

© Ю. М. Ирьянов, 2013
УДК 611.018.4:616.71-007.235-089.843:599.323.4

Ю. М. Ирьянов

ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ МИНЕРАЛИЗОВАННОГО КОСТНОГО МАТРИКСА

Лаборатория морфологии (зав — проф. Ю. М. Ирьянов), Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия им. акад. Г. А. Илизарова», г. Курган

В эксперименте на 50 крысах линии Вистар при использовании гистологических методов, сканирующей электронной микроскопии и рентгеновского электронно-зондового микроанализа исследованы особенности репаративного костеобразования при имплантации в дефект большеберцовой кости гранулированного минерализованного костного матрикса (МКМ), полученного без применения термической и деминерализующей обработки. Установлено, что МКМ обладает выраженными остеоиндуктивными и остеокондуктивными свойствами, при имплантации наблюдаются пролонгированная активизация репаративного костеобразования, глубокое прорастание костной ткани в имплантат, ускорение органотипического ремоделирования регенерата, интенсивный ангиогенез и раннее восстановление поврежденной кости.

Ключевые слова: *дефект кости, имплантация, минерализованный костный матрикс*

Разработка, получение и экспериментально-клиническая апробация остеопластических имплантационных материалов с комплексом заданных свойств (биоактивность, биосовместимость, биорезистентность, остеоиндукция, остеокондукция и др.) остается одной из наиболее актуальных проблем современной ортопедии и травматологии [1, 4]. Наиболее часто используемыми остеопластическими материалами являются: деминерализованный костный матрикс, трехмерные матрицы из полимолочных и полигликолевых кислот, коллагеновые криогели, стеклокристаллические материалы — биостекла и биоситаллы, аналоги костного минерала — гидроксипатит, трикальций фосфат, а также полисахариды природного происхождения [1, 4, 5, 10]. При изучении отдаленных результатов установлено, что имплантаты из биоинертных материалов не остеointегрируются, а окружаются фиброзной капсулой, формирующейся на границе костная ткань — имплантат, вне зависимости от того, использовали плотный или пористый материал [6, 7, 9, 11]. В связи с этим в последнее время предпочтение отдается имплантатам, полученным из биологических, природных структур, в частности, из аллокости и костей крупного рогатого скота [5, 6, 8]. Недостатками известных имплантатов являются: сложность изготовления, низкая остеоиндуктивная и остеопластическая эффективность, отсутствие остеокондуктивной активности, они ограниченно био-

совместимы, окружаются фиброзной капсулой. При получении известных имплантатов из костей используют термическую обработку, деминерализующие вещества (концентрированные кислоты и щелочи), нарушающие естественную микроархитектонику, структуру, пористость и химический состав матрикса костной ткани, что существенно ограничивает адгезию и дифференцировку остеогенных клеток и отрицательно сказывается на остеointеграционных свойствах имплантатов и клинических результатах [1, 4, 12]. Цель настоящей работы — морфологический анализ остеопластической эффективности минерализованного костного матрикса (МКМ), полученного без применения термической и деминерализующей обработки, при имплантации в дефект кости.

Материал и методы. Эксперименты выполнены на 50 половозрелых крысах линии Вистар массой 340–390 г. Содержание, эксперименты и эвтаназию животных выполняли с соблюдением правил гуманного обращения с животными в соответствии с требованиями Комитета по биоэтике «РНЦ „ВТО” им. акад. Г. А. Илизарова» и нормативных документов [2]. Были сформированы 2 группы по 25 крыс в каждой — контрольная и подопытная. Животных той и другой группы содержали в одинаковых условиях вивария на стандартном рационе. В условиях операционной с использованием общей анестезии (рометар 8 мг и золетил 4 мг на 1000 г массы тела внутримышечно) на границе проксимальной трети диафиза и метафиза большеберцовых костей у животных контрольной и подопытной групп осуществляли моделирование несквозных окончатых дефектов диаметром 2,5–3 мм, с проникновением в костномозговую полость, путем односто-

Сведения об авторах:

Ирьянов Юрий Михайлович (e-mail: irianov@mail.ru), лаборатория морфологии экспериментального отдела травматологии и ортопедии, Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия им. акад. Г. А. Илизарова», 640014, Курган, ул. М. Ульяновой, 6

