

ОЦЕНКА БИОСОВМЕСТИМОСТИ И БИОРЕЗОРБИРУЕМОСТИ кальций-фосфатного материала для восстановления дефектов костной ткани — “Клидент-цем”.

Часть II. Доклинические исследования

В.Ф.Посохова

• к.х.н., начальник центральной заводской лаборатории, ЗАО “ВладМиВа”
Адрес: 308023, г. Белгород, ул. Студенческая, д. 19, ЗАО “ВладМиВа”
Тел.: 8 (4722) 34-56-85, доб. 164
E-mail: posohova_vera@mail.ru

В.В.Чуев

• к.м.н., ассистент кафедры стоматологии, БелГУ, главный врач “Стоматологического Центра “ВладМиВа”
Адрес: 308023, г. Белгород, ул. Садовая, д. 118, ООО “СЦ “ВладМиВа”
Тел.: 8 (4722) 31-35-00
E-mail: stomat@vladmiva.ru

В.А.Шатерникова

• лаборант кафедры медико-технических систем, БелГУ
Адрес: 308023, г. Белгород, ул. Студенческая, д. 19, ЗАО “ВладМиВа”
Тел.: 8 (4722) 34-56-85, доб. 120
E-mail: viktoriya-ryushi@mail.ru

А.А.Бузов

• к.т.н., технический директор, ЗАО “ВладМиВа”
Адрес: 308023, г. Белгород, ул. Студенческая, д. 19, ЗАО “ВладМиВа”
Тел.: (4722) 200-999, доб. 115
E-mail: buzov@mail.ru

С.В.Надеждин

• к.б.н., доцент кафедры анатомии и физиологии живых организмов, НИУ БелГУ, рук. сектора экспериментальной физиологии, НИЛ “Физиология адаптационных процессов”
Адрес: 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85
Тел.: (4722) 30-11-60
E-mail: nadezhdin@bsu.edu.ru

М.З.Федорова

• д.б.н., профессор, зав. кафедрой анатомии и физиологии живых организмов, НИУ БелГУ, зав. НИЛ “Физиология адаптационных процессов”
Адрес: 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85
Тел.: (4722) 30-11-63
E-mail: fedorova@bsu.edu.ru

В.П.Чуев

• д.т.н., Генеральный директор ЗАО “ВладМиВа”
Адрес: 308023, г. Белгород, ул. Студенческая, д. 19, ЗАО “ВладМиВа”
Тел.: 8 (4722) 34-56-85
E-mail: chuev@vladmiva.ru

Резюме. Проведена оценка способности образцов из брушитового цемента биодеградировать в окружающих тканях и поддерживать гистотипическую дифференцировку клеток при добавлении и без морфогенетического белка rhBMP-2. Установлено, что все имплантированные образцы брушита являются биосовместимыми и не вызывают дегенеративных изменений в окружающих соединительных и мышечных тканях. Полная биорезорбция цемента отмечается при добавлении морфогенетического белка rhBMP-2 (образцы №1), происходит увеличение процессов регенерации в зоне дефекта, по сравнению с опытными группами, которым были имплантированы образцы №2. Скорость резорбции цемента образцов №1 выше скорости резорбции цемента образцов №2.

Ключевые слова: биосовместимость, биорезорбируемость, брушитный цемент, имплантация, регенерация тканей.

Summary. The characterization of the ability of the brushite cement samples to biodegrade in the surrounding tissues and promote histotypic cell differentiation at the pressure and without of morphogenetic protein rhBMP-2 was passed. It was established that all the implanted brushite samples are biocompatible and do not cause degenerative changes in the surrounding connective tissues and muscle. Full cement bioresorption observed by adding morphogenetic protein rhBMP-2 (samples number 1), an increase of regeneration in the area of the defect, as compared with the experimental groups, which were implanted samples number 2. The speed of resorption of the cement samples number 1 higher than the speed of resorption of the cement samples number 2.

