синтетического углеродного биоматериала.

Материал и методы. Эксперимент выполнен на 15 крысах 6-месячного возраста (живая масса 280 ± 25 г), популяции экспериментально-биологической клиники ГУ «ИППС им. проф. М.И. Ситенко НАМН Украины» при соблюдении правил гуманного отношения к экспериментальным животным [3].

Моделирование костного транскортикального дырчатого дефекта дистального отдела *бедренной кости крысы* производили под общим внутримышечным обезболиванием (аминазин 10 мг/кг и кетамин 50 мг/кг) в условиях асептики с помощью стоматологического бора (диаметр 4 мм) на глубину 3 мм. Образцы синтетического углеродного биоматериала были имплантированы в смоделированные костные полости. Раны послойно ушиты. Дополнительной фиксации не производили.

Животные были выведены из эксперимента на 3, 14 и 45 сутки после имплантации путем передозировки тиопентала натрия (внутримышечная инъекция).

В работе использованы гистологические и морфометрические методы исследования. Для гистологических исследований материал готовили согласно указаниям Д.С. Саркисова и Ю.Л. Перова [9]. Гистологические срезы (7-9 мкм) окрашивали гематоксилином Вейгерта и эозином. Анализ и фотографирование материала проводили в микроскопе „AxioStar Plus” (ок. $\times 10$; об. $\times 4$, $\times 20$, $\times 40$, $\times 100$) с использованием цифровой фотокамеры Canon EOS-300D. Для электронно-микроскопического анализа материал готовили в соответствии с рекомендациями Б. Уикли [10]. Ультраструктурный анализ проводили в трансмиссионном электронном микроскопе ЭМВ-100БР ($\times 3\ 000$ - $35\ 000$).

Морфометрический анализ проведен согласно рекомендациям Г.Г. Автандилова (1990) с использованием квадратно-сетчатой вставки с 286 точками [1]. Анализировали:

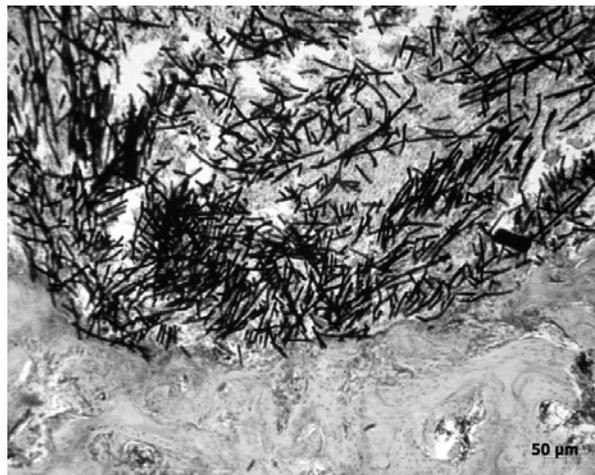
- относительную площадь (условные единицы, ус. ед.) новообразованной костной ткани в дефекте. Для этого подсчитывали число точек-пересечений квадратов сетки Автандилова, которые попадали на территорию новообразованной костной ткани, а затем высчитывали процент от площади дефекта (микроскоп MICROS, ок. $\times 10$, об. $\times 20$);

- площадь новообразованной костной ткани (ус. ед.) по периметру полости с имплантированным материалом в 5 полях зрения микроскопа (при использовании квадратно-сетчатой вставки) на трех препаратах;

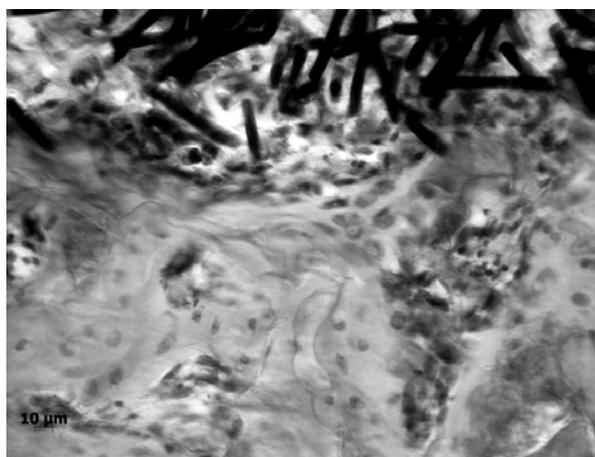
- среднее количество остеоцитов на материнских костных трабекулах в 10 полях зрения микроскопа на трех препаратах (по периметру дефекта).

