

УДК 616.7-07-089

Берченко Г.Н., Кесян Г.А. Уразгильдеев Р.З., Арсеньев ИГ., Микелаишвили Д.С.

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НЕКОТОРЫХ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В
ТРАВМАТОЛОГО-ОРТОПЕДИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫХ
МАТЕРИАЛОВ НА АКТИВИЗАЦИЮ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА
ФГУ ЦИТО им. Н.Н. Приорова (Москва)**

На 170 крысах-самцах проведено сравнительное экспериментально-морфологическое исследование влияния кальций-фосфатных материалов - Хронос, Остим, Коллапан, Церосорб, на активизацию репаративного остеогенеза. Препараты имплантировали в метаэпифизарный дефект большеберцовой кости, материал исследовался на 30, 60 и 90 сутки после операции. Обнаружено, что все изученные материалы способствуют формированию на их поверхности новообразованной кости, однако наиболее выраженная активизация репаративного остеогенеза наблюдается при имплантации Коллапана, в меньшей степени - Остима. β -трикальцийфосфатная керамика Хронос и, особенно, Церосорб медленно замещаются врастающей в их поры костью.

Ключевые слова: репаративный остеогенез, кальций-фосфатные материалы, Коллапан

**COMPARATIVE EXPERIMENTAL-MORPHOLOGIC STUDY OF THE INFLUENCE OF
CALCIUM-PHOSPHATE MATERIALS ON REPARATIVE OSTEOGENESIS ACTIVIZA-
TION IN TRAUMATOLOGY AND ORTHOPAEDICS**

Berchenko G. N., Kesyan G. A., Urazgil'deev R. Z., Arsen'ev I. G., Mikelaishvili D. S

FSI CITO named after N.N. Priorov, Moscow

Comparative experimental-morphologic study of the influence of calcium-phosphate materials, i.e. ChronOs, Ostim, Collapan, Cerosorb, upon the activization of reparative osteogenesis was performed in 170 male rats. Preparations were implanted into metaepiphyseal defect of the tibia. The material was investigated on days 30, 60 and 90 after operation. It was detected that all test materials promoted the formation of new bone; however the most marked activization of reparative osteogenesis was observed at implantation of Collapan and less marked at Ostim implantation. β -tricalcium-phosphate ceramics ChronOs and especially Cerosorb showed delayed substitution by bone growing into their pores.

Key words: reparative osteogenesis, calcium-phosphate materials, Collapan

Пластическое замещение дефектов костной ткани является одной из актуальных проблем современной травматологии и ортопедии. Наиболее часто для заполнения дефектов костной ткани и активизации остеогенеза используются аутотрансплантаты и аллоимплантаты. Однако костная ауто- и аллопластика наряду с очевидными преимуществами имеет и ряд серьезных недостатков (дополнительная операция, риск инфекционных осложнений, возрастные ограничения, сложности в заготовке, хранении, транспортировке трансплантатов и др.).

В последние годы широко применяются для заполнения костных дефектов и активизации остеогенеза различные кальций-фосфатные материалы [3, 8, 15]. Однако отсутствуют работы, посвященные сравнительному изучению используемых в клинике различных кальций-фосфатных материалов.

В настоящем исследовании была поставлена задача провести сравнительное экспериментально-морфологическое изучение некоторых кальций-фосфатных материалов – Хронос, Остим, Коллапан, Церосорб, определить наиболее оптимальный препарат для замещения дефектов костной ткани и активизации репаративного остеогенеза в травматолого-ортопедической практике.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовались следующие кальций-фосфатные материалы: 1) препарат Коллапан - биокomпозиционный материал на основе синтетического гидроксиапатита, коллагена и антибиотика (производится отечественной фирмой «Интермедапатит»); 2) препарат Остим (Ostim) – синтетический гидроксиапатит ультравысокой дисперсности в виде пасты («Osartis», Германия); 3) препарат Хронос

(chronOs) –гранулы β-трикальцийфосфатной керамики («Mathys Medical Ltd» Швейцария); 4) препарат Церосорб (Cerosorb) - гранулы β-трикальцийфосфатной керамики («Curasan», Германия).