Key word: biocompatibility, bioresorbility, brushite cement, implantation, tissue regeneration.

Известно, что брушитовый цемент (конечная фаза – дигидрат дикальцийфосфата $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$) является остеокондуктивным материалом. Он не оказывает прямого стимулирующего влияния на остеогенез, но способствует направленному росту костной ткани, выступая в роли биорезорбируемого матрикса. Его высокая скорость растворения обеспечивает синхронность процесса резорбции и образования костного регенерата с последующим прорастанием костной ткани в имплантированный материал [1, 2]. К брушитовому цементу могут быть добавлены антибиотики и костные морфогенетические белки (BMP), при наличии которых цемент приобретает остеиндуктивность. Эти костные белки вызывают ускоренное дифференцирование мезенхимальных стволовых клеток в хондробласты и остеобласты, стимулируют ускоренное формирование

костной ткани в месте перелома и дефектах кости значительного размера [3, 4].

Целью проведенного исследования была оценка способности образцов из брушитового цемента биодеградировать в окружающих тканях и поддерживать гистотипическую дифференцировку клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Настоящее исследование выполнено в двух сериях: в первой серии животным инокулировали брушитовый цемент под кожу (исследование выполнено в НИУ “БелГУ” НИЛ “Физиология адаптационных процессов”, г. Белгород), во второй серии была применена модель эктопического остеогенеза (работа проведена в лаборатории патологической анатомии ЦИТО им. Н.Н.Приорова Росмедтехнологий, г. Москва).

Все экспериментальные исследования были проведены с использованием беспородных лабораторных белых крыс в соответствии с международными требованиями [5].

В первой серии был применен метод “Подкожной инокуляции” согласно требованиям ГОСТа Р ИСО 10993-6-2009 “Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследования местного действия после имплантации”. Исследование проводили на крысах-самцах линии “Vistar” весом от 200 до 250 г. Для наркоза использовали ингаляцию паров диэтилового эфира. Остеопластический материал — брушитовый цемент ($\beta-Ca_3(PO_4)_2/Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$) в виде крошки диаметром до 1 мм — инокулировали в прослойку соединительной ткани, расположенную на спине подопытного животного (опытная группа). После проведения анестезии и обработки участка антисептическим раствором разрешили кожу подопытного животного, тупым рассечением делали один карман шириной 2 мм и глубиной 4 мм. В карман помещали один из образцов исследуемого материала, рану обрабатывали спиртовым раствором специальной синтетической фенолформальдегидной смолы, поливинил бутирола и канифоли с добавлением пластификатора. В группе контроля оперативное вмешательство и все манипуляции осуществляли по схеме, используемой в работе с опытными группами, но образцы материалов не имплантировали. Оценку биологического действия материалов проводили через 7 дней после операции. После истечения установленного срока эксперимента макро- и микроскопически оценивали реакцию соединительных тканей на имплантацию стоматологических материалов. Степень реакции определяли измерением расстояния от поверхности соприкосновения им-



плантата с тканью до участков, имеющих характеристики интактной ткани с нормальным кровообращением. После макроскопического исследования проводили резекцию соединительной ткани зоны дефекта с имплантированным материалом. Гистологические препараты соединительных тканей зоны дефекта готовили общепринятыми методами. Оценивали следующие параметры: степень фиброза и воспаления, дегенерацию окружающих тканей, наличие некроза, степень интеграции материала имплантата с соединительной тканью инокуляционной зоны. Объем регенераторного процесса (в %) определяли при помощи сетки со 100 точками (81 квадрат = 100%), вставленной в окуляр стереомикроскопа Leica EZ4D [6]. Гистологические препараты, окрашенные гематоксилин-эозином, изучали при помощи аппаратно-программного комплекса Видео-Тест-Размер (микроскоп Axioplan plus фирмы Zeiss).

Во второй серии исследований использовали образцы двух видов: образец №1 $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} = 60/40$, Ж/Т = 0,77 и образец №2 $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} = 60/40$, Ж/Т = 0,32.

