

## **ПРИМЕНЕНИЕ ИМПЛАНТАЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ С НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ НЕКОЛЛАГЕНОВЫМИ КОСТНЫМИ БЕЛКАМИ ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ДЕФЕКТОВ МЕТАФИЗОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

**Лунева С.Н., Талашова И.А., Осипова Е.В., Накоскин А.Н., Еманов А.А.**

*<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г. А. Илизарова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Курган, Россия, (640014, Курган, ул. М. Ульяновой, д.6), e-mail: [nakoskin\\_a@mail.ru](mailto:nakoskin_a@mail.ru)*

Приведены результаты сравнительного гистоморфометрического анализа костной ткани регенерата, формирующегося в полости конусообразного дефекта метафиза при применении композиционных имплантационных материалов. В состав материалов входят выделенные из бычьей костной ткани кальцийфосфатные соединения и низкомолекулярные неколлагеновые костные белки, имеющие различное сродство к ионообменникам. Для гистологического и гистоморфометрического исследования использовали фрагменты проксимальных метафизов большеберцовых и плечевых костей взрослых беспородных собак, включающие области сформированных дефектов. Гистоморфометрическое исследование недекальцинированных срезов включало определение статических показателей костеобразования и резорбции: объем, поверхность и толщину остеоида, поверхность резорбции. Также определяли толщину трабекул и объем трабекулярной кости, который соответствовал проценту объема губчатой кости, занятого минерализованной и остеонидной костной тканью, исключая медуллярные и васкулярные пространства. При гистологическом и гистоморфометрическом исследовании костной ткани регенератов установлено, что исследуемые материалы вызывают активацию процессов костеобразования, резорбции и ангиогенеза, что способствует восстановлению дефекта.

Ключевые слова: восстановление костных дефектов, остеогенез, гистоморфометрический анализ, имплантационный материал, костные белки.

## **APPLICATION IMPLANT MATERIALS WITH LOW MOLECULAR WEIGHT NON-COLLAGENOUS BONE PROTEINS FOR REPLACING A DEFECT METAPHYSIS EXPERIMENTAL**

**Luneva S.N., Talashova I.A., Osipova E.V., Nakoskin A.N., Emanov A.A.**

*<sup>1</sup>The Federal State-Financed Institution Russian Ilizarov Scientific Center for Restorative Traumatology and Orthopaedics of RF Ministry of healthcare development, Kurgan, Russia, (640014, Russia, Kurgan, M.Ulyanova street, 6.), e-mail : [nakoskin\\_a@mail.ru](mailto:nakoskin_a@mail.ru)*

The results of comparative histomorphometric analysis of bone regenerate, forming a cone-shaped cavity in the metaphyseal defect in the application of composite implant materials. In the material composition comprises isolated from bovine bone calcium phosphate compounds and low molecular weight non-collagenous bone proteins having different affinities to the ion exchanger. For histological and histomorphometric studies used fragments of proximal tibial metaphyseal bone and shoulder adult mongrel dogs, including the area formed defects. Histomorphometric study sections included determination of static parameters of bone formation and resorption : volume, surface and thickness of osteoid surface resorption. Also measured the thickness of the trabecular volume and trabecular bone, which corresponded to the percentage of trabecular bone volume occupied by osteoid and mineralized bone, excluding medullary and vascular space. Histological and histomorphometric study of bone regenerates found that the investigated materials cause the activation processes of bone formation , resorption and angiogenesis that contributes to the restoration of the defect.

Keywords: restoration of bone defects, osteogenesis, histomorphometric analysis, implant material, bone proteins.

**Введение.** Для замещения дефектов в клинической практике используют разнообразные кальцийфосфатные материалы, имеющие различия по

биосовместимости и резорбируемости матрицы, степени выраженности остеокондуктивности и остеоиндуктивности. Свойства кальцийфосфатных материалов определяются их физико-химическими и структурными параметрами. Однако до сих пор среди них нет идеально совпадающих по своему составу и свойствам с нативной костной тканью [10].

**Цель исследования** - сравнительный гистоморфометрический анализ костной ткани регенератов, формирующихся в конусообразных дефектах метафиза, при применении композиционных имплантационных материалов, содержащих низкомолекулярные неколлагеновые костные белки, имеющие различное сродство к ионообменникам.

#### **Материал и методы исследования**

Эксперименты проведены на 19 взрослых беспородных собаках обоего пола в возрасте от одного года до трех лет весом  $11,2 \pm 2,4$  кг.

Животным в стерильных условиях под общим наркозом моделировали конусообразные несквозные дефекты диаметром 5 мм и высотой 7 мм в проксимальных метафизах большеберцовых и плечевых костей. Дефекты заполняли композиционным материалом, в состав которого входили кальцийфосфатное соединение, выделенное из костной ткани сельскохозяйственных животных по оригинальной методике [8], и низкомолекулярные неколлагеновые костные белки, имеющие сродство к катионообменникам или не имеющие сродство к ионообменникам [2].