В связи с поставленными задачами опыты проведены на 170 животных (лабораторные беспородные крысы – самцы весом 260 ± 20 г), разделённых на 5 групп (в каждой группе по 20 животных). Под внутримышечным наркозом (0,5 мл кетамина) производился разрез кожи и мышц в проекции верхней трети правой голени крысы. Тупым и острым путем обнажались мышелки и верхняя треть большеберцовой кости на уровне проксимальной головки малоберцовой кости. Далее с помощью шаровидной фрезы диаметром 2,5 мм производилась трепанация большеберцовой кости в метаэпифизарной зоне с формированием дефекта диаметром и глубиной до 3,5 мм с обнажением костномозгового канала. В дефект имплантировался исследуемый материал. Далее всем животным производилось послойное ушивание послеоперационной раны наглухо.

В 1-ой контрольной группе животных в костный дефект ничего не вводили; во 2-ой группе в дефект имплантировали гранулы Хронос; в 3-ей - гранулы Церосорб; в 4-ой – пасту Остим, в 5-ой – гранулы КоллапАна. Животных выводили из опыта на 30-е сутки, через 2 и 3 месяца после операции (по 6 животных на каждый срок). Исследуемый материал фиксировали в жидкости Карнуа, декальцинировали в 10% азотной кислоте, депарафинированные срезы окрашивали гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гистологическое исследование материала из области костного дефекта показало следующее:

Через 1 мес. после операции в контрольной группе животных в области костного дефекта определяются элементы первичной костно-хрящевой мозоли. При этом в основном представлены интермедиарная и эндостальная мозоли, тогда как периостальная мозоль почти не развита. Спаяние кортикальной костной пластинки в области дефекта отмечается лишь у отдельных животных с помощью хрящевой ткани, типа гиалинового хряща. У части животных в области интермедиарной мозоли располагается хрящевая ткань впере­мешку с рыхлой соединительной. В области эндостальной мозоли выявляются новообразо-

ванные костные трабекулы, формирующиеся преимущественно энхондральным путем.

Во 2-ой группе животных в области костного дефекта выявляются элементы имплантированной керамики Хронос, при этом внутрь её пор активно врастает рыхлая соединительная ткань. Следует подчеркнуть, что лишь в отдельных участках на поверхности стенок керамики формируются незрелые костные трабекулы, тогда как в основном выявляется лишь рыхлая соединительная ткань (рис. № 1).

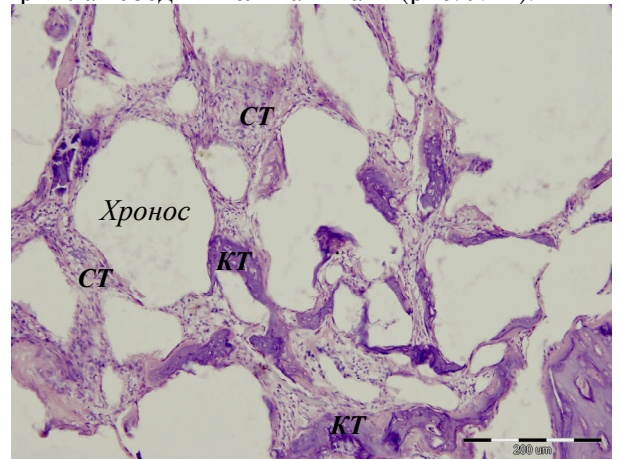


Рис. № 1. Внутри пор керамики Хронос формирование рыхлой соединительной ткани (СТ) и отдельных незрелых костных трабекул (КТ). 2-я группа животных. 30 суток после имплантации. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$.