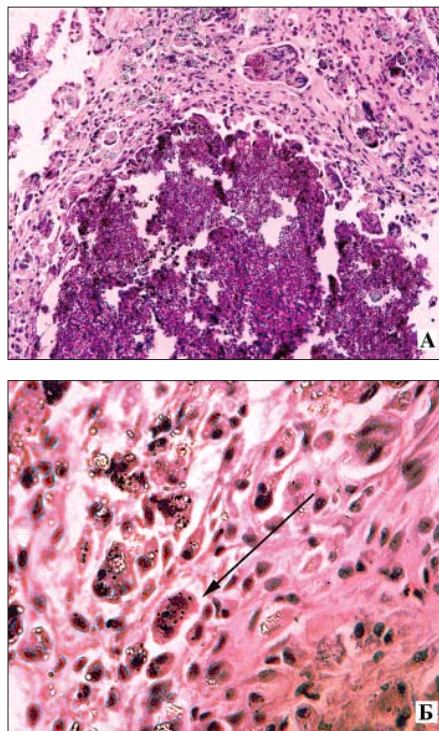
Для оценки эктопического остеогенеза (вторая серия) было сформировано 10 экспериментальных групп животных: с 1 по 6 группы инокулировали блоки на основе образца №1, с 7 по 10 группы внедряли блоки на основе образца №2. Часть образцов для инокуляции смачивали в воде (1, 2 и 7, 8 группы), в 6% растворе поливинилового спирта (3, 4 и 9, 10 группы) и в 0,5% растворе коллагена (5, 6 группы). В качестве остеоиндуктора использовали рекомбинантный морфогенетический белок (rhBMP-2), полученный с помощью методов геной инженерии (Лаборатория биологически активных наноструктур "НИИ Эпидемиологии и Микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи" РАМН, г. Москва). В экспериментах использовали половозрелых самцов крысы линии "Vistar" весом от 150 до 200 г. В качестве наркоза использовали ингаляцию паров диэтилового эфира. Цементные блоки брушита помещали в сформированный мышечный карман, рану послойно ушивали. После истечения 30 суток фрагмент изучаемого материала резецировали вместе с прилежащим участком мышечной ткани. Макро- и микроскопически оценивали наличие асептического воспаления, ангиогенез в зоне имплантации. Гистологические шлиф-срезы толщиной 10 мкм окрашивали гематоксилином и эозином по Ван-Гизону. Оценку гистологических срезов проводили в светооптическом микроскопе "Olympus BX 51".

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе исследований при инокуляции брушита под кожу животным (первая серия) было установлено, что в зоне повреждения у всех экспериментальных групп отсутствуют внешние признаки местной асептической воспалительной реакции. Так, в группе контроля нижележащие под кожей слои были без признаков дегенерации. Вазуляризация тканей была умеренная, капилляры и мелкие сосуды полнокровны, пронизывают все соединительнотканые слои до поперечнополосатых мышц. В соединительнотканном

регенерате преобладают зрелые фибробласты над другими клеточными элементами; паренхима представлена волокнистыми структурами с продольной ориентацией. Степень реакции ткани на оперативное вмешательство была слабой и составляла менее 0,5 мм. Объем регенеративного процесса составил 10% площади зоны дефекта.