Животные были разделены на 2 группы. В первой группе «О» (n=9) композиционный материал содержал низкомолекулярные неколлагеновые костные белки, не имеющие сродства к ионообменникам; во второй «К» - (n=10) - имеющие сродство к катионообменникам. В обеих группах животных выводили из эксперимента через 21 (n=5+5) и 42 (n=4+5) суток после операции.

Содержание животных, оперативные вмешательства и эвтаназию осуществляли согласно требованиям приказа МЗ СССР № 755, 1977 г., а также руководствуясь требованиями, изложенными в «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» с соблюдением этических норм и гуманного отношения к объектам изучения [3].

Для гистологического и гистоморфометрического исследования выпиливали фрагменты проксимальных метафизов большеберцовых и плечевых костей, включающие области сформированных конусообразных дефектов. Все образцы

костей фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина, после чего метафизы распиливали пополам в саггитальной плоскости. Одну половину после декальцинации и стандартной гистологической проводки заливали в целлоидин, изготавливали срезы толщиной 8-10 мкм и окрашивали их гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону и трихромным методом по Массону. На гистологических препаратах в площади дефекта определяли долю новообразованной костной ткани и композиционного имплантационного материала (КИМ).

Вторую половину материала не декальцинировали, после фиксации и проводки изготавливали аралдитовые блоки. На ультрамикротоме «Nova» (Швеция) с помощью стеклянных ножей изготавливали срезы толщиной 1-2 мкм. Без удаления смолы срезы окрашивали метиленовым синим, реактивом Шиффа, а также по методу Косса с дополнительной окраской по Ван-Гизону [4].

Гистоморфометрическое исследование недекальцинированных срезов включало определение статических показателей костеобразования и резорбции, рекомендуемых American Society of Bone and Mineral Research Histomorphometry Nomenclature Committee в остеологических исследованиях [6]: объем (OV/BV, %), поверхность (OS/BS, %) и толщину (O.Th., мкм) остеоида, поверхность резорбции (ES/BS, %). Также определяли толщину трабекул (Tb.Th., мкм) и объем трабекулярной кости, который соответствовал проценту объема губчатой кости, занятого минерализованной и остеоидной костной тканью, исключая медуллярные и васкулярные пространства [5].

Оцифровку полей зрения гистологических препаратов проводили на аппаратно-программном комплексе «ДиаМорф» (Россия), для анализа оцифрованных изображений использовали программное обеспечение «ВидеоТест 4,0 – Мастер» (Россия).

С целью получения результатов в реальных единицах измерения (мкм) выполняли калибровку системы по изображению объект-микрометра, введенного при том же увеличении (об. 40, ок. 10), что и поля зрения препаратов.

Учитывая, что состав кости собак имеет близкие значения к аналогичным показателям человека [9], полученные результаты сравнивали с данными литературы [6].

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программ «Microsoft Excel – 2007» и «AtteStat» Версия 1.0 [1]. Цифровые данные представлены в виде среднего арифметического значения и стандартного

отклонения ( $M \pm SD$ ) или медианы ( $Me$ ) и интерквартильного размаха ( $LQ_{25}-UQ_{75}$ ). Для оценки статистической значимости различий средних и медиан, в зависимости от нормальности распределения, использовали критерии Стьюдента и Вилкоксона. Различия между группами считали существенными при  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования

У животных обеих групп в полости дефекта наблюдали однотипные морфологические изменения. Так, через 21 сутки эксперимента дефект имел четкую границу, по его периферии новообразованные костные структуры формировали мелкопетлистую трабекулярную сеть по направлению от края к центру. Центр дефекта был заполнен рыхлой волокнистой соединительной тканью, в толще которой формировались трабекулы из ретикулофиброзной костной ткани.

К 42 суткам эксперимента в обеих группах четкая граница дефекта отсутствовала, новообразованный участок отличался от окружающей его кости микроархитектурной организацией трабекулярной сети и содержанию межтрабекулярных пространств (соотношению красного и желтого костного мозга, количеству кровеносных сосудов).

В тоже время отмечались различия между группами по скорости заполнения дефектов костной тканью, о чем свидетельствуют данные морфометрии гистологических препаратов (рис. 1).