В 3-ей группе животных область костного дефекта заполнена гранулами керамики Церосорб. Также как и во 2-ой группе животных внутрь пор керамики врастают тяжи рыхлой соединительной ткани. На поверхности керамики, в том числе и внутри пор, формируется рыхлая соединительная ткань, а в отдельных периферических участках – новообразованные трабекулы незрелой кости (рис. № 2).

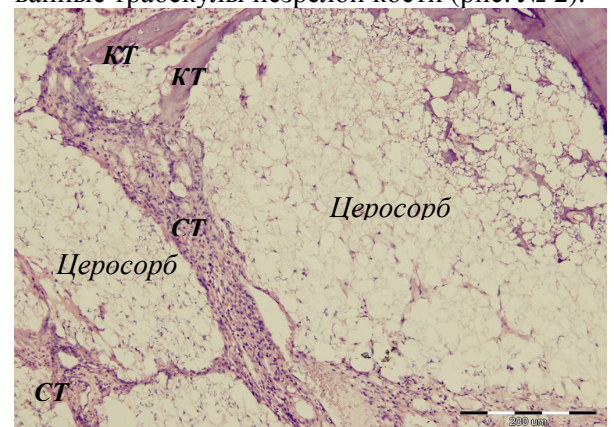


Рис. № 2. На поверхности керамики Церосорб и между отдельными её гранулами формирование рыхлой соединительной ткани (СТ) и отдельных незрелых костных трабекул (КТ). 3-я группа животных. 30 суток после имплантации. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$.

В 4-ой группе животных в области дефекта определяется первичная костная мозоль, соединяющая опилены поврежденной кости. Опилены соединяются интермедиарной мозолью, в которой также как и в эндостальной мозоли определяются различной величины лакуны, заполненные Остимом. Эти лакуны окружены новообразованными тонкими костными трабекулами остеοидного типа (рис. № 3), здесь же определяются элементы кроветворного костного мозга. Новообразованная кость формируется непосредственно на поверхности Остима. В области интермедиарной и эндостальной мозоли формируется большее количество новообразованной костной ткани, по сравнению со 2-ой и 3-ей группами животных.

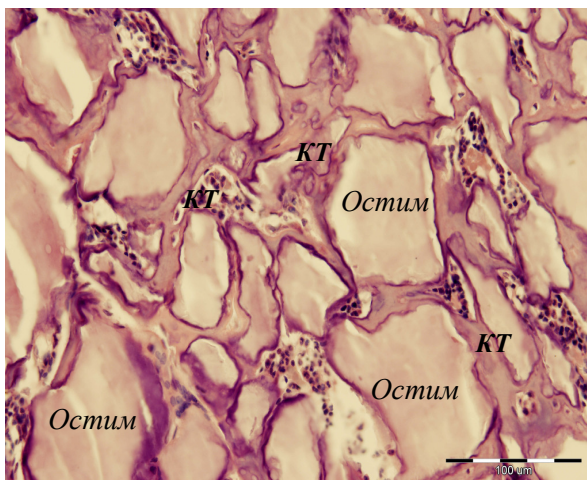


Рис. № 3. В области интермедиарной мозоли видны многочисленные лакуны, заполненные Остимом, на поверхности которого формируются незрелые костные трабекулы (КТ). 4-я группа животных. 30 суток после имплантации. Окраска гематоксилином и эозином. x400.

В 5-ой группе животных в области костного дефекта располагается первичная мозоль, в которой, по сравнению с другими группами, в наибольшей степени преобладают процессы остеогенеза. В области интермедиарной мозоли формируется относительно широкий пласт новообразованной кости, внутри которой определяются постепенно лизируемые частицы КоллапАна (рис. № 4), в межбалочных пространствах – элементы кроветворного костного мозга. В области эндостальной мозоли формируются более многочисленные и массивные костные трабекулы, по сравнению с другими группами животных. Новообразованная кость формируется непосредственно на поверхности гранул КоллапАна, прослоек рыхлой соединительной ткани между ними не выявляется. В области костного дефекта отсутствуют свободно лежащие частицы КоллапАна, на поверхности которых не формируется кость.