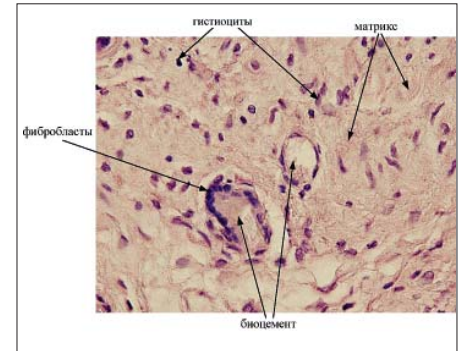
При изучении кожного лоскута зоны дефекта, выделенного у животных опытной группы, было выявлено наличие соединительнотканной капсулы. Капсула имеет толстую стенку и плотную консистенцию, повторяет контуры инокулированного материала. Паренхима и ложе капсулы имеют обильную васкуляризацию. Степень реакции ткани на инокуляцию материала на основе кальций-фосфатного цемента была умеренной и составляла 1,5 мм. Объем регенеративного процесса составил 60% площади зоны дефекта. Паренхима капсулы и подлежащие слои образованы преимущественно волокнами рыхлой волокнистой соединительной ткани. В соединительнотканном регенерате над волокнистыми структурами преобладают макрофаги и фибробласты. Часть макрофагов содержит в цитоплазме частицы кальций-фосфатного цемента (рис. 1).



■Рис. 1. Остеопластический материал, окруженный волокнами рыхлой волокнистой соединительной ткани (А). Макрофаги (стрелка), содержащие частицы кальций-фосфатного цемента (Б)

Анализ результатов, полученных при помощи модели эктопического остеогенеза (вторая серия), также показал отсутствие воспалительной реакции в зоне дефекта во всех экспериментальных группах. В 1, 3, 5, 7, 9 группах, в которых инокулировали цементные блоки образцов №1 и №2 без остеоиндуктора — rhBMP-2, отмечалось инкапсулирование материала. При смачивании блоков №1 водой выявлены признаки растворения цемента. Соединительнотканная капсула плотная, её волокна прорастают в пористую структуру

цементных блоков, выражен ангиогенез. При пропитке блоков цемента rhBMP-2 установлена биодеградация только образцов №1. Оставшиеся в зоне дефекта конгломераты брушита покрыты тонкой прослойкой соединительной ткани. Вокруг блоков цемента соединительнотканная матрикс содержит фибробласты и гистиоциты (рис. 2).



■Рис. 2. Фрагмент соединительнотканной капсулы, содержащей конгломераты брушита

Макроскопическое исследование зоны дефекта в группах 7, 8, 9, 10 показало, что цементные блоки образцов №2 без признаков биодеградации. Вокруг блоков цемента формируется соединительнотканная капсула, плотная — без остроиндуктора — rhBMP-2 и тонкая — при добавлении морфогенетического белка. Паренхима капсул пронизана большим количеством полнокровных кровеносных капилляров разного диаметра.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования было установлено, что все имплантированные образцы брушита являются биосовместимыми и не вызывают дегенеративных изменений в окружающих соединительных и мышечных тканях. Наиболее эффективно, по сравнению с другими опытными группами, регенеративный процесс протекал у животных с применением остеоиндуктора — rhBMP-2. Полное рассасывание цемента отмечается при добавлении морфогенетического белка rhBMP-2 к образцам №1 ($\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), происходит увеличение процессов регенерации в зоне дефекта, по сравнению с опытными группами, которым были имплантированы образцы №2. При внутримышечной имплантации ярко выражены признаки биодеградации цемента, причем скорость резорбции цемента образцов №1 выше скорости резорбции цемента образцов №2.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Хенч Л. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей / Л. Хенч, Д. Джонс - М.: Техносфера, 2007. - 304 с.
2. Григорян А.С. Проблемы интеграции имплантатов в костную ткань (теоретические аспекты) / А.С.Григорян - М.: Техносфера, 2007. - 128 с.
3. Штильман М.И. Полимеры медико-биологического назначения / И.М. Штильман - М.: Академкнига, 2006. - 400 с.
4. Кирилова А.И. Деминерализованный костный трансплантат как стимулятор остеогенеза: современные концепции / А.И. Кирилова // Хирургия позвоночника. - 2004. - №3. - С. 105-110.
5. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. - URL: <http://www.aaalac.org/resources/theguide.cfm> (дата обращения 12.03.2012).
6. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство / Г.Г. Автандилов - М.: Медицина, 1990. - 384 с.