

Оценка биосовместимости имплантационных кальций-фосфатных материалов в зависимости от их минерального состава

Талашова И.А., Силантьева Т.А., Кононович Н.А., Лунева С.Н.

Evaluation of implant calcium-phosphate materials depending on their mineral content

Talashova I.A., Silantjeva T.A., Kononovich N.A., Luneva S.N.

ФГУ «Российский научный центр „Восстановительная травматология и ортопедия“ им. академика Г.А. Илизарова Минздравсоцразвития», г. Курган

© Талашова И.А., Силантьева Т.А., Кононович Н.А., Лунева С.Н.

В эксперименте на животных оценивали биосовместимость оригинальных имплантационных кальций-фосфатных материалов. Использовались методы рентгеновского электронно-зондового микроанализа (РЭМА), световой и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Исследуемые материалы в разной степени обладали свойствами биодеградации, остеоиндукции и остеокондукции. Материалы, максимально приближенные по своему составу к костной ткани, имели наибольшую степень биосовместимости.

Ключевые слова: имплантация, кальций-фосфатные материалы, биодеградация, остеоиндукция, остеокондукция, биосовместимость.

Biocompatibility of original implant calcium-phosphate materials was evaluated in the experiment on animals. The methods of radiological electron-probe microanalysis (REMA) and light and scan electron microscopy (SEM) were used. Studied materials had the properties of biodegradation, osteoinduction and osteoconduction at different extent. The materials with the composite maximally close to the the bone tissue had the greatest grade of biocompatibility.

Key words: calcium-phosphate materials, biodegradation, osteoinduction, osteoconduction, biocompatibility.

УДК 616-089.843:615.466.015:661.635.41

Введение

В травматологии и ортопедии получает все более широкое распространение замещение посттравматических или пострезекционных дефектов кости посредством имплантации. Исследования специалистов в области медицины, биоматериаловедения и химии направлены на создание материалов, обладающих такими характеристиками, как биодеградация и остеоинтеграция, что отвечает требованиям практической медицины, нуждающейся в материалах для восстановления биологических функций человеческого организма [1]. Широко применяются различные формы кальций-фосфатных материалов, отличающихся по способам получения, форме и величине частиц. Эти материалы обладают уникальными свойствами, способствующими их использованию при замещении

костных дефектов [3].

Задачей настоящего исследования являлась оценка влияния состава оригинальных имплантационных кальций-фосфатных материалов (КФМ) на их биодеградацию и остеоинтеграцию в месте созданного костного дефекта.

Материал и методы

В качестве материалов для имплантации тестировали кальций-фосфатные соединения (КФС), выделенные из диафизов трубчатых костей половозрелых особей крупного рогатого скота по трем различным технологиям [4, 5]:

1) КФС I — с использованием для деминерализации костной ткани 0,5 н раствора HCl, а для осаждения КФС — 52,2%-го раствора NaOH в воде;

2) КФС II — с использованием для деминерализации костной ткани 0,5 н раствора HCl, для осаждения КФС — 52,2%-го раствора NaOH в воде; дополнительно полученное КФС было обработано водным раствором карбамида концентрацией 8 моль;

3) КФС III — с использованием для деминерализации костной ткани 6 н раствора HCl, а для осаждения КФС — 0,12%-го раствора CaO в воде («известковой воды»).

Эксперимент выполнен на 30 взрослых беспородных собаках обоего пола в возрасте от 1 года до 3 лет с массой тела ($8,8 \pm 3,2$) кг. Моделирование конусообразных несквозных дефектов в метафизах плечевых и большеберцовых костей осуществляли посредством выполнения отверстий диаметром 5—7 мм с использованием сверла. Оперативное вмешательство, уход за животными и эвтаназию проводили, руководствуясь требованиями, изложенными в Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (1986). Эвтаназию животных проводили на 21-е и 42-е сут эксперимента.

В опытных группах дефекты заполняли имплантационными материалами, в контрольной группе имплантацию не проводили. Объектами исследования являлись метафизы трубчатых костей в области моделирования дефектов. Эксперимент выполнен на 30 животных (120 конечностей), из них опыт с имплантацией различных композиционных материалов проведен на 22 животных (88 конечностей) — по 11 собак на 21-е и 42-е сут эксперимента, без имплантации — на 8 животных (32 конечности) — по 4 собаки на 21-е и 42-е сут эксперимента.