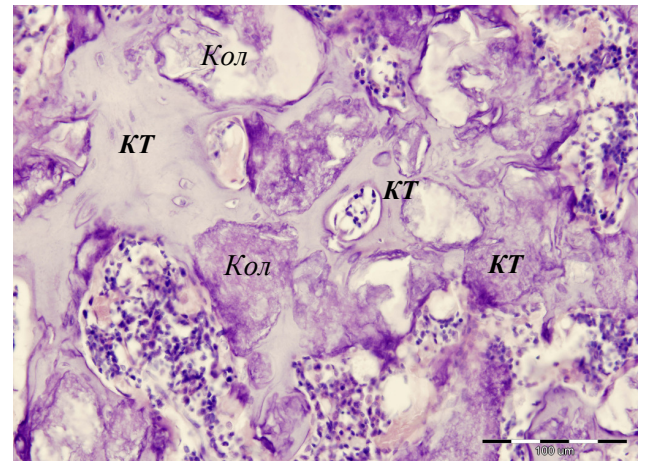


Рис. № 4. В области интермедиарной мозоли пласт новообразованных костных трабекул (КТ), внутри которых определяются частицы КоллапАна (Кол). 5-я группа животных. 30 суток после имплантации. Окраска гематоксилином и эозином. x400.

Через 2 месяца после операции в контрольной группе лишь у отдельных животных наблюдается постепенное «спаивание» опилов кортикальной пластинки, при этом в области интермедиарной мозоли новообразованная кость имеет незрелый характер, о чём свидетельствует слабая выраженность пластинчатого строения, начальные проявления формирования остеонной структуры кости. У части животных по краю дефекта в области кортикальной пластинки и костномозгового канала выявляется замыкательная пластинка, формирующаяся за счёт интерпозиции в область дефекта прилежащих мягких тканей.

Во 2-ой и 3-ей группах животных в области интермедиарной и эндостальной мозоли выявляются элементы имплантированной керамики Хронос и Церосорб, соответственно. Вокруг имплантатов определяется слой костной ткани, имеющей пластинчатое строение. В периферических участках имплантатов наблюдается врастание в поры керамики сосудов, элементов кроветворного костного мозга, с формированием на стенках пор керамики тонких костных трабекул. По сравнению с предыдущим сроком исследования значительно реже обнаруживаются прослойки рыхлой соединительной ткани на поверхности и внутри пор керамики. Следует отметить, что более активное врастание сосудов и заполнение элементами кроветворного и жирового костного мозга периферических отделов имплантатов наблюдается при использовании керамики Хронос, что, очевидно, объясняется наличием в этой керамике более крупных пор.

В 4-ой и, особенно, 5-ой группах животных в области интермедиарной мозоли увеличивается объём новообразованной костной

массы, при этом можно видеть постепенное образование остеонов, признаки пластинчатого строения кости. При использовании пасты Остим сохраняются крупные фрагменты имплантированного материала, на поверхности которого располагаются тонкие трабекулы новообразованной кости. В области эндостальной мозоли увеличивается количество, объём и степень зрелости костных трабекул, при этом наибольший прирост новообразованной костной массы определяется при имплантации КоллапАна. Свободно лежащих элементов КоллапАна или Остима, не связанных с процессами остеогенеза, не обнаруживается.

Через 3 месяца после операции в 1-ой контрольной группе у отдельных животных наблюдается «спаивание» опилов кортикальной пластинки. Интермедиарная мозоль замещается костью, приобретающей пластинчатое строение. В области эндостальной мозоли в некоторых случаях отмечается исчезновение замыкательной пластинки и восстановление просвета костномозгового канала. В результате ремоделирования кости наблюдается некоторое уменьшение числа костных трабекул. Между последними располагаются элементы кроветворного и жирового костного мозга. У части животных замыкательная пластинка сохраняется.

