

УДК 616.718.4-089.23:615.46:612.753

МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТРИКАЛЬЦІЙФОСФАТУ, ЙОГО ВИКОРИСТАННЯ ДЛЯ ЗАПОВНЕННЯ КІСТКОВИХ ПОРОЖНИН

Шимон В.М., Меклеш Ю.Ю., Литвак В.В., Шерезій А.А.

ДВНЗ «Ужгородський національний університет», медичний факультет, кафедра загальної хірургії з курсами травматології, оперативної хірургії та судової медицини, м. Ужгород

Вступ

В останні роки в ортопедії та травматології обсяг біоматеріалів, що імплантують, значно збільшився. Серед синтетичних і штучних біоматеріалів лідируючі позиції займають керамічні матеріали. Це оксидні кераміки, склокераміки, кальційфосфатні кераміки та їх композити [1, 4]. З двох кальційфосфатних керамік найбільш широко використовують трикальційфосфат і гідроксиапатит, що розрізняються біорезорбцією та міцністю. Для оптимізації цих якостей розроблені різні композити нестехіометричної структури. Пошук нових композитів та їх дослідження тривають [2, 3, 5].

Репаративна регенерація являє собою відновлення клітин, тканин або органа після травми або різних патологічних процесів. С.С. Ткаченко [18] під репаративною регенерацією розуміє «складний процес, який викликаний руйнуванням кісткових структур, що кількісно перевершує допустимі межі фізіологічної регенерації», який «направлений на відновлення анатомічної цілісності і забезпечує функції кістки».

За Д.С. Саркісовим [17] „в основі репарації пошкодження ... лежать ті ж механізми і ті ж форми регенераторної реакції, які властиві фізіологічній регенерації... Репарація пошкодження в кожному із органів відбувається тільки тим же шляхом, в якому в ньому здійснюється фізіологічне оновлення його структури». Таким чином, репаративна регенерація є не що інше, як фізіологічна регенерація, яка протікає в умовах екстремальних впливів на організм, але відрізняється від неї більшою інтенсивністю проявів.

Репаративна регенерація може бути повною і неповною. Повна регенерація (реституція) характеризується заміщенням дефекту тканиною, повністю ідентичною зруйнованій. Неповна репаративна регенерація (субститу-

ція) – дефект заміщується щільною волокнистою сполучною тканиною – рубцем. Кісткова тканина є унікальною тканиною, в якій навіть великі завдовжки дефекти можуть бути відновлені повністю [13].

Регенерація кожної тканини має свої особливості, але завжди включає в себе процеси розпаду пошкоджених клітин та міжклітинної речовини, становлення міжклітинних зв'язків у вигляді інтеграції та адаптаційної перебудови регенерату. За типом проліферативної активності сполучні тканини можна віднести до групи повільно регенеруючих, для яких характерна клітинна форма регенерації [13,15].

В основі регенерації кістки лежить взаємодія трьох основних біологічних елементів: клітин, чинників росту і диференціювання, міжклітинної кісткової речовини [19].

Основними одиницями регенерації кісткової тканини є клітини. Тому розуміння сепаративної регенерації неможливе без вивчення джерел відновлення кісткових клітин (в тому числі ембріональних), механізмів міжклітинної інтеграції та регуляції [16].

Оскільки для кісткової тканини характерний клітинний тип регенерації, то питання про джерела відновлення кісткової тканини є досить актуальним. Оскільки диференційовані остеобласти втрачають здатність до проліферації, то джерелом для формування регенерату у випадку пошкодження кісткової тканини є малодиференційовані клітини-попередники, у яких функція розмноження ще не блокована. До них належать стромальні стовбурові клітини (ССК), які локалізовані в кістковому мозку, екстраскелетних кровотворних органах, а також остеогенні клітини, що знаходяться в складі внутрішнього шару периосту і каналах остеонів, периваскулярні клітини, які входять до складу ендосту [14].



Мета дослідження

Вивчити особливості перебудови в дефекті кістки трикальційфосфата, укріпленого гідроксиапатитом у формі голчастих структур.

Матеріали і методи

Дослідження виконано на 48 білих лабораторних щурах після імплантації в метадіафізарні дефекти в ділянках стегнової кістки (2 мм) гранул біоматеріалу. Операції проведено в операційній експериментально-біологічній клініки ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка НАМН України»

з дотриманням вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин [6, 7].

Використаний біоматеріал Біомін ТГ-міх для заповнення експериментально відтворених дефектів – це двофазний фосфат кальцію зі складом гідроксиапатиту та бета-трикальційфосфату. Цей синтетичний кістковий імплантат є аналогом кісткового мінералу. Особливістю біоматеріалу є голчаста структура гранул. Розмір гранул від 0,8–1,0 мм.