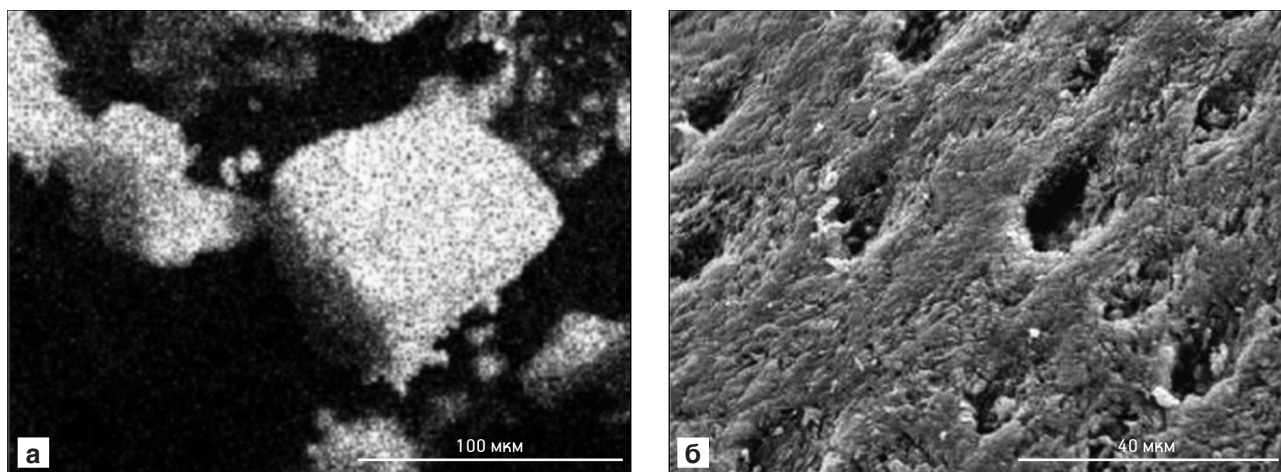


Рис. 1. Имплантируемые гранулы минерализованного костного матрикса (МКМ).

а — карта электронно-зондового микроанализа в характеристическом рентгеновском излучении кальция; б — макро- и микропоры и наноструктурированность гранулы МКМ. Сканирующая электронная микроскопия

ронней перфорации кортикального слоя кости зубо-врачебным бором. Животным подопытной группы непосредственно после операции в область сформированного дефекта вводили стерильный биоматериал — гранулированный МКМ массой 2–3 мг, который получали из аллогенных трубчатых костей по оригинальной технологии без применения термической и деминерализующей обработки с последующим измельчением до порошкообразного состояния. Микрорельеф и структуру гранул МКМ исследовали в сканирующем электронном микроскопе JSM-840 (Jeol, Япония). При помощи рентгеновского электронно-зондового микроанализатора INCA-200 Energy (Oxford instruments, Англия) в гранулах МКМ измеряли концентрацию натрия, магния, фосфора, серы и кальция, получали изображения в характеристическом рентгеновском излучении кальция, выявляли участки с различной концентрацией кальция.

Через 2, 5, 7, 14 и 21 сут животных выводили из эксперимента (использовали по 5 животных на каждую временную точку). Оперированные голени вычленили в коленных и голеностопных суставах. Большеберцовые кости вместе с параоссальными тканями фиксировали в 2% растворе параформальдегида и глутаральдегида и заливали в парафин (после декальцинации) и аралдит (без декальцинации). Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином — эозином и пикрофуксином по Ван-Гизону. Аралдитовые блоки костей шлифовали, полировали и исследовали при помощи рентгеновского электронно-зондового микроанализатора: определяли активность костеобразовательного процесса по

содержанию в регенерате костной ткани и неминерализованных компонентов. По отношению этих показателей (концентрация костной ткани/концентрация неминерализованных компонентов) рассчитывали индекс компактности регенерата, характеризующий интенсивность костеобразования и степень зрелости новообразованной костной ткани. В последней определяли концентрацию остеоида и минерализованного матрикса. После проведения электронно-зондового микроанализа аралдит с поверхности блоков удаляли дозированной обработкой 6% раствором гипохлорида натрия. Блоки напыляли сплавом платины и палладия в соотношении 1:3 в ионном вакуумном напылителе IB-6 (Eiko, Япония) при ионном токе 6 мА и межэлектродном напряжении 1,5 кВ и исследовали при помощи сканирующего электронного микроскопа. Результаты количественных исследований обрабатывали методами вариационной статистики. Значимость различий сравниваемых параметров рассчитывали с использованием критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при уровне $P < 0,05$. Расчеты производили с использованием пакета статистических программ «Microsoft Office Excel 2003».