Для определения элементного состава исследуемых кальций-фосфатных соединений, массовых концентраций кальция, фосфора, магния, серы, хлора применяли метод рентгеновского электронно-зондового микроанализа (РЭМА). Исследования проводили на рентгеновском электронно-зондовом микроанализаторе INKA Energy 200 (Oxford Instruments Analytical, Великобритания), смонтированном на сканирующем электронном микроскопе JSM-840 (JEOL, Япония), при ускоряющем напряжении 20 кэВ.

Для исследования морфологии и минерального состава разработанных материалов были использованы методы световой и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Целлоидиновые срезы, окрашенные ге-

матоксилином и эозином, пикрофуксином по ван Гизону и трихромным методом по Масону, исследовали в световом фотомикроскопе (Opton, Германия). Изображения полей зрения оцифровывали с помощью смонтированного на нем аппаратно-программного комплекса «ДиаМорф» (г. Москва). Гистоморфометрические исследования выполняли с использованием пакета прикладных программ «ВидеоТест-Морфология 4.0» (г. Санкт-Петербург). Для каждого объекта исследовали по 30 полей зрения, отснятых с пяти гистологических препаратов (ув. 125). Калибровку производили по оцифрованному изображению эталона. Количественно оценивали объемную долю губчатой кости в дефекте ($V_{гк}$, %), объемную плотность трабекул в губчатой кости регенерата ($V_{тр}$, %), площадь гранул имплантационного материала ($S_{гр}$, $\mu\text{м}^2$). Среднее значение площади частиц в категории «мелкие» составляло менее 50 тыс., «средние» — 50—150 тыс. и «крупные» — более 150 тыс.

Так как полученные данные не отвечали нормальному распределению, для их обработки были применены методы непараметрической статистики, результаты представлены в виде медиан. Для оценки различия между группами наблюдений использовали *U*-критерий Манна—Уитни [2]. Различия считались статистически значимыми при $p_u < 0,05$. Статистическую обработку выполняли с использованием программы анализа данных AtteStat 10.8.8 (свидетельство № 2002611109 от 28.06.2002).

Результаты

При исследовании морфологии образцов кальций-фосфатных материалов было установлено, что все они представляли собой смесь гранулярного и порошкообразного компонентов. Гранулы имели неправильную форму, размеры их значительно варьировали (рис. 1).

Элементное картирование, произведенное методом РЭМА, выявило равномерное распределение остеотропных элементов в составе порошкообразной и гранулярной частей имплантационного материала. В ходе количественного анализа химических элементов получены результаты, представленные в табл. 1.

Процентные весовые концентрации анализируемых элементов кальция, фосфора и магния в образце КФМ I превышали таковые в нативной костной ткани интактных собак, что было обусловлено элиминацией органи-

ческого компонента. Соотношение концентраций указанных элементов было близким к аналогичным соотношениям, вычисленным для костной ткани. Присутст-

вие серы, по мнению авторов, объяснялось частичным соосаждением белковых компонентов матрикса.