Результаты исследований. 3 сутки. При микроскопическом исследовании гистологических срезов метадиафиза бедренных костей область имплантации биоматериала была представлена в виде круга, в котором располагался углеродный биоматериал, имеющий игольчатую структуру и кровяной сгусток с признаками реорганизации. По краю дефекта среди фрагментов углеродного биоматериала выявлялась фиброретикулярная ткань, а в центральной области дефекта располагалась грануляционная ткань и остатки кровяного сгустка.

По периметру дефекта, заполненного углеродным биоматериалом, в материнской кости, отмечена новообразованная грубоволокнистая костная ткань, перемежающаяся с небольшими участками фиброретикулярной ткани (рис. 1 а, б). В новообразованной костной ткани определяются остеоциты, расположенные в лакунах, а также остеобласты, находящиеся среди коллагеновых волокон. Остеобласты имеют крупные слабо базофильные ядра, окруженные небольшим ободком цитоплазмы (рис. 1 б). На отдельных участках грубоволокнистые костные трабекулы, по периметру дефекта, врастают между фрагментами углеродного материала. Признаков деструкции или некроза клеток не выявлено.



А



Б

Рис. 1. Фотоотпечатки гистопрепаратов. А). Участок дефекта, заполненного «войлокоподобным» углеродным биоматериалом. Ок. $\times 10$, об. $\times 10$. Б). Новообразованные грубоволокнистые трабекулы по периметру дефекта и фиброретикулярная ткань с высокой плотностью клеток остеобластического дифферона. 3 сутки. Гематоксилин и эозин. Ок. $\times 10$, об. $\times 40$.

При электронно-микроскопическом исследовании установлено, что по краю дефекта вблизи углеродного материала располагались метаболически активные остеобласты, имеющие развитую ЭПС (рис. 2), ядра с превалированием эухроматина и высокой плотностью поровых комплексов, что свидетельствует об их биосинтетической активности.

В кортексе, на небольшом расстоянии (одно поле зрения микроскопа) от области имплантации, обнаружены слабо выраженные деструктивные нарушения, которые отражают перестройку кортекса в ответ на травматическое повреждение. Отмечена гибель остеоцитов, о чем свидетельствуют очаги костного матрикса с пустыми лакунами остеоцитов, единичные запустевшие костные каналы, неравномерные базофильные линии цементации. Выявляются обломочные структуры остеонов, а также микротрещины.