Технічну характеристику зразків Біомін ТГ-міх, що імплантували в дефекти щурів, наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Рентгенологічний фазовий аналіз зразків Біомін ТГ-міх

Гідроксил-апатит			Трикальційфосфат-бета		
%	а	с	%	а	с
52,77	9,420	6,883	47,23	10,443	37,336

Експериментальні дослідження були проведені на 36 білих лабораторних щурах 6-місячного віку в 4-х серіях експерименту по 9 щурів на кожну серію:

1 серія – відтворення дефекту в діафізі стегнової кістки (контроль, 56 доба);

2 серія – відтворення дефекту в метафізі дистального відділу стегнової кістки (контроль, 56 доба);

3 серія – відтворення дефекту в діафізі стегнової кістки та заповнення його керамічним біоматеріалом (дослід);

4 серія – відтворення дефекту в метафізі дистального відділу стегнової кістки та заповнення його керамічним біоматеріалом (дослід).

Тваринам контрольної та дослідної груп відтворювали дефекти стоматологічним бором діаметром 3 мм в діафізарному відділі стегнової кістки. Для дослідження регенерації, що відбулася в дефекті, щурів дослідної групи виводили з експерименту на 7, 28 та 56 добу шляхом передозування наркотичного препарату. Щурів контрольної групи виводили на 56 добу для порівняння шляхом використання морфометрії з дослідними тваринами. Морфогенез регенерату не описували у зв'язку з детальним описом в науковій літературі подібних дефектів, відтворених на щурах [10, 11].

Гістологічні дослідження з морфометричним аналізом

Для гістологічного дослідження використовували дистальну та діафізарну частини стегнової кістки з імплантованим біоматеріалом контрольних та дослідних тварин.

Фрагменти кістки готували для дослідження, керуючись рекомендаціями Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова [8]. Матеріал фіксували в 10 % нейтральному формаліні, проводили декальцинацію в розчині 5 % азотної кислоти. Після декальцинації матеріал промивали в проточній воді, зневоднювали в спиртах зростаючої міцності та занурювали в целоїдин. Ущільнювали в густому целоїдині парами хлороформу.

Виготовляли зрізи товщиною 8–10 мкм, які фарбували гематоксилином і еозином, а також пікрофуксином по ван Гізон.

В контрольній та дослідних групах визначали відносну площу новоствореної кісткової та фіброретикулярної тканин, площу гранул керамічного біоматеріалу, що залишився в дефекти на 56 добу, за допомогою квадратно-сітчастої вставки (сітка Автанділова Г.Г. з 286 точками). Для цього підраховували число точок-перетинів квадратів (умовні одиниці) сітки, які потрапляли на територію визначених досліджених показників, а потім вираховували відсоток від площі



дефекту (мікроскоп MICROS, об. 4, ок. 10), керуючись вказівками Автанділова Г.Г. [9].

Поляризаційне дослідження

Було проведено дослідження за реакцією з пікросіріусом червоним [12] колагену I типу, що є основою органічного матриксу кісткової тканини. Також досліджено III тип колагену, що бере участь в організації I типу колагену, а також його присутність на значних площах кістки свідчить про незрілу кісткову тканину.

У кісткової тканини колаген I типу при дослідженні в поляризованому світлі (мікроскоп Olympus BX 53) має червоно-оранжево-жовте світіння в залежності від товщини і зрілості колагенових волокон. Колаген III типу дає рефракцію зеленого кольору.

Результати досліджень

Регенерація діафізарного дефекту в умовах заповнення керамічним біоматеріалом.

28 доба. Керамічний біоматеріал в ділянці кортексу був щільно спаяний новоутвореною кістковою тканиною, що просякала між гранулами біоматеріалу. Кісткова тканина була незрілою, в кісткових трабекулах, поряд

з колагеновими волокнами I типу, що дають рефракцію червоного або жовтого кольору в залежності від товщини волокон, були присутні колагенові волокна з колагеном III типу, які в поляризованому світлі давали зелену рефракцію.

В глибоких відділах дефекту новоутворені кісткові трабекули відокремлювали біоматеріал від кісткового мозку.

56 доба. Керамічний біоматеріал в ділянці кортексу та в нижче розташованих ділянках регенерату був оточений трабекулярною кістковою тканиною.

При дослідженні кісткової тканини навколо гранул керамічного біоматеріалу за забарвлення Ван Гізону виявлено, що кісткові трабекули щільно оточували гранули, що призводило до формування щільного кістково-керамічного блоку.

Дані морфометричного дослідження регенератів у діафізарних дефектах дослідних щурів, що займає кісткова та фіброретикулярна тканини, а також площин, що припадає на гранули керамічного біоматеріалу, наведено в таблиці 2.

