

УДК 616-018.41

## ДИНАМИКА РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕРЕЛОМА БЕДРЕННОЙ КОСТИ КРЫС С ПРИМЕНЕНИЕМ ТИТАНОВОГО ИМПЛАНТАТА С ПОВЕРХНОСТНО АКТИВНЫМ ПОКРЫТИЕМ

<sup>1</sup>Матвеева Н.Ю., <sup>1</sup>Костив Р.Е., <sup>1</sup>Калиниченко С.Г., <sup>2</sup>Пузь А.В., <sup>1</sup>Плехова Н.Г.

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Владивосток, e-mail: nymatveeva@mail.ru;

<sup>2</sup>Институт химии ДВО РАН, Владивосток

На модели закрытого перелома диафизарной части бедренной кости крысы изучена динамика репаративной регенерации с использованием двух типов имплантатов: стандартных титановых винтов марки титана VT-6 и аналогичных имплантатов с нанесенным биоактивным кальций-фосфатным и гидроксиапатитным покрытием. Дана сравнительная морфологическая характеристика состояния костной ткани на 7-е и 30-е сутки эксперимента. Обнаруженные морфологические изменения в зоне контакта с имплантатом с нанесенным биоактивным кальций-фосфатным и гидроксиапатитным покрытием, указывают на повышенную активность репаративных процессов в непосредственной близости клеток к поверхности имплантата. К ним относятся сформировавшиеся остеоны, большое количество аппозиционных линий склеивания, присутствие высокодифференцированных остеоцитов, наличие остеокластов. Полученные данные позволяют высказать предположение об остеиндуктивном влиянии исследованных биоактивных покрытий.

**Ключевые слова:** биоактивные наноструктурные материалы, остеобласты, остеокласты, костные морфогенетические белки, ремоделирование костной ткани

## DYNAMICS OF REGENERATION OF A BROKEN HIPBONE OF RATS WITH THE USE OF THE TITANIUM IMPLANT WITH THE ACTIVE SURFACE COVER

<sup>1</sup>Matveeva N.Y., <sup>1</sup>Kostiv R.E., <sup>1</sup>Kalinichenko S.G., <sup>2</sup>Puz A.V., <sup>1</sup>Plechova N.G.

<sup>1</sup>Pacific State Medical University, Vladivostok, e-mail: nymatveeva@mail.ru;

<sup>2</sup>Institute of Chemistry DVO RAN, Vladivostok

The research was based on the model of the internal breakdown of diaphysis part of the rat's hipbone and the dynamics of reparative regeneration with the use of two implants was studied: the standard titanium screws with titan VT-6 mark and with the similar implants with bioactive calcium-phosphates and hydroxyapatite cover. On the 7-th and 30-th day the comparing morphologic characteristic of the bone tissue state was presented. The morphological changes that were found in the area of contact with the implant with bioactive calcium phosphate and hydroxyapatite cover, point to the increased activity of reparation processes in the area where cells lay close to the implant surface. These processes include: formed osteons, big number of opposition lines, presence of differentiated osteocytes, osteoclasts. The gathered data allow suggesting the osteoinductive influence of the bioactive covers, that were studied.

**Keawords:** bioactive nanostructive materials, osteoblasts, osteoclasts, morphogenetic bone proteins, remodeling of bone tissue

Костная ткань – сложная динамическая структура, состоит из определенной комбинации специализированных клеток, сосудов и межклеточного вещества, которые претерпевают непрерывное ремоделирование в процессах физиологической и репаративной регенерации. В попытках воздействовать на эти процессы применяются различные материалы, обладающие остеиндуктивными и остеоиндуктивными свойствами: ауто-трансплантаты, материалы, обогащенные культивируемыми аутогенными детерминированными костными клетками, содержащие факторы роста, стимулирующие процессы пролиферации и дифференцировки остеогенного пула костной ткани и выполняющие роль матрицы, вдоль которой происходит новообразование кости [1]. Основная проблема этих исследований сводится к биосовместимости материала имплантата и ткани. Приживление и функционирование имплантата