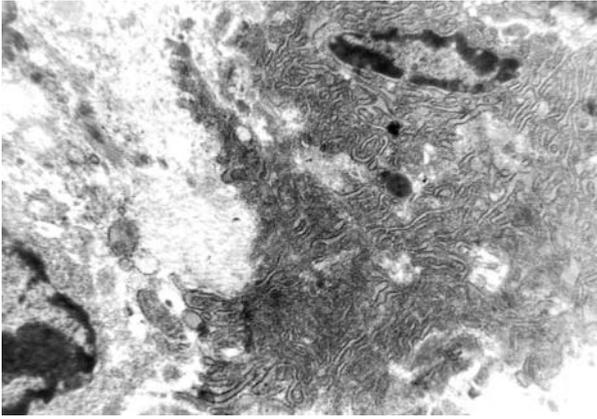


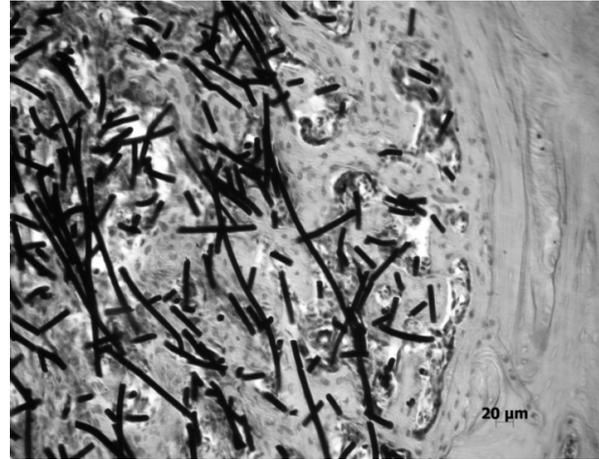
Рис. 2. Фотоотпечаток электроннограммы из зоны регенерата вблизи углеродного биоматериала. Функционально активный остеобласт с эксцентрично расположенным ядром и цитоплазмой с многочисленными, преимущественно, параллельно ориентированными канальцами гранулярной ЭПС. 3 сутки. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. $\times 16700$.

В губчатой кости, окружающей дефект, также определялись участки с признаками реактивных посттравматических изменений, характерные для обнаруженных в кортексе – бесклеточные участки с пустыми лакунами, очаги разволокнения матрикса, трещины. Наряду с такими участками на отдельных материнских костных трабекулах выявлено формирование остеоида с очаговым наслоением крупных остеобластов, имеющих базофильные ядра. Наличие напластований на костных трабекулах в виде остеоида указывает на восстановительные процессы, протекающие в кости, прилежащей к травматическому повреждению.

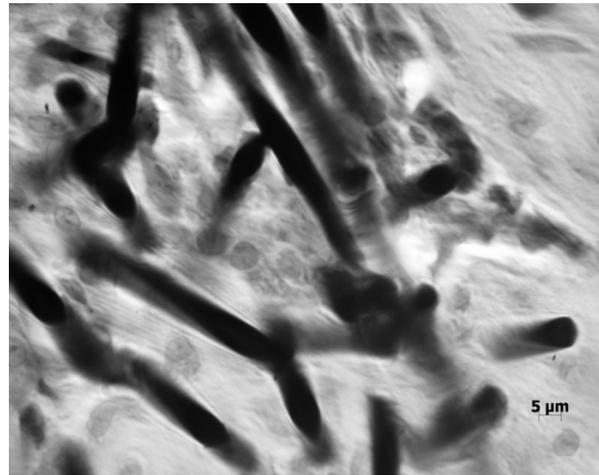
В красном костном мозге межтрабекулярных пространств материнской кости, вблизи дефекта не выявлено воспалительных гранулем и очагов деструкции, что свидетельствует о биоинертности углеродного биоматериала.

14 сутки. По периметру дефекта с имплантированным углеродным биоматериалом располагалась новообразованная костная ткань в виде костных трабекул пластинчатой структуры. Костные трабекулы образовывали мелкопетлистую сеть. Обращает внимание то, что новообразованные костные трабекулы формировались и в области дефекта на больших территориях среди фрагментов углеродного биоматериала (рис. 3 а). Новообразованная костная ткань характеризуется наличием большого количества остеонцов на поверхности трабекул и остеобластов по краю. Наблюдалось прорастание фиброретикулярной ткани остеогенного характера в прилежащую к имплантату материнскую кость (рис. 3 б).

Ультраструктурная организация остеобластов из новообразованной костной ткани свидетельствует об их высокой биосинтетической активности. В остеобластах определяются ядра с эухроматином, а в цитоплазме – многочисленные мембранные органеллы (рис. 4).