Во 2-ой и 3-ей группах животных в области интермедиарной и эндостальной мозоли наблюдается дальнейшее медленное замещение β -трикальцийфосфатной керамики новообразованной костью. При этом внутри пор Хроноса определяются более многочисленные костные трабекулы (рис. № 5), по сравнению с Церосорбом (рис. № 6).

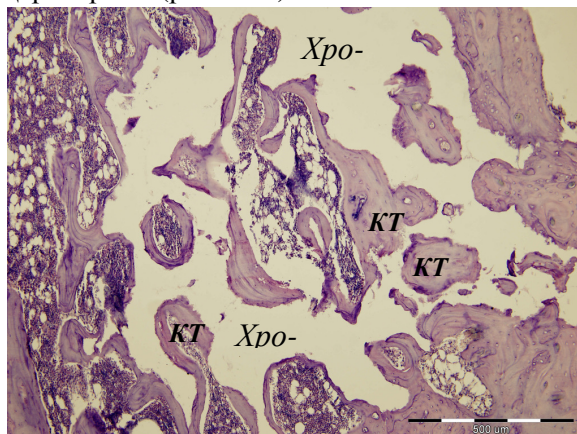


Рис. № 5. Формирование внутри пор керамики Хронос новообразованных костных трабекул (КТ) и элементов костного мозга. 2-я группа животных. 90 суток после имплантации. Окраска гематоксилином и эозином. x 100.

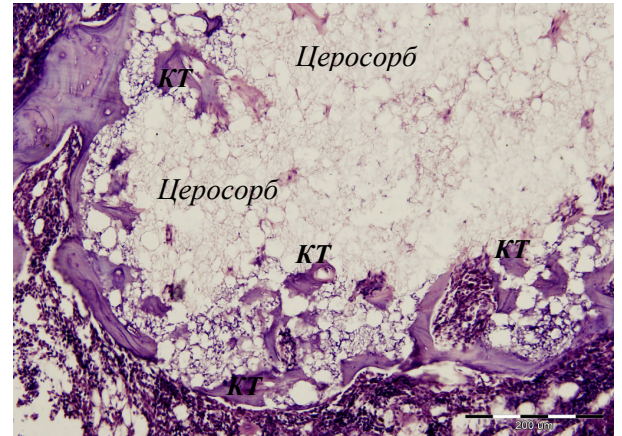


Рис. № 6. Формирование внутри пор краевых участков керамики Церосорб новообразованных костных трабекул (КТ). 3-я группа животных. 90 суток после имплантации. Окраска гематоксилином и эозином. x 200

Наиболее активно репаративный остеогенез развивается в 5-ой группе животных, что проявляется в формировании наибольшего объёма новообразованной костной массы. Если в 4-ой группе в новообразованной кости сохраняются крупные лакуны, заполненные Остимом (рис. № 7), что, по-видимому, тормозит созревание кости, то в 5-ой группе новообразованная кость имеет более зрелый характер, о чём свидетельствует более выраженное пластинчатое строение, формирование остеонов (рис. № 8), при этом в области дефекта определяются лишь отдельные мелкие частицы лизируемого КоллапАна.

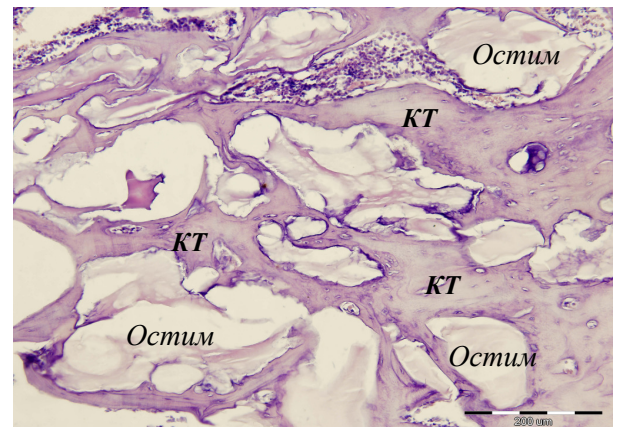


Рис. № 7. В области интермедиарной мозоли между костными трабекулами (КТ) сохраняются крупные лакуны, заполненные Остимом. 4-я группа животных. 90 суток после имплантации. Окраска гематоксилином и эозином. x200.