Результаты исследования. Имплантируемые гранулы МКМ имеют размер 50–200 мкм в поперечнике и упорядоченную высокопористую структуру, строение их поверхности характеризуется резко выраженной шероховатостью и фрактальностью с размером зерна в нанодиапазоне (рис. 1). Они обладают наноструктурированностью, множеством макро- и микропор неправильной формы размером 10–20 мкм, некоторые из пор имеют размеры менее 100 нм. Поры соответствуют местам локализации костных лакун и костных канальцев, из которых клетки и другие органические компоненты были удалены при получении имплантата. Микроархитектоника гранул МКМ близка к естественной архитектонике костного матрикса (см. рис. 1, б). Содержание основных остеотропных макроэлементов в составе гранул МКМ представлено в табл. 1.

Таблица 1

Относительное содержание различных химических элементов в имплантируемых гранулах минерализованного костного матрикса ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Химические элементы	Доля от общей массы, %
Натрий	0,440±0,020
Магний	0,350±0,010
Фосфор	13,6±0,6
Сера	0,281±0,010
Кальций	26,8±1,3

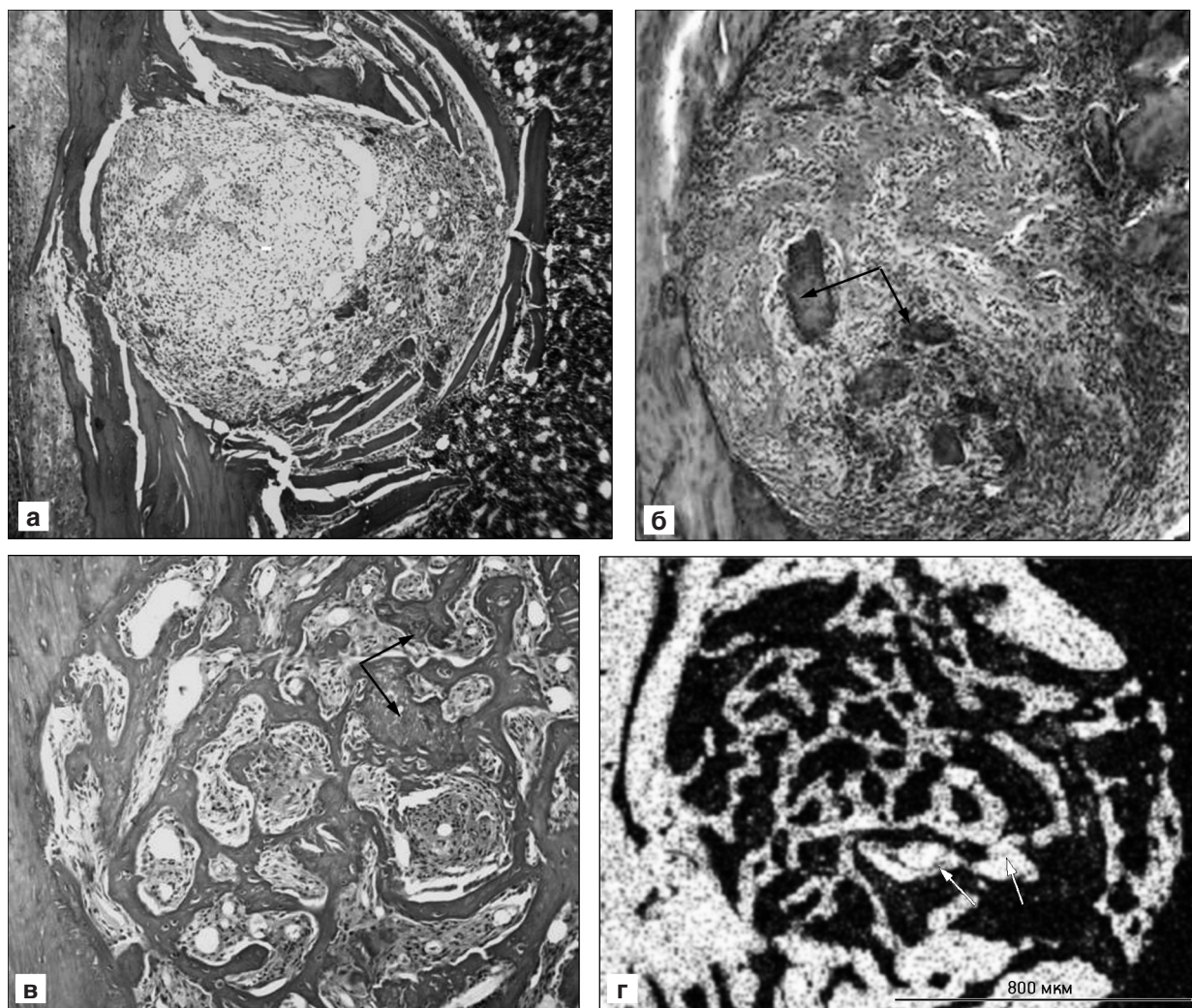


Рис. 2. Строение регенератов в перфорационной полости большеберцовых костей крыс через 7 (а, б) и 14 (в, г) сут после операции.

а — в контрольной группе трабекулы формируются лишь на периферии регенерата; б — в подопытной группе костные трабекулы заполняют всю перфорационную полость; в, г — регенерат у животного подопытной группы; аппозиционный рост костной ткани у края дефекта. Стрелки — гранулы минерализованного костного матрикса; г — карта электронно-зондового микроанализа в характеристическом рентгеновском излучении кальция. а, б, в — парафиновые срезы, окраска гематоксилином — эозином. Об. 10, ок. 10