А



Б

Рис. 3. Фотоотпечатки гистопрепаратов из области дефекта с имплантированным биоматериалом. А). Новообразованные костные трабекулы в области дефекта и прилежащие к кортексу материнской кости. Высокая плотность остеобластов на поверхности костных трабекул. Ок. $\times 10$, об. $\times 20$. Б). Прорастание фиброретикулярной ткани с остеобластами в прилежащую к имплантату материнскую кость. Гематоксин и эозин. Ок. $\times 10$, об. $\times 100$.

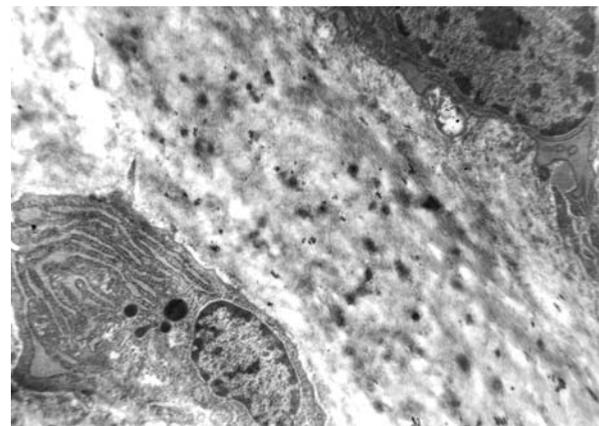


Рис. 4. Фотоотпечаток электроннограммы. Фрагмент функционально активного остеобласта на поверхности костной трабекулы. Молодой остеонц с эксцентрично расположенным ядром и цитоплазмой с многочисленными параллельно ориентированными канальцами гранулярной ЭПС. 14 сутки. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. $\times 9600$.

При морфометрическом анализе была определена площадь новообразованной костной ткани в области дефекта (таблица). Установлено, что ее площадь составляет 28,4 % от площади дефекта. Новообразованная костная ткань плотно соединена с материнской костью, одна-

ко граница между ними четко определяется. Площадь новообразованной костной ткани по периметру дефекта со стороны материнской кости составляет $14,3 \pm 1,2$ ус.ед. в поле зрения микроскопа.

Таблица. Морфометрические показатели, характеризующие состояние костной ткани вокруг дефекта с углеродным материалом ($M \pm m$)

Определяемый показатель	Срок исследования	
	14 сутки	45 сутки
Среднее количество остеоцитов на материнских костных трабекулах (в одном поле зрения) (n=30)	$14,1 \pm 0,9$	$24,4 \pm 1,2^*$
Относительная площадь (ус.ед.) новообразованной костной ткани по периметру дефекта в одном поле зрения (n=15)	$14,3 \pm 1,2$	$30,7 \pm 1,9^*$
Относительная площадь (ус.ед.) новообразованной костной ткани внутри дефекта (n=9)	$37,6 \pm 3,7$ (28,4 %)	$64,7 \pm 4,8^*$ (49,8 %)
Площадь дефекта (ус.ед.)	$132,2 \pm 7,1$	$129,8 \pm 8,1$

1) – $P < 0,05$ статистически значимые различия относительно 14 суток.

В центральной части дефекта на этот срок располагается фиброретикулярная ткань остеогенного характера с большой плотностью клеток, среди которых определяются и клетки остеобластического дифферона (рис. 5).

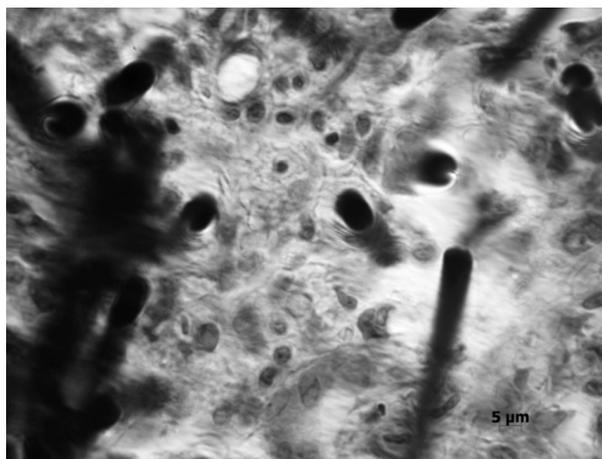


Рис. 5. Фотоотпечаток гистопрепарата. Фиброретикулярная ткань остеогенного характера в центральной части дефекта с имплантированным биоматериалом. Гематоксилин и эозин. Ок. $\times 10$, об. $\times 100$.