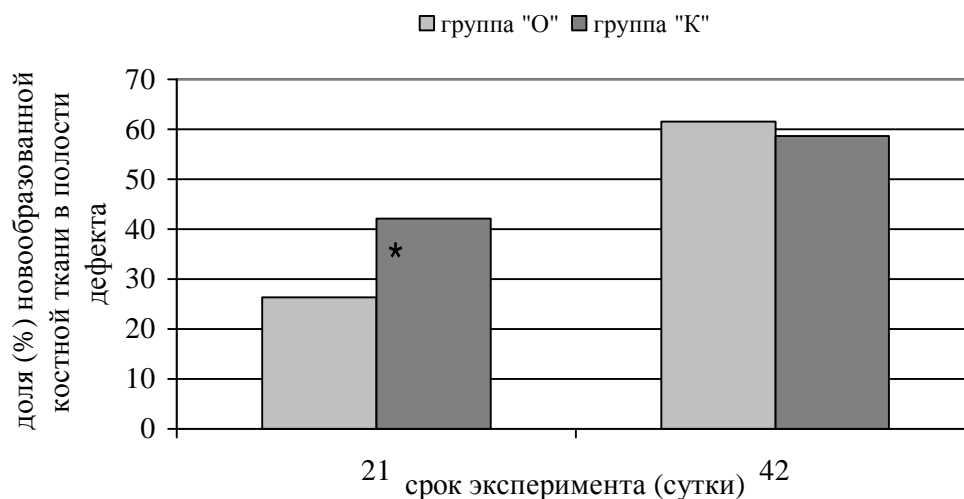


Рис. 1. Динамика заполнения дефектов новообразованной костной тканью.

\* - различия значимы по сравнению с группой «О» при  $p < 0,05$

Различным оказалось содержание и распределение имплантационного материала в полости дефекта. У животных из группы «О» через 21 сутки эксперимента гранулы имплантационного материала располагались, в основном, в

центре дефекта, их доля составляла 10,2% (7,6%; 12,6%), в группе «К» - КИМ в полости дефекта был распределен неравномерно и занимал 1,2% (1,1%; 2,3%) ( $p=0,014$ ) его площади. У всех животных в составе новообразованных трабекул определялись частицы КИМ. К 42 суткам эксперимента в полости дефекта в каждой группе только у двух животных определялись единичные гранулы КИМ.

В проведенных ранее исследованиях было показано, что без заполнения КИМ через 42 суток эксперимента происходит лишь частичное возмещение аналогичных дефектов. При этом в кости сохраняется выемка, заполненная рыхлой волокнистой соединительной тканью, а кортикальная пластинка находится в стадии формирования [7].

Результаты гистоморфометрического исследования также показали различия между группами в скорости репаративных процессов, происходящих в полости дефекта (табл. 1).

Таблица 1.

Гистоморфометрические параметры костной ткани регенератов, формирующихся в дефектах

Параметры	1. Группа «О»		2. Группа «К»	
	21 сутки (n=5)	42 суток (n=4)	21 сутки (n=5)	42 суток (n=5)
Объем трабекулярной кости, %	72,07 (66,39; 82,54)	42,75** (35,31; 61,01)	64,45 (58,60; 72,91)	36,67** (27,43; 44,51)
Объем остеоида (OV/BV), %	24,82 (18,08; 30,65)	9,22* (6,30; 12,06)	19,55 (14,92; 28,09)	7,23* (3,68; 14,15)
Толщина остеоида (O.Th.), мкм	11,80 (8,90; 14,25)	6,74 (4,59; 8,15)	9,28 (6,28; 12,72)	4,70 (2,35; 9,20)
Остеоидная поверхность (OS/BS), %	86,46 (66,91; 99,72)	21,52** (15,40; 30,65)	77,21 (69,61; 87,35)	19,79*** (12,68; 27,68)
Поверхность резорбции (ES/BS), %	4,69 (0,00; 8,36)	9,68 (4,16; 13,74)	12,11# (5,41; 16,98)	5,73 (0,00; 11,83)
Средняя ширина трабекул (TbTh), мкм	85,89 (73,67; 96,61)	61,14 (54,93; 80,09)	77,72 (49,01; 104,86)	51,95 (42,10; 71,07)

1. различия значимы по сравнению со сроком эксперимента 21 сутки в соответствующей группе:

\* -  $p<0,05$ ; \*\* -  $p<0,01$ ; \*\*\* -  $p<0,001$ .

2. различия значимы по сравнению с группой «О» на соответствующем сроке эксперимента:  
# -  $p<0,05$ .

При исследовании недекальцинированных срезов установлено, что через 21 сутки в обеих группах новообразованные трабекулы имели ретикулофиброзное строение. В группе «К» в полости дефекта поверхность трабекул была покрыта

толстым слоем остеоида с включенными в него клетками и активными остеобластами, расположенными в 1-2 ряда. Многочисленные остеокласты, в основном функционально активные, содержащие от 4 до 9 ядер, располагались в межтрабекулярном пространстве, возле поверхности трабекул и в гаушиповых лакунах. Расположенные по краю дефекта трабекулы приобретали пластинчатое строение, их поверхность покрывал тонкий слой остеоида и неактивные остеобласты. В межтрабекулярном пространстве преобладал красный костный мозг. Высокую интенсивность процессов костеобразования и резорбции подтверждают и данные гистоморфометрического анализа. Значения показателей  $OV/BV$ ,  $O.Th.$ ,  $OS/BS$ , отражающих соответственно объем, толщину остеоида, остеоидную поверхность превышали значения нормы [6].