Таблиця 2

Морфометричне дослідження площин (%) кісткової та фіброретикулярної тканини, а також керамічного біоматеріалу в діафізарних дефектах дослідних щурів

Показники, які досліджували	Термін дослідження (56 доба)
Площа керамічного біоматеріалу (в %)	67,6±2,71
Площа кісткової тканини (в %)	21,2±2,54
Площа фіброретикулярної тканини (в %)	11,2±0,58

Виявлено, що на кінцевий термін дослідження регенерації кістки в умовах імплантації гранул керамічного біоматеріалу кісткова тканина займає значну площину. Площа фіброретикулярної тканини нижче в 1,9 разу порівняно з кістковою тканиною. На цей термін дослідження значну площу займав керамічний біоматеріал. Порівняно з площиною тканин – кістковою та фіброретикулярною – його площа була вдвічі більше.

Висновки

Таким чином, новий керамічний біоматеріал – двофазний фосфат кальцію зі складом

гідроксилапатиту та бета-трикальційфосфату голчастої структури гранул має високі остеокондуктивні якості, про що свідчить формування кісткової тканини на поверхні гранул, що щільно зв'язує гранули між собою. Матеріал не викликає запальної реакції. Практично на всі терміни дослідження виявляється в дефектах в формі гранул та дрібних часток, що свідчить про його низьку біорезорбційну активність на досліджений термін. Матеріал може бути використано в практичній ОЗ, для заповнення дефектів при пухлинах та травмах.



Резюме. У статті наведені результати експериментального дослідження морфологічних особливостей регенерації кістки в умовах заповнення дефектів гранулами біоматеріалу голчастої структури (Біомін ТГ-міх). Дослідження виконано на 48 білих лабораторних щурах 6-місячного віку, після імплантації в метадіафізарні дефекти в ділянках стегнової кістки, в 4-х серіях експерименту по 9 щурів на кожну серію. Для дослідження регенерації, що відбулася в дефекті, щурів дослідної групи виводили з експерименту на 7, 14, 28 та 56. Щурів контрольної групи виводили на 56 добу для порівняння шляхом використання морфометрії з дослідними тваринами.

Ключові слова: стегнова кістка, трикальційфосфат, гідроксиапатит, регенерація кістки.

Morphological features of therapeutic phosphatus using it for filling of bone caves

Shimon V.M., Meklesh Y.Y., Litvak V.V., Sheregiy A.A.

Summary. Objective: The purpose of the study: to study the peculiarities of the transformation in the defect of bone tricalcium phosphate, fortified with hydroxyapatite in the form of needle structures.

Material and methods. The study was performed on 48 white laboratory rats after implantation in meta-physic defects in femoral regions (2 mm) of granules of biomaterial. Operations were carried out in the operational experimental biological clinic of the State University «Institute of Spine and Joint Pathology named after. prof. MI Sitenko NAMS of Ukraine «with the observance of the requirements of the European Convention on the Protection of Vertebrate Animals [6,7]. Biomaterial Biomin TG-mix used to fill experimentally reproduced defects is biphasic calcium phosphate with the composition of hydroxylapatite and beta-tricalcium phosphate. This synthetic bone implant is an analogue of bone mineral. A special feature of the biomaterial is the needle structure of the granules. The size of the granule is from 0.8 to 1.0 mm. Experimental studies were performed on 36 white laboratory rats for 6 months. age in 4 series of experiment on 9 rats for each series: 1 series - reproduction of a defect in the diaphysis of the femur (control, 56 days); 2 series - reproduction of a defect in the metaphysis of the distal femoral bone (control, 56 days); 3 series - reproduction of a defect in the diaphysis of the femur and filling it with ceramic biomaterial (research); 4 series - reproduction of the defect in the metaphysis of the distal femoral bone and its filling with ceramic biomaterial (experiment). Research results. On the 7th day of observation of animals. The rats used the operated limb, fully started on it, normally moved and ate. Deviations in animal behavior were not detected.

Microscopically: the ceramic biomaterial was located in the area of an experimentally executed defect in the form of granules and different sized fragments, depending on the cut plane.

The granules of the ceramic biomaterial were surrounded by fibro-reticular tissue of high density of fibroblasts. 28 days The ceramic biomaterial in the cortex was tightly bonded to the newly formed bone tissue that was infused between the granules of the biomaterial. The bone tissue was immature, in the bone trabeculae, along with the type I collagen fibers giving a refraction of red or yellow, depending on the thickness of the fibers, collagen fibers of the type Collagen were present, which gave a green refraction in the polarized light.

In the deep defect sections, the newly formed bone marrow tissue was separated from the bone marrow by a biomaterial. 56 days The ceramic biomaterial in the areas of cortex and in the lower sections of the regenerate was surrounded by trabecular bone tissue.