На материнских костных трабекулах и в кортексе отмечены лакуны без остеоцитов, а также расширенные центральные каналы остеонов. Однако преобладающими в материнской костной ткани вокруг дефекта были восстановительные процессы, о чем свидетельствует фиброретикулярная ткань, располагающаяся в микротрещинах краевых отделов кортекса. В расширенных костных каналах, а также на части костных трабекул определялось аппозиционное напластование новообразованной костной ткани.

Было определено количество остеоцитов на поверхности материнских костных трабекул вокруг дефекта. Полученные данные представлены в таблице.

Периост вблизи дефекта был расширен. В

нем отмечалось формирование молодых костных трабекул и расширение волокнистого слоя. Наблюдалось формирование периоста по краю дефекта. Признаков воспаления в области имплантации углеродного материала не выявлено.

45 сутки. Значительных отличительных особенностей в структурной организации костной ткани вокруг дефекта с имплантированным углеродным материалом, а также в самом дефекте от описанного на 14 сутки не выявлено. Граница между новообразованной и материнской костной тканью определялась на небольших участках. Деструктивные костные трабекулы материнской кости были с напластованиями новообразованной костной ткани. Межтрабекулярные пространства, прилежащие к области имплантации, заполнены красным костным мозгом с повышенной плотностью гемокapилляров.

В области дефекта фрагменты углеродного биоматериала располагались среди новообразованных костных трабекул, плотно контактируя с костью (рис. 6).

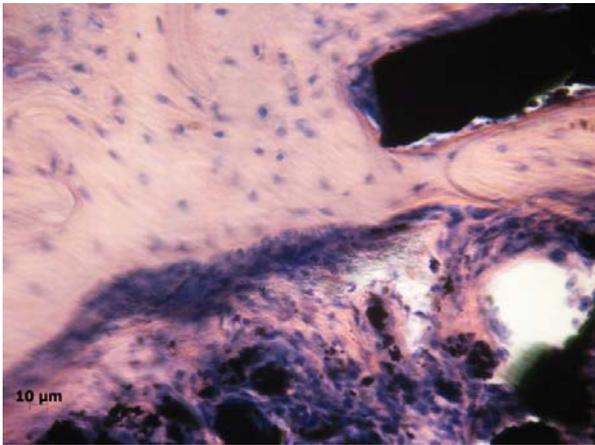
Площадь новообразованной костной ткани в дефекте повышена по сравнению с 14 сутками на 21,4 % (см. табл.).

Площадь новообразованной костной ткани по периметру дефекта со стороны материнской кости по сравнению с 14 сутками была в 2,1 раза больше (см. табл.).

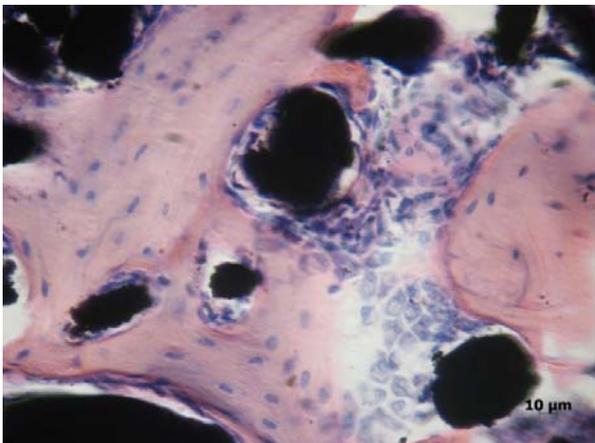
Деструктивные изменения в материнской кости сохранялись лишь на небольших территориях, прилежащих к области дефекта. Количество остеоцитов на костных трабекулах по периметру дефекта было в 1,73 раза больше, чем на 14 сутки (см. табл.).