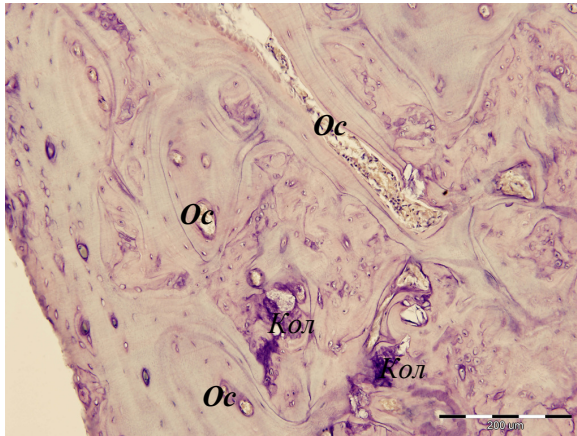


Рис. № 8. В области интермедиарной мозоли зрелый костный массив, в котором формируются остеоны (Ос). Сохраняются отдельные мелкие частицы Коллагена (Кол). 5-я группа животных. 90 суток после имплантации. Окраска гематоксилином и эозином. x200.

Следует отметить, что на всех сроках исследования растворение исследуемых кальций-фосфатных материалов происходит без видимого участия гистиоцитов и многоядерных остеокластоподобных клеток. На поверхности имплантатов оссификация происходит лишь интрамембранозным путём. Признаков воспалительной реакции, вызванной имплантированными материалами, не наблюдалось. Имплантируемые кальций-фосфатные материалы предотвращают прорастание в область костного дефекта рыхлой соединительной ткани и формирование замыкательной пластинки.

ДИСКУССИЯ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Костные трансплантаты широко используются для активизации репаративной регенерации кости при травмах, после резекции опухолей, с целью формирования спондилодеза. Их подразделяют в основном на ауто-трансплантаты, аллоимплантаты и синтетические материалы и их комбинации. Губчатая аутокость остаётся «золотым стандартом» для костных трансплантатов, так как обладает остеогенными (содержит живые клетки, способные дифференцироваться в остеобласты), остеоиндуктивными (выделяет биологически активные вещества, способствующие дифференцировке клеток ложа реципиента в остеобласты) и остеокондуктивными (вызывает аппозиционное формирование кости на её поверхности) свойствами [1]. Отрицательными сторонами использования ауто-трансплантатов являются: проведение дополнительного оперативного вмешательства и увеличение времени операции, ограниченная пригодность ауто-трансплантата по форме, размерам и количеству необходимого материала, особенно у детей и при наличии больших костных дефектов.

Выявляются вторичные осложнения в виде: развития тяжёлых болей в области забора ауто-трансплантата, инфекционного процесса, повреждений сосудов и нервов, формирования больших костных дефектов, увеличения времени нетрудоспособности и др. [6, 7, 9].

При невозможности использования аутокости, в качестве альтернативы применяют аллоимплантаты. Последние обладают механической прочностью, остеокондуктивными и ограниченными остеоиндуктивными (только губчатая кость) свойствами [9]. Однако использование аллоимплантатов сопряжено с риском передачи инфекции, развития реакции гистонесовместимости и хронического воспаления [10, 14]. С целью уменьшения риска проводится более жёсткая обработка аллоимплантатов, что значительно уменьшает их механическую прочность и биологическую (остеоиндуктивные свойства) активность [13].