In the study of bone tissue around the granules of ceramic biomaterial for the coloration of Van Gizon it was found that bone trabeculae densely surrounded the granules, which led to the formation of a dense bone and ceramic block. Conclusion.

Thus, the new ceramic biomaterial - a two-phase calcium phosphate with a composition of hydroxylapatite and beta-tricalcium phosphate of the needle granular structure, has high osteoconductive qualities, as evidenced by the formation of bone tissue on the surface of granules that binds granules together. Material does not cause inflammatory reaction. Virtually all terms of the study were found in defects in the form of granules and small particles, which indicates its low bioresorption activity for the study period. The material can be used both for filling metaphysical and diaphyseal defects.

Key words: cranial bone, tricalcium phosphate, hydroxyapatite, bone regeneration.



ЛІТЕРАТУРА

1. Семенюк Н.Б. Технологічні особливості одержання пористих полімерних композитів на основі кополімерів полівінілпіролідону / Н.Б. Семенюк, І.З. Дзяман, В.Й. Скорохода // Науковий вісник НЛТУ України. – 2016. – № 26. – С. 290–295.
2. Савченко Ю.М. Сорбционные свойства (co)полимерных гидрогелей с наноразмерной структурой пор / Ю.М. Самченко, Н.А. Пасмурцева, М.А. Альтшулер // Катализ и нефтехимия. – 2007. – №15. – С. 16–20.
3. Усачева О.В. Композиты на основе биоактивного стекла и полимерных гидрогелей / О.В. Усачева, Н.В. Свентская, С.П. Сивков, Б.И. Белецкий // Успехи в химии и химической технологии. Том XXVIII. – 2014. – № 8. – С. 94–97.
4. Штильман М. И. Полимеры медико-биологического назначения. – М.: ИКЦ «Академ-книга», 2006. – 400 с.
5. Navarro M. Bioactive composites based on calcium phosphates for bone regeneration / Melba Navarro, Josep A. Planell // Key Eng. Mater. – 2010. – № 441. – P. 203–233.
6. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. [Електронний ресурс]. – Страсбург, 18 березня 1986 року: офіційний переклад. – Режим доступу: http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994_137.
7. Про захист тварин від жорстокого поводження: Закон України № 3447-IV від 21.02.2006 р. [Електронний ресурс] / Верховна Рада України. – Режим доступу: <http://zakon3.rada.gov.ua/laws/show/3447-15>
8. Саркисов Д.С. Микроскопическая техника / Д.С. Саркисов, Ю.Л. Перов. – М.: Медицина, 1996. – 542 с.
9. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия: Руководство / Г.Г. Автандилов. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
10. Лаврищева Г.И., Оноприенко Г.А. Морфологические и клинические аспекты репаративной регенерации опорных органов и тканей. – М.: Медицина, 1996. – 208 с.
11. Дедух Н.В., Карпинский М.Ю., Лу Чжоу, Малышкина С.В. Регенерация и механическая прочность кости в условиях имплантации углеродного материала // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2016. – № 3. – С. 41–47.
12. Basic methods in histopathology of joint tissues / N. Schmitz, S. Laverty, V. B. Kraus, T. Aigner // Osteoarthritis Cartilage. – 2010. – Vol. 18, Suppl. 3. – P. 113–116, doi: 10.1016/j.joca.2010.05.026
13. Гололобов В.Г. Скелетные ткани. Посттравматическая регенерация: Руководство по гистологии. Т1. – СПб.: СпецЛит, 2001. – С. 328–336.
14. Гололобов В.Г. Деев Р.В. Стволовые стромальные клетки и остеобластический клеточный дифферон // Морфология. – 2003. – №1. – С. 9–19.
15. Данилов Р.К. Учение о гистогенезе и регенерации тканей: современное состояние и перспективы развития // Морфологические основы гистогенеза и регенерации тканей. – СПб.: ВМедА, 2001. – С. 3–4.
16. Данилов Р.К., Боровая Т.Г., Клочков Н.Д. Экспериментально-гистологический анализ гистогенеза и регенерации тканей (некоторые итоги XX в. И перспективы дальнейших исследований) // Морфология. – 2000. – Вып.4. – С. 7–16.
17. Саркисов Д.С., Туманов В.И. Общая патология человека / Под ред. А.И. Стоукова и др. – М.: Медицина, 1990. – Т.2. – С. 99–322.
18. Ткаченко С.С. Рущкий В.В. Статические электрические потенциалы кости и роль вектора поляризации при электростимуляции остеорепарации // Ортопедия, травматология и протезирование. – 1981. – №10. – С. 1–5.
19. Lodie T.A., Blickarz C.E., Devarakonda T.J., He O Dash A.B., Clarke J., Gleneck K., Shihabuddin L., Tubo R. Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow-derived stem cells reveals a lack of distinction // Tissue Eng. – 2002. – Vol.8. – P. 739–751.