Гистологические исследования показали, что через 2–5 сут после операции в обеих группах животных в зоне повреждения выявляются альтеративно-деструктивные изменения, и возникает острая воспалительная реакция. Обнаруживаются очаги организованной гематомы со сгустками фибрина, малодифференцированными клеточными элементами, нейтрофильными гранулоцитами, макрофагами, тучными клетками и экстравазальными эритроцитами и лимфоцитами. Выявляются лейкоцитарно-некротические массы, содержащие лизированные клетки и пласты фибрина. Клеточные элементы воспаления и осколки кости, образовавшиеся при операции, формируют центрально расположенный очаг воспаления, на месте которого к 7-м суткам развертываются восстановительные процессы, наблюдается репаративное костеобразование по типу

интрамембранного окостенения и формируется регенерат, постепенно заполняющий перфорационную полость (рис. 2).

Через 7 сут после операции в регенерате у контрольных животных выделяются две зоны — периферическая и центральная. В периферической зоне наблюдается новообразование грубоволокнистой костной ткани, в контрольной группе образуются к этому сроку лишь единичные тонкие трабекулы и небольшие костно-остеоидные островки (см. рис. 2, а), репаративное костеобразование при этом развивается от периферии к центру (центростремительно). В центральной зоне регенерата в контрольной группе наблюдается малодифференцированная соединительная ткань с признаками отека, содержащая немногочисленные кровеносные сосуды, экссудат и клеточный детрит. В подопытной группе животных в пери-