Кальций-фосфатные материалы (гидроксиапатит, трикальцийфосфат), широко используемые в клинической практике уже несколько десятилетий в качестве заменителей ауто- и аллокости, относятся к биоактивным материалам, способствующим образованию на их поверхности новообразованной кости и формированию с последней прочных химических связей. Эти биоматериалы способствуют прикреплению, пролиферации, миграции и фенотипической экспрессии костных клеток, что приводит к аппозиционному росту кости на поверхности имплантата. Синтетический гидроксиапатит является идеальным материалом для использования в тканевой инженерии в качестве матрицы для иммобилизации различных биологически активных веществ [2, 7]. Недостатком большинства этих материалов является слабая механическая прочность и, как принято считать, отсутствие остеоиндуктивных свойств. Однако в ряде работ на модели гетеротопической имплантации гидроксиапатита показано, что некоторые кальций-фосфатные материалы обладают остеоиндуктивными свойствами [10, 11], которые в значительной степени определяются геометрической характеристикой материала. Также хорошо известно, что выраженность активизации остеогенеза зависит от многочисленных характеристик биоматериала, таких как размер, форма, порозность, химический состав, поверхностная микроструктура и др. [12].

Исследование показало, что изученные материалы являются биосовместимыми и резорбируемыми матрицами, на поверхности

которых формируется новообразованная кость. Наиболее быстрое формирование и ремоделирование костной мозоли происходит при имплантации КоллапАна. Имплантация Остима сопровождается более медленными резорбцией имплантата и созреванием костной мозоли. β -трикальцийфосфатная керамика, подвергается более длительной резорбции с одновременным замещением новообразованной костью. Этот процесс протекает более длительно при имплантации Церосорба, что, по-видимому, объясняется наличием в нём более мелких пор, по сравнению с Хронос. Кальций-фосфатные материалы могут использоваться для направленной тканевой регенерации, так как предотвращают врастание в область костного дефекта рыхлой соединительной ткани и формирование замыкательной пластинки.

Положительный эффект влияния КоллапАна на индукцию остеогенеза можно объяснить следующим образом [2]:

1) входящий в состав КоллапАна экзогенный коллаген является хематтрактантом для эндотелиоцитов и мезенхимальных клеток-предшественников остеобластов;

2) растворение синтетического гидроксиапатита сопровождается высвобождением ионов Ca^{2+} и PO_4^{3-} , их обменом с ионами тканевой жидкости с последующей преципитацией и формированием слоя биологического гидроксиапатита на поверхности имплантата;

3) продукты растворения КоллапАна и биоактивные молекулы тканевой жидкости - фибронектин, ламинин, остеопоптин и эндогенные костные морфогенетические и остеогенные белки, являющиеся остеоиндуктивными растворимыми сигналами, адсорбируются на поверхности КоллапАна и опосредуют хемотаксис, прикрепление к имплантату и дифференцировку клеток ложа реципиента (мезенхимальные клетки) в остеобласты;

4) связанные с коллагеном антибиотики постепенно (к 18-20 суткам активность антибиотиков составляет менее 50% от исходной) выделяются из КоллапАна [3, 5], способствуя подавлению инфекции и оптимизируя условия развития репаративного остеогенеза.

КоллапАн может использоваться в качестве матрицы для иммобилизации и средства доставки в очаг поражения различных лекарственных средств, клеточных элементов, ростовых факторов и цитокинов, способствующих подавлению патологического процесса и стимуляции репаративного остеогенеза.