зависит от реакции окружающей ткани, обуславливающей быстрое заживление раны и последовательность стадий остеогенеза. Особое внимание уделяется разработке пористых поверхностных структур, увеличивающих площадь соединения материала с тканью и усиливающих механический эффект сцепления в зоне контакта. Кроме того, такая поверхность обладает повышенным уровнем химической активности, что ускоряет процесс резорбции материала и проникновения тканевых элементов в его пористость. Наибольший интерес представляют имплантаты титановых и магниевых сплавов с биоактивными биорезорбируемыми покрытиями, позволяющие сохранить механическую прочность имплантата в течение времени, необходимом для срастания кости и восстановления ее функций, и способствующие процессам остеогенеза, протекающим в этот период [1, 8].

**Цель исследования** – изучить динамику репаративной регенерации кости на поверхности титановых имплантатов с биоактивным кальций-фосфатным и гидроксиапатитным покрытием.

### Материалы и методы исследования

*Образцы имплантационного материала.* В качестве материала, на который наносилось покрытие, в работе использован технически чистый титан марки VT1-0 (Fe 0,25%; Si 0,12%; C 0,07%; O 0,12%; N 0,04%; H 0,01%, остальное Ti). Перед нанесением покрытий имплантаты механически обрабатывались до определенного уровня шероховатости ( $R_a = 0.12$  мкм). Затем их промывали в дистиллированной воде и обезжиривали спиртом. Плазменное электролитическое оксидирование проводили в электролите, содержащем 30 г/л глицерофосфата кальция ( $C_3H_7O_6P$ )Ca·2H<sub>2</sub>O и 40 г/л ацетата кальция  $Ca(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ . Раствор готовили путем смешивания компонентов при тщательном перемешивании. Оксидирование проводили в биполярном режиме ПЭО. Для проведения эксперимента использованы 2 типа имплантатов: стандартные титановые винты марки титана VT-6 (производитель НПО «Деост», «Остеомед», Россия) и аналогичные имплантаты с нанесенным биоактивным кальций-фосфатным и гидроксиапатитным покрытием.

*Экспериментальные животные и моделирование перелома.* Работа выполнена на 12 половозрелых крысах-самцах линии Wistar, весом 200-250 г в соответствии с Правилами проведения работ и использования экспериментальных животных (Приложение 3 к Приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.), дизайн исследования одобрен этическим комитетом ГБОУ ВПО ТГМУ Минздрава России. Животных содержали в виварии в соответствии с «Санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник» (от 6.04.1993 г.). Животных распределили на 2 группы по 6 крыс в каждой. У животных опытной группы использовали имплантат с покрытием, контрольной группы – имплантат без покрытия.

Оперативное вмешательство осуществлялось в асептических условиях под легким эфирным наркозом. После обработки операционного поля через межмышечковую ямку тонким троакаром формировалось входное отверстие в костномозговой канал бедренной кости. Входное отверстие в межмышечковой ямке расширялся зенкером для последующего погружения шляпки винта в субхондральный слой бедренной кости. В канал вводился винт до середины его длины, таким образом, что в средней трети диафиза бедра конец винта выступал как упор. После чего ручным сгибаемым усилием моделировался закрытый перелом. Репозиция и фиксация отломков осуществлялись также закрытым ручным способом. Таким образом, в эксперименте воспроизводился закрытый малоинвазивный вид остеосинтеза, обеспечивающий непрямо сращение перелома. Рана ушивалась наложением одного-двух швов и обрабатывалась антисептиком.

По три крысы из опытной и контрольной группы выводили из эксперимента через 7 и 30 дней. Для эвтаназии использовался общий наркоз путем внутривенного введения 3%-ного тиопентала натрия, после чего животных декапитировали (приложение 4 к Приказу № 755 МЗ СССР).

Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине на фосфатном буфере в течение 24 часов, после чего промывали 0.1 М Na-фосфатном буфере (pH 7,2) с 6-7 кратной сменой раствора. Образцы декальцинировали в 25% растворе трилона Б (pH 7,0) при комнатной температуре на Orbital Shaker OS-20 biosan. После чего промывали в дистиллированной воде, обезжировали и заливали в парафин по обычным правилам. Срезы толщиной 10 мкм окрашивали гематоксилином и эозином по общепринятой методике. Препараты просматривали в световом микроскопе AxioScope A1 (Carl Zeiss, Германия) и фотографировали с помощью цифровой камеры AxioCam ICc3 (Carl Zeiss, Германия). Количественный анализ данных проводили с помощью окуляр-морфометрической сетки при увеличении объектива 40. Значение каждого показателя вычисляли не менее чем в 20 полях зрения. Морфометрическую обработку полученных фотографий проводили с помощью пакета программ AxioVision 4.8.1.

### Результаты исследования и их обсуждение

В контрольной группе животных на 7-е сутки после операции в области перелома зоны перелома наблюдается умеренная пролиферация клеток внутреннего слоя надкостницы, плотность их распределения на 1 мм<sup>2</sup>  $82,3 \pm 2,3$  мкм, которые вместе с коллагеновым матриксом формируют клеточно-волоконистые тяжи (рисунок, А). Эти тяжи плотно соединяются с новообразованным умеренно базофильным диффузно-волоконистым костным веществом с тонкой базофильной линией склеивания. Ширина надкостницы в этот период колеблется от 142,3 до 160,4 мкм, в среднем  $152,7 \pm 4,2$  мкм. Со стороны эндоста имеется небольшое количество пролиферирующих клеток. Их концентрация на 1 мм<sup>2</sup> составляет  $32,4 \pm 1,3$  мкм. В компактном веществе рядом с местом перелома можно увидеть пустые, без остеоцитов, лакуны и зоны резорбции (рисунок, Б). В отдаленных от места перелома зонах редкие сформированные и разрушающиеся остеоны с многочисленными, но не регулярно расположенными остеоцитами, плотность распределения которых колеблется от 112,8 до 139,5, в среднем  $123,6 \pm 2,8$  в 1 мм<sup>2</sup>.

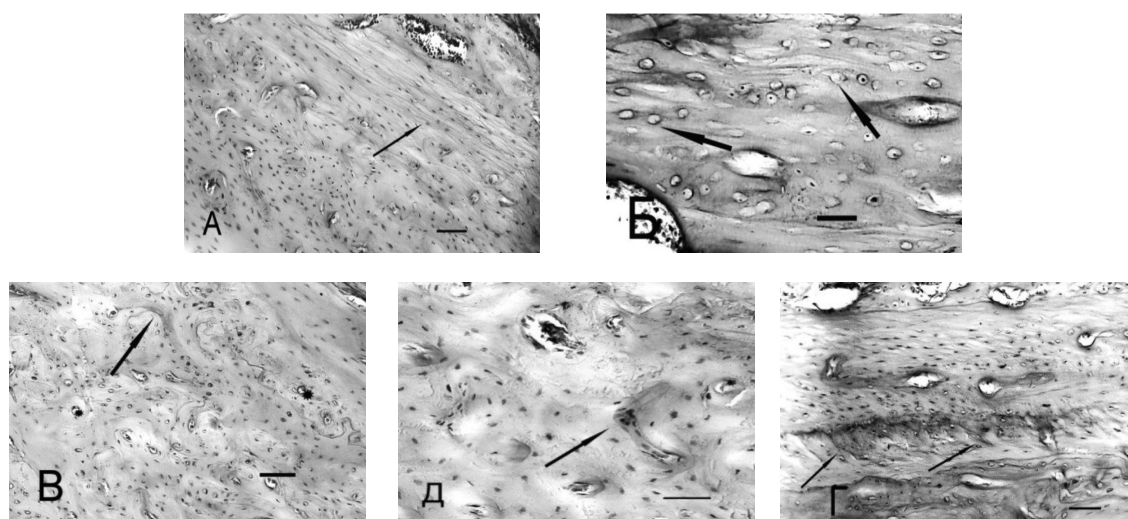
В опытной группе на этих же сроках идет активное формирование со стороны краев костного дефекта мощных трабекулярных костных структур с грубо-волоконистым матриксом, образующих дугообразные фигуры (рисунок, В). По краю новообразованных костных трабекул располагаются остеобласты. По соседству наблюдаются обширные участки фиброзной соединительной ткани с большим количеством полнокровных сосудов. В компактном веществе обнаруживаются немногочисленные «молодые» остеоны с более или менее ровными линиями склеивания и клеточными элементами, имеющими морфологическое сходство с остеоцитами.