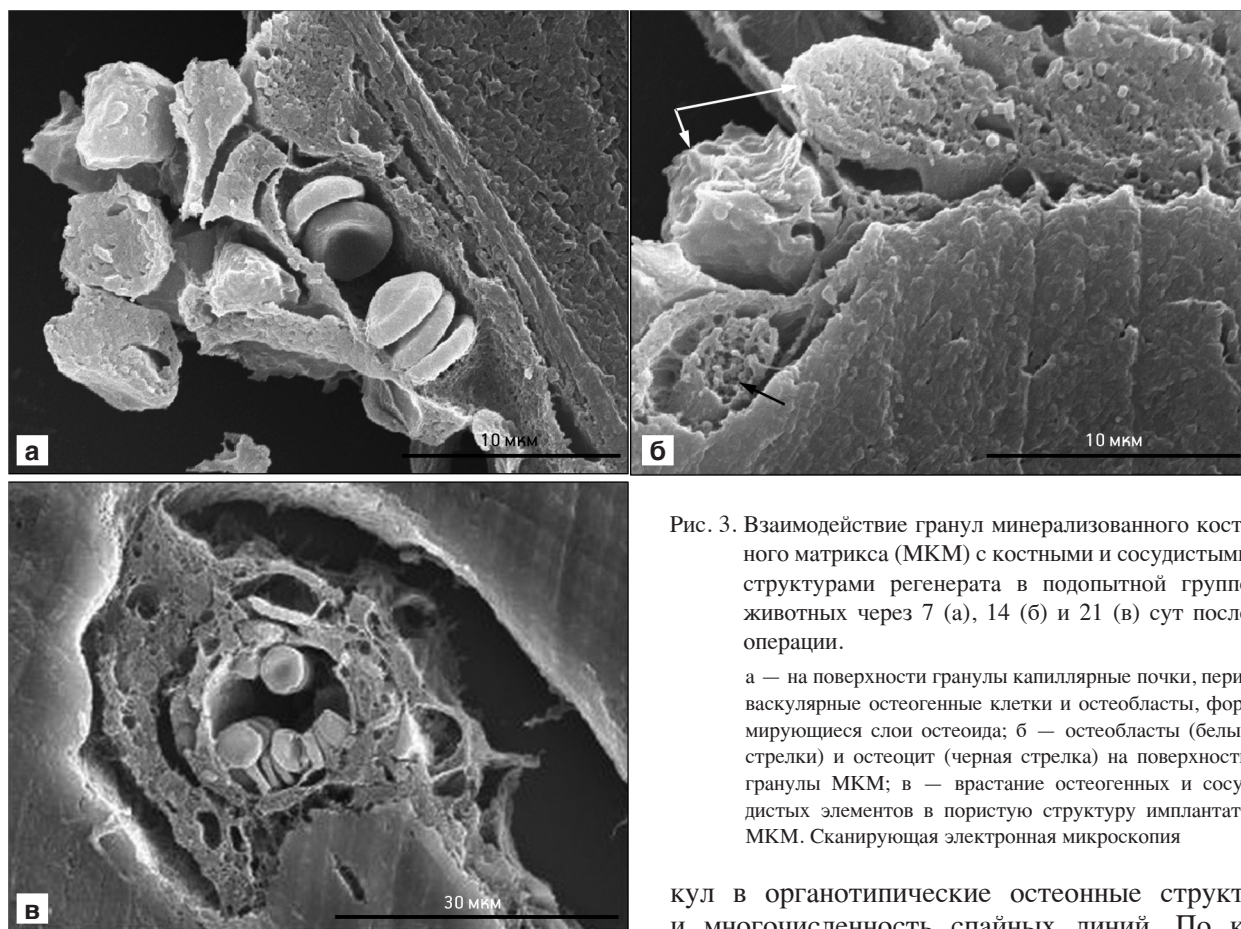


Рис. 3. Взаимодействие гранул минерализованного костного матрикса (МКМ) с костными и сосудистыми структурами регенерата в подопытной группе животных через 7 (а), 14 (б) и 21 (в) сут после операции.

а — на поверхности гранулы капиллярные почки, периваскулярные остеогенные клетки и остеобласты, формирующие слои остеоида; б — остеобласты (белые стрелки) и остеоцит (черная стрелка) на поверхности гранулы МКМ; в — вращение остеогенных и сосудистых элементов в пористую структуру имплантата МКМ. Сканирующая электронная микроскопия

ферической зоне регенерата формируется обширная мелкопетлистая сеть утолщенных трабекул, покрытых рядами многочисленных остеобластов, формирующих губчатое костное вещество, тесно спаянное с поверхностью компактного вещества (см. рис. 2, б), в центральной зоне регенерата выявляются многочисленные костные трабекулы, остеобластические и фибробластические элементы и значительное количество расширенных и заполненных кровью сосудов. У животных подопытной группы клетки воспалительной реакции не выявляются, репаративное костеобразование в регенерате формируется по всему поперечнику дефекта и развивается как в центробежном направлении, так и центростремительно. Вокруг гранул МКМ определяются зоны активного аппозиционного костеобразования. В этих участках отсутствуют геморагии и очаги деструкции, отмечается активная пролиферация фибробластов и преosteобластов, интенсивный неoангиогенез, на поверхности гранул формируется слой остеогенных клеток, остеоида и костного матрикса (рис. 3, а).