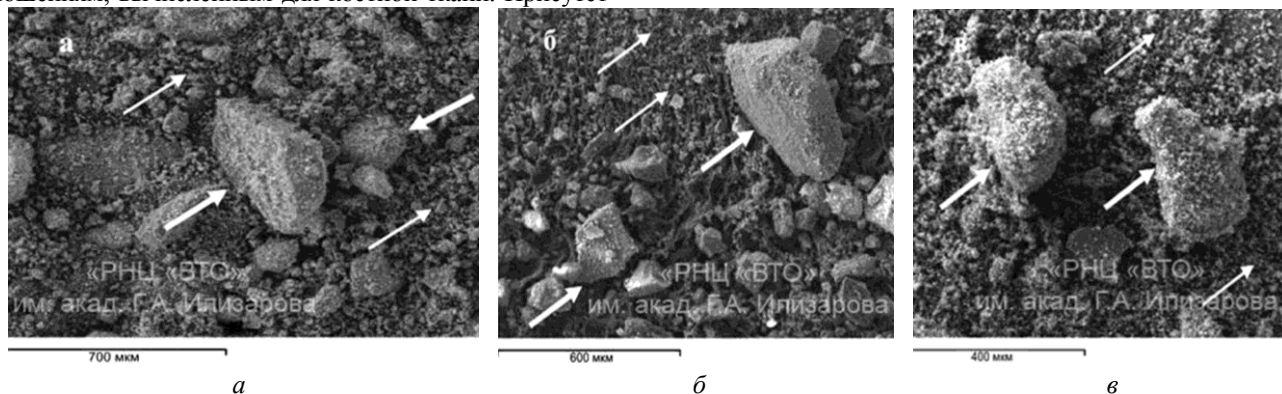


Рис. 1. Структура образцов экспериментальных материалов: *а* — образец КФС I, ув. 70; *б* — образец КФС II, ув. 80; *в* — образец КФС III, ув. 120. Порошкообразный компонент указан тонкими стрелками, гранулярный — толстыми стрелками. Электронные сканограммы

Таблица 1

Содержание минеральных компонентов (весовые %)

Материал	Ca	P	Mg	S	Ca/P
Костная ткань	22,8 ± 0,12	10,5 ± 0,09	0,27 ± 0,040	0,10 ± 0,004	2,17
КФМ I	33,18 ± 0,88	15,71 ± 0,52	0,43 ± 0,07	0,07 ± 0,03	2,11
КФМ II	30,20 ± 0,92	14,72 ± 0,82	0,59 ± 0,11	—	2,05
КФМ III	30,07 ± 0,87	10,25 ± 1,14	0,11 ± 0,03	—	2,93

В образцах КФМ II и КФМ III концентрации кальция и фосфора были ниже, чем в КФМ I. Магний присутствовал в определяемых количествах, сера не выявлялась. Наибольшие отклонения концентрации анализируемых элементов были обнаружены в образце КФМ III.

К 21-м сут после имплантации кальций-фосфатных материалов дно и стенки полости покрывал слой новообразованной губчатой костной ткани с грубоволокнистыми трабекулами и ретикулярным костным мозгом. Большую часть дефекта заполняла рыхлая волокнистая соединительная ткань, обильно васкуляризованная полнокровными синусоидными капиллярами. При вне-

сении КФМ III в составе волокнистой соединительной ткани отмечали большое количество моноцитов и макрофагов, обширные кистозные полости (рис. 2).

Гранулы имплантатов КФМ I и КФМ II располагались одиночно в составе рыхлой волокнистой и губчатой костной ткани. На их поверхности отмечали прикрепленные многоядерные фагоциты. При использовании биокомпозитов, содержащих белки сыворотки крови, наблюдали прилегание капилляров волокнистой и костной тканей к частицам материалов, контакт трабекулярных и гранулярных поверхностей. Имплантат КФМ III обнаруживали в виде скоплений рыхлых гранул и бесструктурного материала, окруженных рыхлой волокнистой соединительной тканью. Сочетание КФМ III и сывороточных белков, по-видимому, увеличивало скорость резорбции имплантата, так как гранулы в составе волокнистой соединительной ткани были единичными (рис. 3). В обоих случаях поверхность новообразованных костных трабекул и гранул экспериментального материала резорбировали многоядерные фагоцитирующие клетки.