При исследовании зоны роста, расположенной в метафизарной области бедренной кости на расстоянии одного поля зрения микроскопа (ок. $\times 10$, об. $\times 20$) от участка имплантации углеродного биоматериала, деструктивных нарушений в ней не выявлено (рис. 7). Четко дифференцируются характерные зоны: покоящегося хряща, пролиферации с колонковой организацией хондроцитов, минерализации и кальци-

фикации. Лишь местами в отдельных колонках плотность клеток была низкой. Определялись участки энхондрального костеобразования. На поверхности костных трабекул, прилежащих к хрящу, выявлялись остециты.



А



Б

Рис. 6. Фотоотпечатки гистопрепаратов из области имплантации углеродного биоматериала. А и Б). Формирование пластинчатой костной ткани в области расположения углеродного биоматериала. Фрагменты биоматериала «замурованы» новообразованной костной тканью с высокой плотностью остеоцитов на поверхности. Гематоксилин и эозин. Ок. $\times 10$, об. $\times 40$.

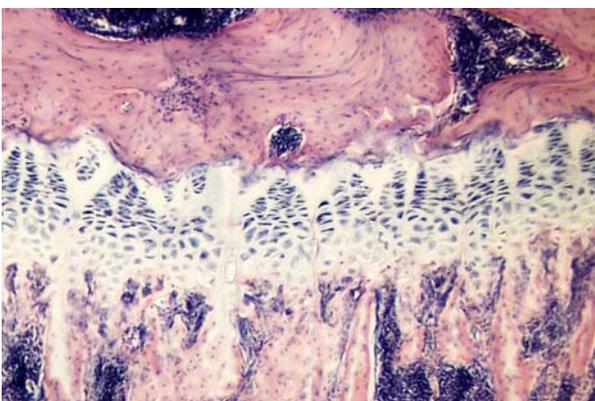


Рис. 7. Фотоотпечаток гистопрепарата. Участок эпифизарного хряща над зоной имплантации. Колонки хондроцитов с характерной структурой. Гематоксилин и эозин. Ок. $\times 10$, об. $\times 20$.

Следовательно, синтетический углеродный биоматериал «войлокоподобной» структуры, имплантированный в костный дефект «критического» размера, не нарушает стадийность остеорепарации. Остеорепаративный процесс характеризуется активным формированием новообразованной костной ткани, площадь которой увеличивается со сроком наблюдения. Формирование костной ткани в области дефекта зафиксировано на ранние сроки, что может быть связано с особенностью углерода, заполнившего дефект. На стадии воспаления углеродный материал выступает своеобразной матрицей, фиксирующей клетки, которые принимают участие в регенерации и очищении костной раны. Повышение пула клеток приводит к раннему переходу от стадии воспаления к стадии пролиферации, дифференцировки клеток и формирования тканеспецифических структур. Особенностью «войлокоподобного» углеродного биоматериала является также и то, что на поздние сроки репаративного остеогенеза его фрагменты замурованы в новообразованной костной ткани без признаков деструкции окружающей кости и воспалительных проявлений.

Таким образом, использование углеродного синтетического биоматериала способствует протеканию полноценного процесса регенерации при воспроизведении обширных костных дефектов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия / Г.Г. Автандилов. – М.: Медицина, 1990. – 381 с.
2. Де́дх Н.В. Остеоінтеграція кісткової тканини з титановими імплантатами / Н.В. Де́дх, С.В. Малышкіна // Ортопед., травматол. – 2010. – № 1. – С. 45-49.
3. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Страсбург, 18 березня 1986 року : офіційний переклад [Електронний ресурс] / Верховна Рада України. – Офіц. веб-сайт. – (Міжнародний документ Ради Європи). – Режим доступу до документа : http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?reg=994_137
4. Имплантационные материалы и остеогенез. Роль биологической фиксации и остеинтеграции в реконструкции кости / Н.А. Корж, Л.А. Кладченко, С.В. Малышкіна, И.Б. Тимченко // Ортопед., травматол. – 2005. – № 4. – С. 118-127.