Численная плотность клеток немного превышает аналогичные значения в контрольной группе и в среднем составляет  $139,2 \pm 3,1$  в  $1 \text{ мм}^2$ . В зоне непосредственного контакта с имплантатом выявляются базофильные, близко расположенные друг к другу линии склеивания и клетки, слагающиеся в колонки (рисунок, Г). Новообразование костного вещества происходит в условиях значительного кровоснабжения и сопровождается развитием сети новых капилляров. Проллиферативные процессы в периосте и эндосте выражены умеренно. Ширина надкостницы в среднем составляет  $148,7 \pm 3,2$  мкм. Количественная плотность клеток камбиального слоя надкостницы и эндоста на  $1 \text{ мм}^2$   $98,2 \pm 2,1$  и  $49,3 \pm 1,8$  соответственно.

Через месяц от начала эксперимента в контрольной группе возникают признаки незавершенного костеобразования, а пластинчатая костная ткань здесь часто сочетается с очагами грубоволокнистой структуры. В компактном веществе определяются узкие немногочисленные остеоны с расширенным каналом и длинными, темными, слегка волнистыми линиями склеивания. Остеоциты в большом количестве рассеяны в пластинчатом матриксе. Их количество колеблется от  $92,3 \pm 2,1$  до  $129,6 \pm 3,2$ , и в среднем на  $1 \text{ мм}^2$  приходится  $112,3 \pm 3,1$ . Ширина надкостницы в среднем составляет  $141,3 \pm 4,1$  мкм. Плот-

ность клеток камбиального слоя надкостницы так же снижена по сравнению с аналогичными показателями до  $70,3 \pm 2,1$  на  $1 \text{ мм}^2$ . Со стороны эндоста достоверных различий в плотности камбиальных клеток не выявлено и их количество составляет  $29,2 \pm 1,3$  на  $1 \text{ мм}^2$ .

В опытной группе костная ткань имеет более зрелое строение. Компактная кость окрашена однородно и слабо, в основном представлена регулярными слоями пластинчатой кости с небольшим количеством равномерно распределенных клеточных элементов без признаков дегенеративных изменений и умеренно выраженным сосудистым компонентом. Компактное вещество в основном построено остеонами различной толщины. Аппозиционные линии склеивания выглядят более или менее ровными. Клетки имеют типичную морфологию остеоцитов, располагаются упорядоченно, в лакунах, и образуют отростки в виде тонких нитей, пронизывающих костный матрикс, что свидетельствует о высокой степени дифференцировки. Плотность распределения остеоцитов в компактной кости составляет в среднем  $118,9 \pm 1,7$  на  $1 \text{ мм}^2$ . Об интенсивности костеобразовательного процесса свидетельствует и появление остеокластов, на высоте своей активности представляющих собой типичные гигантские многоядерные клетки со слабобазофильной цитоплазмой (рисунок, Д).