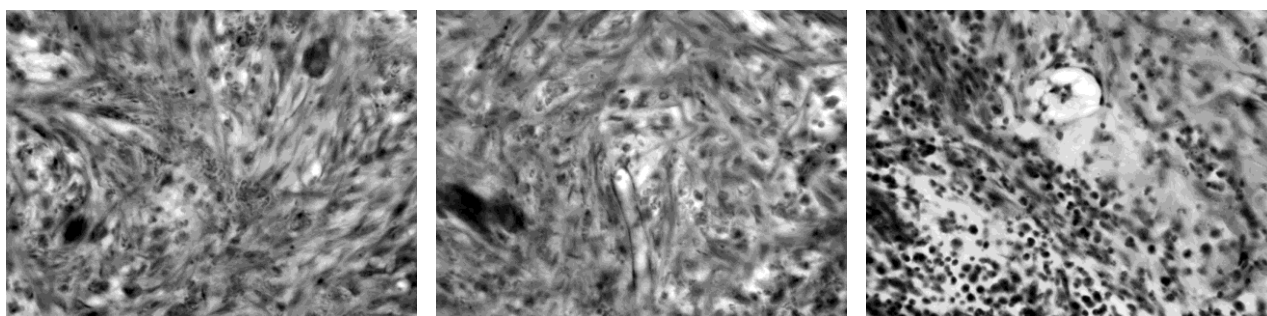


Рис. 2. Рыхлая волокнистая соединительная ткань в области дефекта, заполненного имплантационным материалом, 21-е сут эксперимента: а — КФМ I; б — КФМ II; в — КФМ III

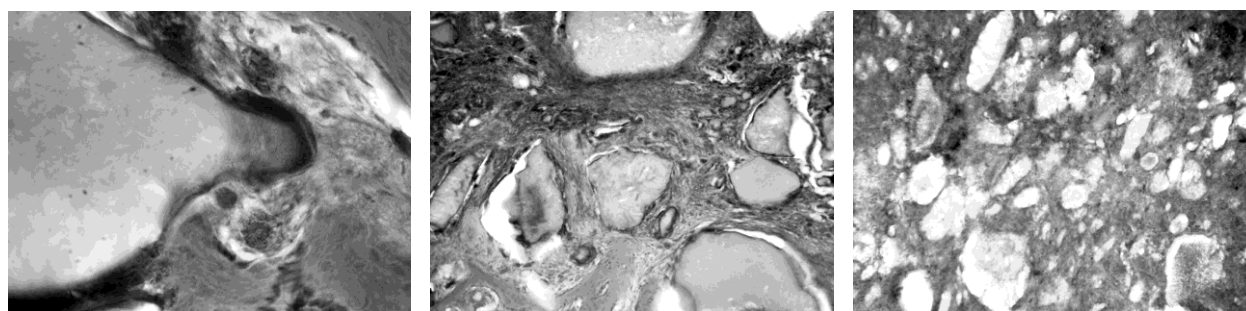


Рис. 3. Гранулы КФМ в области дефекта, 21-е сут эксперимента: а — КФМ I; б — КФМ II; в — КФМ III

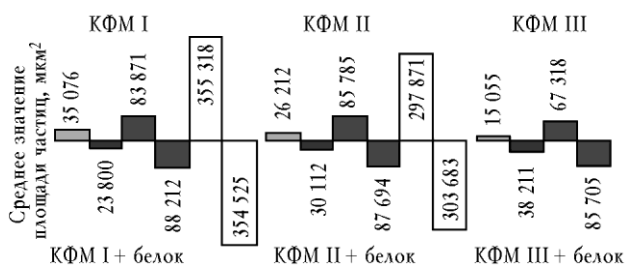
Анализ данных, полученных путем измерения площади профилей частиц имплантатов на изображениях гистологических препаратов, показал следующее. К 21-м сут эксперимента наибольшие средние значения площадей в категориях «мелкие», «средние» и «крупные» были получены для имплантата КФМ I. Средняя площадь крупных частиц материала КФМ II была существенно меньше, мелких и средних — отличалась незначительно. В составе материала КФМ III крупные частицы отсутствовали, а размер гранул в категориях «мелкие» и «средние» был в 1,5—2 раза меньше, чем для прочих имплантатов. Введение сывороточных белков влияло на изменение среднего размера частиц (рис. 4).

■ Менее 50 тыс. мкм² (мелкие) ■ 50—150 тыс. мкм² (средние)
□ Более 150 тыс. мкм² (крупные)

Рис. 4. Средние значения площади частиц имплантатов, 21-е сут эксперимента

Анализ распределения численности гранул имплантационных материалов в зависимости от площади их профилей на гистологических срезах показал, что в КФМ I преобладали частицы крупного и среднего размеров. Материал КФМ II содержал частицы преимущественно среднего и мелкого калибров, в материале КФМ III преобладали мелкие частицы, а крупные отсутствовали.