5. Имплантационные материалы и остеогенез. Роль индукции и кондукции в остеогенезе / Н.А. Корж, В.А. Радченко, Л.А. Кладченко, С.В. Малышкина // Ортопед., травматол. – 2003. – № 2. – С. 150-157.
6. Керамические биоматериалы в ортопедии и травматологии / Н.А. Корж, О.Е. Вырва, Н.В. Дедух, С.В. Малышкина // Ортопед., травматол. – 2007. – № 3. – С. 20-30.
7. Малишкіна С.В. Медико-біологічні дослідження штучних біоматеріалів для ортопедії та травматології / С.В. Малишкіна, Н.В. Дедух // Ортопед., травматол. – 2010. – № 2. – С. 93-100.
8. Морфологічні особливості перебудови кісткової тканини та біодеградації композитів на основі лактидів та гліколізів: зб. наукових праць міжнародної конференції з актуальних проблем артрології та вертеб্রології (Харків, 4-5 жовтня, 2007) / В.О. Радченко, Н.В. Дедух, С.В. Малишкіна [та інш.]. – Х.; 2007. – С. 48-54.
9. Саркисов Д.С. Микроскопическая техника / Д.С. Саркисов, Ю.Л. Перова. – М.: Медицина, 1996. – 542 с.
10. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих / Б.Уикли – М.: Мир, 1975. – 324 с.
11. Филиппенко В.А. Использование разных видов гидроксипатитной керамики для пластики костных полостей / В.А. Филиппенко, З.З. Зыман, В.А. Мезенцев // Ортопед., травматол. – 2002. – № 2. – С. 61-65.
12. Шимон В.М. Покриття на титанові імпланти та остеоінтеграція / В.М. Шимон, С.В. Малишкіна, Н.В. Дедух // Укр. медичний альманах. – 2010. – № 5. – С. 239-244.
13. Экспериментальное исследование процессов остеоинтеграции имплантатов для наружного чрескостного остеосинтеза с различными биоконпозиционными покрытиями / О.В. Бейдик, К.Г. Бутовский, В.Н. Лясников [и др.] // Гений ортопедии. – 2002. – № 4. – С. 80-88.
14. Al Ruhaimi Kh.A. Bone graft substitutes comparative qualitative histologic review of current osteoconductive grafting materials / Kh.A. Al Ruhaimi // Intern. J. Oral Maxillofacial Implants. – 2001. – Vol. 16, №1. – P. 105-114.
15. Albrektsson T. Osseointegration of bone implants / T. Albrektsson, B. Albrektsson // Acta Orthop. Scand. – 1987. – № 58. – P. 567-577.
16. Osteoconductivity of thermal-sprayed silver-containing hydroxyapatite coating in the rat tibia / Y.Y. Yonekura, H.H. Miyamoto, T.T. Shimazaki [et al.] // J. Bone Joint Surg. – 2011. – Vol. 93-B, № 5. – P. 644-649.
17. Porous calcium phosphate ceramic granules and their behaviour in differently loaded areas of skeleton / Z. Zyman, V. Glushko, N. Dedukh [et al.] // J. Mater. Sci. Mater. Med. – 2007. – № 2 – P. 1-9.
18. Specchia N. Can porosity influence the osteoconductive properties of synthetic hydroxyapatite? / N. Specchia, A. Pagnotta, F. Greco // Europ. Orthop. Res. Soc. – 2000. – № 3 – P. 21.

Надійшла 17.11.2013 р.

Рецензент: проф. В.І.Лузін