*Зона репаративной регенерации бедренной кости крысы при разной экспозиции имплантата с биоактивным покрытием. А. Тяжи collagenовых волокон с пролиферирующими клетками (стрелка) на 7-е сутки эксперимента. Контрольная группа животных. Б. Дистрофически измененная костная ткань в области перелома. Лакуны в компактном веществе кости (стрелки) без видимых перикарионов остеоцитов. Контрольная группа животных, 7-е сутки. В. Образование грубоволокнистого матрикса в виде дугообразных фигур (стрелка) и остеоны вокруг полнокровных сосудов (звездочки) около имплантата без покрытия. 7-е сутки эксперимента. Г. Многочисленные линии склеивания (стрелки) в области локализации имплантата с покрытием на 7-е сутки эксперимента. Д. Компактный слой с остеокластом в лакуне в области имплантата с покрытием на 30-е сутки (стрелка). Окраска гематоксилином и эозином. Масштаб: А, В – 150 мкм, Г – 75 мкм, Б, Д – 50 мкм*



В области периоста генеральные пластинки параллельными рядами обрамляют большую часть поверхности диафиза. Наблюдается снижение морфометрических показателей. Так, ширина надкостницы на поздней стадии регенерации составляет уже в среднем  $135,3 \pm 3,1$  мкм, а плотность клеток камбиального слоя  $82,2 \pm 2,8$  на  $1 \text{ мм}^2$ . Со стороны эндоста по ровному краю костной балки зрелые округлые остеобласты формируют непрерывный слой или образуют скопления. Плотность их распределения также снижена до  $37,3 \pm 1,2$  на  $1 \text{ мм}^2$ .

Мы наблюдали процессы последовательных клеточных реакций при регенерации во всех отделах кости: в области периоста, между концами отломков и со стороны эндоста. Обнаруженные нами морфологические изменения в зоне контакта с имплантатом с нанесенным биоактивным кальций-фосфатным и гидроксипатитным покрытием указывают на активность репаративных процессов. Об этом свидетельствуют активный аппозиционный рост ниже волокнистого слоя периоста, многочисленные линии склеивания, указывающие на процессы резорбции и новообразование костного вещества, пролиферирующие остеобласты. Эту картину дополняют остеокласты, обнаруженные нами на поверхности костных структур, в лакунах. Важным моментом в процессе костного ремоделирования является полноценное кровоснабжение зоны перелома, определяющее тканевую направленность этого процесса.

Одним из основных условий, определяющих скорость заживления перелома, регулирующих пролиферацию и дифференцировку стромальных стволовых клеток в остеогенные, является микроокружение, создаваемое сложным тканевым комплексом [10]. Известно, что основную роль здесь играют костно-морфогенетические белки BMP-2 и BMP-7 [2, 6]. В зоне перелома кости, особенно в периостальной ткани и в межотломковом пространстве, отмечается гиперэкспрессия фактора стромальных клеток-1 (SDF-1) [9]. Сразу после травмы развивается острое воспаление и макрофаги, мигрирующие в очаг повреждения, начинают синтезировать провоспалительные цитокины, в том числе фактор некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкины 1 и 6, стимулирующие ангиогенез за счет активации эндотелиального фактора роста (VEGF) [2]. Следом за первичной гематомой происходит преобразование ее в богатую фибрином соединительную ткань, так называемую мягкую мозоль. Далее происходит активация интрамембранозной осси-

фикации в субпериостальной зоне, и мягкая мозоль замещается новыми костными генерациями. На этой стадии проявляют активность стромальные стволовые клетки, находящиеся окружающих мягких тканях, кортикальной кости, надкостнице, костном мозге [9, 10]. Молекулярные сигнальные механизмы запускают продукцию коллагенов 1 и 2 типов. В этом процессе основную роль играет суперсемейство трансформирующего фактора роста (TGF- $\beta$ ), особенно белки TGF- $\beta$ 2 и TGF- $\beta$ 3, участвующие в энхондральной оссификации [4].