Введение сывороточных белков в состав имплантата КФМ I, по-видимому, в первую очередь стимулировало равномерную резорбцию всех гранул, а в КФМ II и КФМ III — преимущественно частиц мелкого калибра, что выражалось в снижении их доли в составе имплантатов (рис. 5).



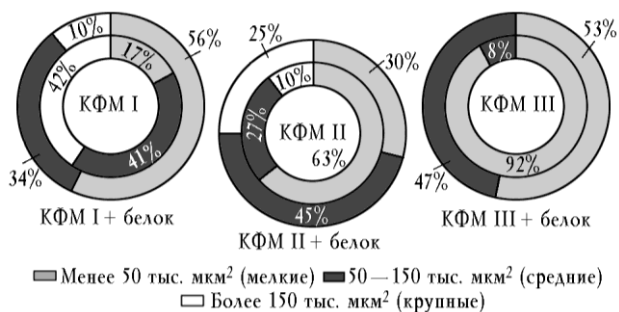


Рис. 5. Доля частиц имплантатов в зависимости от их площади, 21-е сутки эксперимента

Остеоиндуктивные свойства кальций-фосфатных материалов оценивали, измеряя объемную долю губчатой кости в дефекте ($V_{гк}$, %) и объемную плотность трабекул в губчатой кости регенерата ($V_{тр}$, %). Анализ данных выявил, что к 21-м сут эксперимента наиболее высокие показатели были получены с применением препарата КФМ II, причем заполнение дефекта губчатой костной тканью соответствовало таковому в контрольной группе, а объемная плотность костных трабекул превышала контрольный уровень. Применение препаратов КФМ I и КФМ II снижало долю губчатой костной ткани в составе регенерата, объемная плотность костных трабекул не отличалась от контроля. Применение биокомпозитов с сывороточными белками значительно повышало заполнение дефекта губчатой костной тканью во всех экспериментальных группах и влияло на объемную плотность трабекул (табл. 2).

На 42-е сут после введения имплантатов в области дефекта преобладала губчатая костная ткань, в большинстве случаев сохранялись фрагменты рыхлой волокнистой соединительной ткани. Наиболее благоприятная картина наблюдалась при введении КФМ I. Объемная доля костной ткани и объемная доля трабекул губчатой кости были близки к контрольным значениям.

Таблица 2

Морфометрические характеристики новообразованной костной ткани в области дефекта на 21-е сут эксперимента

Показатель	КФМ I	КФМ II	КФМ III
$V_{гк}$	27,6* (20,89; 45,3)	38,9 (29,7; 60,2)	21,8* (12,7; 38,7)

Оценка биосовместимости имплантационных КФМ...

$V_{тр}$	32,6 (31,6; 49,3)	44,3** (37,4; 55,7)	32,2 (20,7; 48,3)
	КФМ I + белок	КФМ II + белок	КФМ III + белок
$V_{гк}$	57,4 (50,4; 62,6)	60,5** (51,3; 68,3)	50,6 (27,9; 59,7)
$V_{тр}$	44,1** (38,6; 45,0)	30,2 (28,4; 55,7)	29,9 (27,5; 34,4)
	Контроль (без имплантации)		
$V_{гк}$	49,9 (42,0; 56,2)		
$V_{тр}$	28,1 (25,4; 37,6)		

Примечание. Здесь и в табл. 3: курсив — границы 95%-го интервала; * — значимое снижение в сравнении с контролем; ** — значимое превышение контрольного значения, $p < 0,05$.

Трабекулярная сеть была сформирована пластинчатой костной тканью, в промежутках располагался красный костный мозг. В группах с применением КФМ II и КФМ III новообразованная губчатая костная ткань в области дефекта подвергалась активной перестройке. Объемная доля губчатой кости в регенерате была значимо снижена, а объемная плотность трабекул увеличена в сравнении с контролем.