Проведенное экспериментально-морфологическое исследование послужило обоснованием использования КоллапАна, с целью стимуляции репаративного остеогенеза и предотвращения развития инфекции [4], в комплексном лечении 149 пациентов с оскольчатыми переломами длинных трубчатых костей и 93 пациентов с замедленно срастающимися переломами и ложными суставами. При этом в 99,2% случаев констатирована консолидация переломов, развитие нагноительного процесса и несращение наблюдалось лишь в двух случаях (0,8%). Тогда как при традиционных методах лечения переломы длинных костей в процессе лечения осложняются несращениями и развитием ложных суставов в 5% - 10% случаев.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берченко Г.Н. Заболевания костно-суставной системы. В кн.: «Патология (руководство)». Под редакцией Пальцева М.А., Паукова В.С., Улумбекова Э.Г. Издательский дом Гэотар-Мед. М., 2002. С. 565-597.
2. Берченко Г.Н. Биоактивные кальций-фосфатные материалы (КФМ) и стимуляция репаративного остеогенеза. Сборник тезисов «Биоимплантология на пороге XXI века.». Симпозиум по проблемам тканевых банков с международным участием. М., 2001. С. 37-38.
3. Бушуев О.М. Использование Коллапана в комплексном лечении хронического остеомиелита: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Москва, 1999. - 21 с.
4. Кесян Г.А., Уразгильдеев Р.З., Берченко Г.Н., Арсеньев И.Г.. Дюрантный препарат на основе гидроксиапатита в комплексном лечении оскольчатых переломов длинных трубчатых костей. Международная конференция, посвященная 80-летию со дня рождения академика О.Н. Гудушаури. В кн.: «FROM UNCOMMON CASES TO GLOBAL ISSUES». Tbilisi, 2005. P. 42-3.
5. Уразгильдеев З.И., Бушуев О.М., Берченко Г.Н. Применение Коллапана для пластики остеомиелитических дефектов костей. Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. 1998. № 2 С. 31-35.
6. Wojescul J.A., Polly D.W., Kuklo T.R., Allen N. T.W., Wieand K.E. Backfill for iliac-crest donor sites: a prospective, ran-

- domized study of coralline hydroxyapatite. American J. Orthopedics. 2005. V. 34, № 8. P. 377-382.
7. Mangano C., Bartolucci E.G., Mazzocco C.. A new porous hydroxyapatite for promotion of bone regeneration in maxillary sinus augmentation: clinical and histologic study in humans. Int. J. Oral Maxillofac. Implants. 2003. V. 18. P. 23-30.
 8. Muschik M., Ludwig R., Haldhubner S., Bursche K., Stoll T.. Beta-tricalcium phosphate as a bone substitute for dorsal spinal fusion in adolescent idiopathic scoliosis: preliminary results of a prospective clinical study. Eur. Spine J. 2001. V. 10. Suppl 2. S. 178-184.
 10. Parikh S.N.. Bone graft substitutes: past, present, future. J. Postgraduate Medicine. 2002. V.48, № 2. P. 142-148.
 11. Qu S.X., Guo X., Weng J., Cheng J.C.Y., Feng B., Yeung H.Y. Zhang X.D. Evaluation of the expression of collagen type I in porous calcium phosphate ceramics implanted in an extra-osseous site. Biomaterials. 2004. V. 25. P 659-667.
 12. Ripamonti U., Herbst N., Ramoshebi N. Bone morphogenetic proteins in craniofacial and periodontal tissue engineering: experimental studies in the non-human primate *Papio ursinus*. Cytok. Growth Factor Rev.. 2005. V 16. P. 357-368.
 13. Schopper C., Ziya-Ghazvini F., Goriwoda W., Moser D., Wanschitz F. HA/TCP compounding of a porous CaP biomaterial improves bone formation and scaffold degradation – a long-term histological study. J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater. 2005. V. 74B. P. 458-467.
 14. Szpalski M., Gunzburg R.. Recombinant human bone morphogenetic protein-2: a novel osteoinductive alternative to autogenous bone graft? Acta Orphop. Belg.. 2005. V.71. P. 133-148.
 15. Trotter J.F. Transmission of hepatitis C by implantation of a processed bone graft. A case report. J. Bone Joint Surg.. 2003. V. 85-A. P. 2215-2217.
 16. Zijdeveld S.A., Zerbo I.R., van den Bergh J.P., Schulten E.A., ten Bruggenkate C.M.. Maxillary sinus floor augmentation using a beta-tricalcium phosphate (Cerasorb) alone compared to autogenous bone grafts. Int J Oral Maxillofac Implants. 2005. V. 20, № 3. P. 432-40.