Через 14 и 21 сут после операции в регенерате у подопытной группы животных наблюдается фаза органогенеза и ремоделирования, о чем свидетельствует перестройка первичных трабе-

кул в органотипические остеонные структуры и многочисленность спайных линий. По краю дефекта определяются массивные напластования новообразованной костной ткани, которая по степени кальцификации приближается к неповрежденному кортикальному слою (см. рис. 2, в, г). В регенерате часто обнаруживаются характерного строения лакуны остеоцитов, одной из стенок которых является поверхность гранул имплантата (см. рис. 3, б). Пустые лакуны остеоцитов немногочисленны. Среди трабекул пластинчатой костной ткани видны замурованные в костную ткань остатки гранул МКМ (см. рис. 2, в, г). Это свидетельствует о том, что темп биодеградации имплантата соответствует скорости новообразования костной ткани. Большинство пор имплантируемых гранул через 21 сут после операции заполняются остеогенными клетками, формирующими костную ткань внутри имплантата (см. рис. 3, в), что обеспечивает ему приобретение остеогенных свойств. У животных контрольной группы формирование тканеспецифического регенерата кости в области дефекта происходит медленнее и в более поздние сроки, наблюдается лишь постепенное преобразование балок грубоволокнистой костной ткани в более минерализованные и зрелые.

Количественные исследования показали (табл. 2), что через 7 сут после операции объем костной ткани (как остеоида, так и минерализованного матрикса) в регенерате животных под-

Таблица 2

**Доля различных компонентов в составе регенерата, формирующегося в перфорационной полости
большеберцовой кости крыс ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, %)**

Исследованные компоненты	Срок после операции, сут					
	7		14		21	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Неминерализованные компоненты	91±4	82±4*	42,5±2,1	30,2±1,4*	14,7±0,7	7,3±0,3*
Остеоид	2,40±0,10	5,60±0,20*	11,4±0,5	18,0±0,9*	17,0±0,8	19,3±0,9*
Минерализованный матрикс	6,20±0,20	12,3±0,5*	46,1±2,2	51,8±2,3*	68±3	73±4*

* Значимые изменения по сравнению с контрольными показателями.

опытной группы увеличивается почти в 2 раза по сравнению с контрольными показателями ($P < 0,01$). Индекс компактности увеличивается с $0,09 \pm 0,001$ в контрольной группе до $0,21 \pm 0,002$ в подопытной ($P < 0,001$), что свидетельствует об увеличении степени зрелости новообразованной костной ткани в подопытной группе животных. Через 14 и 21 сут после операции объем костной ткани в регенерате существенно возрастает в обеих группах, но наиболее значительно — в подопытной группе животных ($P < 0,01$). Индекс компактности в этот период составляет: через 14 сут — $1,35 \pm 0,06$ в контроле и $2,31 \pm 0,10$ в опыте ($P < 0,01$); через 21 сут — $5,80 \pm 0,20$ в контроле и $12,7 \pm 0,5$ в опыте ($P < 0,001$).

Обсуждение полученных данных. Проведенные исследования показали, что гранулы МКМ, полученные без воздействия высоких температур и деминерализующих агентов, имеют трехмерную структуру взаимосвязанных пор и сохраняют естественную остеoarхитектуру. Химический состав гранул соответствует минеральному составу коркового слоя диафиза большеберцовой кости интактных взрослых крыс [3]. Величина коэффициента Ca/P, отражающая качественный состав апатита в имплантируемых гранулах МКМ, составляет $1,97 \pm 0,11$, что меньше, чем у кристаллического гидроксиапатита. Это подтверждает данные литературы [5, 7], свидетельствующие о том, что минерализованный матрикс интактных костей не является аналогом стехиометрического гидроксиапатита — $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$, а представляет собой даллит — карбоксигидроксиапатит — $\text{Ca}_5[\text{PO}_4] \times [\text{CO}_3]_3\text{OH}$ с лабильной структурой поверхностного слоя аморфного апатита. Наши исследования показали, что образование в биологической среде организма этого поверхностного карбонатапатитного слоя на порах гранул МКМ, обладающего более выраженной, по сравнению с натуральной костью, интенсивностью обмена ионов, обеспе-

чивает аффинитет к костной ткани регенерата, ее вращение, плотный контакт с поверхностью имплантируемых гранул и образование остеинтегративного соединения. Известно, что в минерализованном матриксе костной ткани локализуются факторы роста и костные морфогенетические белки, выделяющиеся при остеокластической резорбции [1, 4]. Это обеспечивает имплантационным гранулам МКМ свойства остеиндуктора и наиболее благоприятные условия для адгезии, пролиферации, дифференцировки и функционирования остеогенных клеток, чему способствует шероховатость поверхности и наноструктурированность гранул МКМ.