Введение в состав имплантатов КФМ I и КФМ II сывороточных белков способствовало значимому увеличению доли губчатой костной ткани в составе регенератов. При использовании КФМ III в сочетании с белками сыворотки крови показатели, напротив, снижались, что отражало активный процесс остеокластической резорбции (табл. 3).

Таблица 3

Морфометрические характеристики новообразованной костной ткани в области дефекта на 42-е сут эксперимента

Показатель	КФМ I	КФМ II	КФМ III
$V_{гк}$	87,2 (57,3; 90,8)	67,4* (59,4; 85,3)	58,0* (24,6; 81,5)
$V_{тр}$	12,7 (9,0; 26,1)	29,0** (26,0; 33,4)	32,2** (20,7; 48,3)
	КФМ I + белок	КФМ II + белок	КФМ III + белок
$V_{гк}$	88,8** (82,3; 93,4)	78,3 (69,0; 84,6)	43,1* (41,2; 60,7)
$V_{тр}$	12,8 (7,0; 20,1)	23,4** (20,8; 25,6)	17,3 (15,2; 24,7)
	Контроль (без имплантации)		
$V_{гк}$	73,5 (53,6; 78,4)		
$V_{тр}$	13,1 (8,3; 15,1)		

Гранулы имплантата КФМ I находились в составе костного вещества либо в плотном контакте с пластинчатыми трабекулами губчатой костной ткани регенерата.

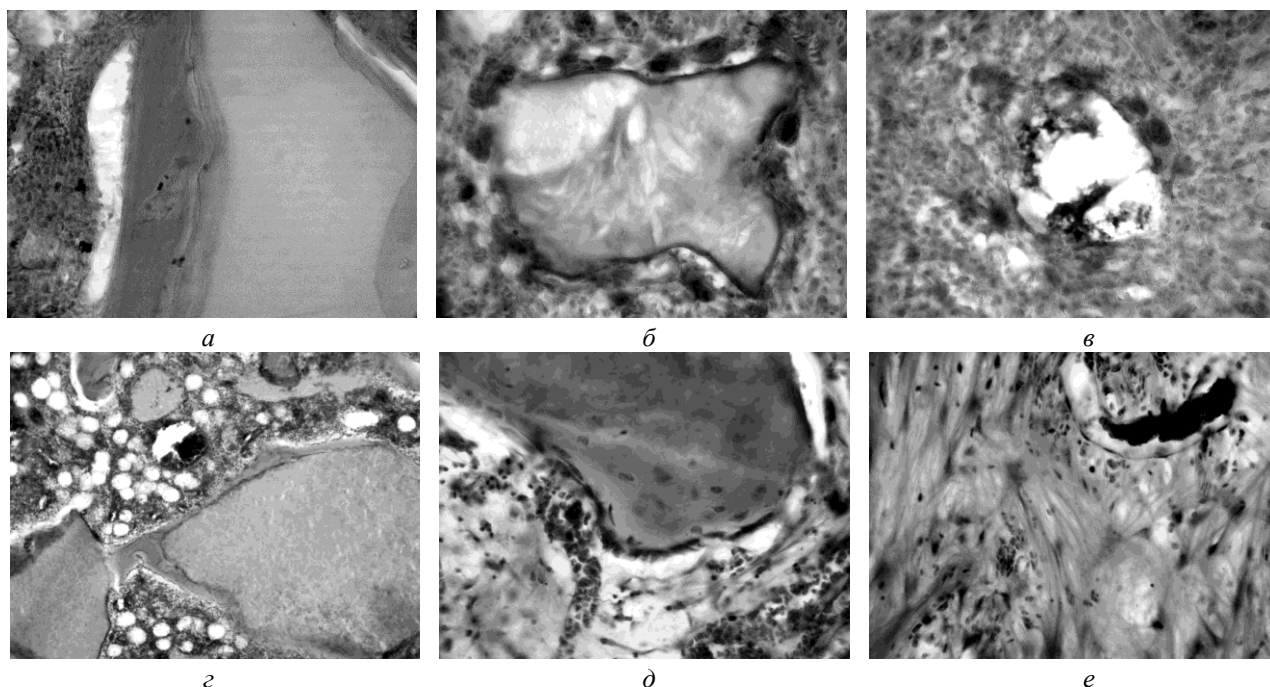


Рис. 6. Гранулы КФМ в области дефекта, 42-е сут эксперимента: а — КФМ I; б — КФМ II; в — КФМ III; г — КФМ I + белок; д — КФМ II + белок; е — КФМ III + белок