### Заключение

Репаративный остеогенез характеризуется формированием в участке перелома активных остеобластических процессов. Он поддерживается последующей пролиферацией специфических клеточных элементов, формированием волокнистых структур, выпадением аморфного вещества с последующей импрегнацией солями кальция [7]. Критическим пунктом в остеогенезе остается граница между имплантатом и окружающей тканью. Именно здесь происходит взаимодействие активных элементов покрытия с внутренней средой организма и возможных цитотоксических и регенераторных эффектов. Показано, что при подкожной имплантации *in vivo* происходит изменение структуры кальцийфосфатных покрытий, а их химическая биодеградация сопровождается молекулярно-клеточной реакцией со стороны ближайшего микроокружения [5]. Сума этих эффектов определяется комплексом специфических параметров имплантата: значениями концентраций кальция и фосфора, их соотношением и шероховатостью кальцийфосфатного покрытия на поверхности титановых имплантатов. Тем временем, значение физико-химических характеристик покрытий для ремоделирования кости остается не выясненным, поскольку имеющиеся данные в отношении морфофункционального поведения стромальных и остеогенных клеток остаются весьма противоречивыми. Так, согласно Хлусову и др. [3] значение шероховатости поверхности имплантат может заключаться в своеобразной акселерации остеогенеза, а рельеф поверхности способствует прикреплению и удержанию остеобластов на имплантате в условиях постоянных биомеханических нагрузок. Фосфаты кальция как источник биологически активных ионов создают благоприятную химическую среду для остеогенных клеток и обеспечивают стабильную пролиферацию клеток новообразованной кости.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, научный проект № 14-33-00009.*

**Список литературы**

1. Григорьян А.С., Топоркова А.К. Проблемы интеграции имплантатов в костную ткань / А.С. Григорьян, А.К. Топоркова. – М.: Техносфера, 2007. – 128 с.
2. Калиниченко С.Г., Щава С.П., Матвеева Н.Ю. Ангиогенное и цитопротективное влияние основного фактора роста фибробластов в фокусе экспериментальной церебральной ишемии // Тихоокеанский мед. жур. – 2009. – № 2. – С. 66–69.
3. Хлусов И.А., Карлов А.В., Шаркеев Ю.П. и др. Остеогенный потенциал мезенхимальных стволовых клеток костного мозга *in situ*: роль физико-химических свойств искусственных поверхностей // Клеточные технол. в биолог. и медиц. 2005. – № 3. – С. 164–173.
4. Chen G., Deng C., Li Y.P. TGF- $\beta$  and BMP Signaling in osteoblast differentiation and bone healing // *Int. J. Biol. Sci.* 2012. – Vol. 8. – P. 272–288.
5. Jain A.P., Pundir S., Sharma A. Bone morphogenetic proteins: the anomalous molecules // *Journal of Indian Society of Periodontology.* 2013. Vol. 17, No. 5. P. 583–586.
6. Kanakaris N.K., Calori G.M., Verdonk R. et al. Application of BMP-7 to tibial non-unions: A 3-year multicenter experience // *Injury.* 2008. Vol. 39. P. 83–90.
7. Marin C., Granato R., Suzuki M. et al. Histomorphologic and histomorphometric evaluation of various endosseous implant healing chamber configurations at early implantation times: a study in dogs // *Clin. Oral. Implants. Res.* 2010. Vol. 21, N 6. Pp. 577-583.
8. Terheyden H., Lang N.P., Bierbaum S., Stadlinger B. Osseointegration-communication of cells // *Clin. Oral. Implants. Res.* 2012. Vol. 23, N 10. Pp. 1127-1235.
9. Thalji G., Cooper L.F. Molecular assessment of osseointegration in vivo: a review of the current literature // *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants.* 2013. Vol. 28, N 6. Pp. 521-534.
10. Yuan H., Kurashina K., de Bruijn J.D. et al. Colnot C. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics Zhang Xingdong // *Biomaterials.* 1999. Vol. 20. P. 1799–18.