В группе «О» на данном сроке эксперимента были более выражены остеопластические процессы, так же как и у животных группы «К» на поверхности трабекул определялся толстый слой остеоида и активные остеобласты, расположенные в 2-3 ряда. Полости резорбции, напротив, были немногочисленны, в связи с чем показатель  $ES/BS$  (поверхность резорбции) значительно отличался от соответствующего показателя в группе «К».

К 42 суткам эксперимента в обеих группах происходило уменьшение показателей, отражающих интенсивность остеопластических процессов -  $OV/BV$ ,  $O.Th.$ ,  $OS/BS$ . Уменьшалась толщина трабекул, увеличивалось расстояние между ними, межтрабекулярное пространство было заполнено красным и желтым костным мозгом. У животных группы «К» преобладали трабекулы, имеющие пластинчатое строение. В группе «О» в центральной части регенерата продолжалось замещение грубоволокнистой костной ткани пластинчатой. У всех животных наблюдалась адаптивная перестройка новообразованной костной ткани.

На протяжении всего периода наблюдения в полости дефекта у животных обеих групп мы отмечали наличие значительного количества капилляров синусоидного типа, что позволяет предположить присутствие в составе имплантируемых материалов факторов, которые не только оказывают воздействие на остеогенез в полости дефекта, но и стимулируют ангиогенез.

**Заключение.** Таким образом, при гистологическом и гистоморфометрическом исследовании костной ткани регенератов установлено, что степень выраженности остеогенеза на 21 сутки после операции была выше у животных в группе «О», которым имплантировали композиционный материал, содержащий низкомолекулярные неколлагеновые костные белки, не имеющие

средства к ионообменникам. У животных группы «К» отмечалось не только высокая активность процессов костеобразования, но и резорбции, что свидетельствует о начале процессов ремоделирования новообразованной костной ткани, расположенной по краю дефекта. К 42 суткам наблюдали замедление репаративных процессов в обеих группах и продолжение процессов ремоделирования. Учитывая полученные результаты можно сделать следующие выводы: оба материала способствуют восстановлению дефекта, вызывая активацию ангиогенеза, процессов костеобразования и резорбции, при этом на начальных сроках эксперимента биодеградация КИМ и замещение дефекта в группе «К» происходит быстрее, чем в группе «О».

### Список литературы

1. Гайдышев И.П. Решение научных и инженерных задач средствами Excel, VBA и C/C++. - СПб.: БХВ - Петербург, 2004. – 512 с.
2. Десятниченко К.С., Балдин Ю.П., Дьячков А.Н. и др. Выделение и биотестирование костных рострегулирующих факторов: метод. рек. - Курган, 1990. – 24 с.
3. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. - 2003. - № 4. - С. 34-36.
4. Микроскопическая техника : руководство для врачей и лаборантов / под ред. Д. С. Саркисова и Ю. Л. Петрова. - М. : Медицина, 1996. - 544 с.
5. Ревел, П. А. Патология кости / П. А. Ревел. - М. : Медицина, 1993. - 368 с.
6. Риггз, Б. Л. Остеопороз / Б. Л. Риггз, Л. ДЖ. Мелтон. - СПб. : БИНОМ, Невский диалект, 2000. - 560 с.
7. Талашова И.А., Кононович Н.А., Силантьева Т.А. Возмещение дефектов губчатой кости животных // Ветеринария . – 2009. № 8. - С. 51-54.
8. Талашова И.А., Силантьева Т.А. Лабораторное выделение кальцийфосфатных соединений из костной ткани крупного рогатого скота и определение их состава методом электронно-зондового микроанализа // Гений ортопедии. – 2007. - № 4. – С. 71-75.
9. Interspecies differences in bone composition, density, and quality : Potential implications for in vivo bone research / J. Aerssens, S. Boonen, G. Lowert, J. Degueker // Endocrinology. - 1998. – Vol. 139, No 2. - P. 663-670.

10. Sergey V. Dorozhkin Nanodimensional and Nanocrystalline Apatites and Other Calcium Orthophosphates in Biomedical Engineering, Biology and Medicine / Sergey V. Dorozhkin // Materials.-2009.- No.2. - P.1975-2045.

**Рецензенты:**

Дьячков А.Н., д.м.н., главный научный сотрудник ФГБУ «РНЦ «ВТО» имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава России, г. Курган.

Краснов В.В., д.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБУ «РНЦ «ВТО» имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава России, г.Курган.