Гранулярный компонент материала КФМ II распределялся в костном веществе, межтрабекулярных промежутках и волокнистой соединительной ткани регенерата, свободно лежащие гранулы резорбировались многоядерными фагоцитами. Частицы КФМ III обнаруживались в виде крупных скоплений либо хлопьевидных включений в составе рыхлой волокнистой соединительной ткани, инфильтрованной элементами моноцитарно-макрофагального ряда. Сочетание кальций-фосфатных материалов КФМ I и КФМ II с сывороточными белками обеспечивало повышение остеокондуктивных свойств имплантатов, отмечали контакт гранул с капиллярами костного мозга и волокнистой соединительной ткани. При использовании биокомпозита на основе КФМ III имплантационный материал полностью резорбировался (рис. 6).

Разнонаправленное изменение значений средней площади профилей частиц имплантационных материалов свидетельствовало о продолжающемся процессе резорбции, наиболее выраженном при введении препаратов на основе КФМ III (рис. 7).

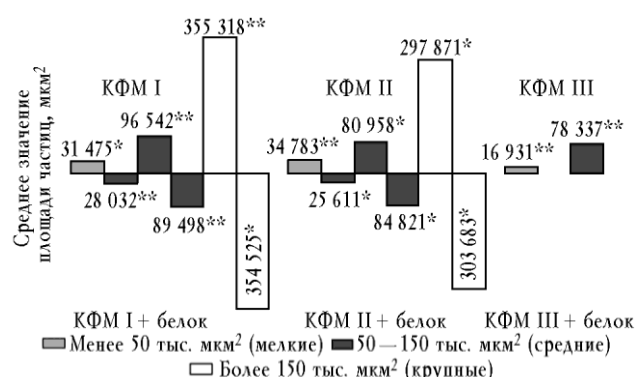


Рис. 7. Средние значения площади частиц имплантатов, 42-е сут эксперимента; * — значимое снижение; ** — значимое повышение в сравнении со значениями, полученными на 21-е сут эксперимента, $p < 0,05$

Близкие значения доли гранул крупного калибра при использовании имплантатов КФМ I и КФМ II отдельно и в сочетании с сывороточными белками отражали тот факт, что в первую очередь резорбции подвергались мелкие и средние гранулы, а более крупные выполняли функцию основы (скаффолдов) для отложения костного вещества. Соотношение долей гранул мелкого и среднего калибров в составе имплантата КФМ III изменялось незначительно, так

как обширные скопления частиц резорбировались лишь в поверхностном слое (рис. 8).

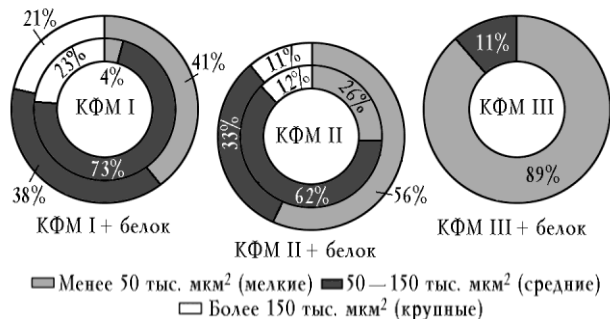


Рис. 8. Доля частиц имплантатов в зависимости от их площади, 42-е сут эксперимента

Обсуждение

Костная ткань человека обладает уникальной способностью регенерировать при повреждении. Имплантируемые в костный дефект материалы должны способствовать дифференцировке недифференцированных мезенхимальных клеток по хондроостеогенному пути. Материалы, индуцирующие этот процесс, являются остеоиндуктивными. Остеоиндуктивные и остеокондуктивные свойства кальций-фосфатных материалов определяются многочисленными физико-химическими и структурными параметрами, такими как размер, форма, порозность, величина пор, химический состав, поверхностная микроструктура биоматериала и др. Увеличение числа микропор и уменьшение размеров кристаллов имплантатов способствует увеличению реактивной поверхности и остеоиндуктивной активности кальций-фосфатных материалов [1, 3].