Таким образом, при имплантации в зону дефекта кости гранул МКМ наблюдается пролонгированная активизация репаративного костеобразования, глубокое прорастание костной ткани в имплантат, ускоряется процесс ремоделирования регенерата и сокращаются сроки заживления поврежденной кости. Относительная атравматичность оперативного вмешательства, простота технологии заготовки и консервации имплантационного материала, остеокондуктивные, остеиндуктивные и остеогенные свойства, характерный темп биodeградации, соответствующий скорости репаративного костеобразования, отсутствие биологической реакции отторжения ставят исследованный биоматериал в ряд наиболее оптимальных костно-пластических материалов, особенно в условиях уменьшения индивидуального остеогенетического потенциала у пациентов зрелого и пожилого возраста. Применение имплантата из МКМ в качестве стимулятора остеогенеза представляется теоретически обоснованным и перспективным, в частности, при оперативном лечении дефектов костей, образовавшихся в результате остеомиелитических секвестров, костных кист, очагов остеонекроза и онкологических заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Деев Р. В., Исаев А. А., Кочиш А. Ю. и Тихилов Р. М. Пути развития клеточных технологий в костной хирургии. Травматол. и ортопед. России, 2008, т. 47, № 1, с. 65–74.
2. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей. Вopr. реконструктивной и пластической хирургии, 2003, № 4, с. 34–36.
3. Ирьянов Ю. М. и Ирьянова Т. Ю. Влияние гамма-излучения на минерализацию длинных трубчатых костей у крыс. Морфол. ведомости, 2005, № 3–4, с. 38–40.
4. Корж Н. А., Кладченко Л. А. и Малышкина С. В. Имплантационные материалы и остеогенез. Роль оптимизации и стимуляции в реконструкции кости. Ортопед. травматол., 2008, № 4, с. 5–14.
5. Леонтьев В. К. и Литвинов С. Д. Имплантационные материалы для замещения дефектов костной и хрящевой ткани. Рос. вестн. дентальной имплантологии, 2003, № 2, с. 10–19.
6. Лысенко Л. Н. Биоматериаловедение: вклад в прогресс современных медицинских технологий. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2005, т. 1, № 2, с. 56–61.
7. Путляев В. И. Современные биокерамические материалы. Соровский образовательный журн., 2004, т. 8, № 1, с. 44–49.
8. Хенч Л. и Джонс Л. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей. М., Техносфера, 2007.
9. Шишацкая Е. И. Клеточные матриксы из резорбируемых полигидроксикапролатов. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2007, т. 2, № 2, с. 68–75.
10. Duguy N., Petite A. and Arnaud E. Biomaterials and osseous regeneration. Ann. Chir. Plast. Esthet. 2000, v. 45. № 3, p. 364–376.
11. Eberli D. and Atala A. Tissue engineering using adult stem cells. Methods In Enzymology, 2006, v. 420, p. 287–302.
12. Marion N. W. and Mao J. J. Bone reconstruction with bone marrow stromal cells. Methods in Enzymology, 2006, v. 420, p. 362–380.

Поступила в редакцию 15.06.2012

OSTEOPLASTIC EFFECTIVENESS OF MINERALIZED BONE MATRIX

Yu. M. Irianov

In the experiment conducted on 50 Wistar rats, the peculiarities of the reparative osteogenesis were studied using scanning electron microscopy, x-ray electron-probe microanalysis and histological techniques. Granulated mineralized bone matrix (MBM) obtained without thermal and demineralizing treatment, was implanted into the tibial defect. MBM was found to possess marked osteoinductive and osteoconductive properties. It induced a prolonged activation of reparative osteogenesis after the implantation, as well as deep bone tissue ingrowth into the implant, acceleration of organotypic remodeling of regenerated bone, intense angiogenesis and early restoration of the damaged bone.

Key words: *bone defect, implantation, mineralized bone matrix*

Laboratory of Morphology, G. F. Ilizarov Russian Scientific Center for Restorative Traumatology and Orthopaedics, Kurgan