Проведенное исследование показало, что кальций-фосфатные соединения КФМ I и КФМ II по минеральному составу близки к нативной кости и не препятствуют репаративному остеогенезу. Продукты деградации кальций-фосфатных материалов (ионы кальция и фосфатов) естественно метаболизируются и индуцируют биологические реакции, схожие с таковыми при ремоделировании кости. Применение композиционных материалов, имеющих в своем составе аллогенные сывороточные белки, улучшает характеристики остеоиндуктивности, остеокондуктивности и ускоряет биodeградацию материала. Это можно объяснить тем, что композитные материалы представляют собой комбинацию остеокондуктивного минерального матрикса с биоактивными агентами в

виде сывороточных белков, обеспечивающих остеогенные свойства материалов.

Биокомпозит КФМ III является мелкодисперсным, по количественным характеристикам минерального состава наиболее отличается от нативной кости, вызывает моноцитарно-макрофагальную реакцию и снижает активность репаративного остеогенеза. Введение в его состав аллогенных белков сыворотки крови улучшает характеристики остеоиндуктивности, однако при этом увеличивается темп резорбции как самого материала, так и новообразованной костной ткани.

Заключение

1. Препарат КФМ I по своему минеральному составу наиболее близок к нативной кости, КФМ II — в меньшей и КФМ III — в большей степени отличается от нее.

2. Имплантаты на основе КФМ I и КФМ II проявляют свойства остеоиндуктивности и остеокондуктивности, более выраженные у препарата КФМ I. Резорбция имплантатов осуществляется многоядерными клетками-фагоцитами.

3. Препарат КФМ III в качестве имплантата не обладает свойством остеокондуктивности, активно резорбируется многоядерными фагоцитами и замедляет репаративный остеогенез в сроки до 42-х сут после применения.

4. Введение в состав кальций-фосфатных материалов аллогенных сывороточных белков повышает остеоиндуктивность и скорость биodeградации композитов.

5. По совокупности приведенных характеристик наиболее высокой степенью биосовместимости обладают материалы КФМ I и КФМ II, имеющие состав, приближенный к нативной костной ткани.

Литература

1. *Биосовместимость* / под ред. В.И. Севостьянова. М., 1999. 368 с.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. М.: Практика, 1998. С. 331.
3. Берченко Г.Н. Синтетические кальций-фосфатные материалы в травматологии и ортопедии // Применение искусственных кальциево-фосфатных биоматериалов в травматологии и ортопедии: Сб. работ Всерос. науч.-практ. конф. М., 2010. С. 3—5.
4. Талашова И.А., Силантьева Т.А. Качественный и количественный состав имплантационных кальций-фосфатных материалов // Успехи современного естественного знания (www.rae.ru). 2007. № 11. С. 15—20.
5. Талашова И.А., Силантьева Т.А. Лабораторное выделе-

ние кальцийфосфатных соединений из костной ткани крупного рогатого скота и определение их состава мето-

дом электронно-зондового микроанализа // Гений ортопедии. 2007. № 4. С. 71—75.

Поступила в редакцию 10.08.2011 г.

Утверждена к печати 05.03.2012 г.

Сведения об авторах

И.А. Талашова — канд. биол. наук, клинично-экспериментальный лабораторный отдел РНЦ «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова (г. Курган).

Т.А. Силантьева — канд. биол. наук, клинично-экспериментальный лабораторный отдел РНЦ «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова (г. Курган).

Н.А. Кононович — канд. вет. наук, клинично-экспериментальный лабораторный отдел РНЦ «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова (г. Курган).

С.Н. Лулева — д-р биол. наук, профессор, клинично-экспериментальный лабораторный отдел РНЦ «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова (г. Курган).

Для корреспонденции

Талашова Ирина Александровна, тел.: (3522) 45-05-38; (3522) 43-08-63; +7-909-725-6342; e-mail: i_talashova@mail.ru