

УДК: 616.71-089.843-092.4:599.323.4

## ОСОБЕННОСТИ ОСТЕОРЕПАРАЦИИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ БИОМАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ГИДРОКСИАПАТИТА И СТРОНЦИЙ-ЗАМЕЩЕННОГО ГИДРОКСИАПАТИТА

М.А. Медков<sup>1</sup>, Д.Н. Грищенко<sup>1</sup>, В.С. Руднев<sup>1,2</sup>, И.В. Шулепин<sup>3</sup>, А.С. Череповский<sup>3</sup>, А.И. Пономаренко<sup>3</sup>, И.В. Дюйзен<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> Институт химии ДВО РАН (690022, г. Владивосток, пр. 100-летия Владивостока, 159), <sup>2</sup> Дальневосточный федеральный университет (690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8), <sup>3</sup> Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т. Острякова, 2), <sup>4</sup> Институт биологии моря ДВО РАН (690022, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17)

**Ключевые слова:** фосфаты кальция, резорбируемые материалы, регенерация кости, крысы.

### OSTEOREPARATION FEATURES USING BIOMATERIALS BASED ON HYDROXYAPATITE AND STRONTIUM-SUBSTITUTED HYDROXYAPATITE

M.A. Medkov<sup>1</sup>, D.N. Grischenko<sup>1</sup>, V.S. Rudnev<sup>1,2</sup>, I.V. Shulepin<sup>3</sup>, A.S. Cherepovskiy<sup>3</sup>, A.I. Ponomarenko<sup>3</sup>, I.V. Dyuzhen<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> Chemistry Institute FEB RAS (159 100-anniversary Ave. Vladivostok 690022 Russian Federation), <sup>2</sup> Far Eastern Federal University (8 Sukhanova St. Vladivostok 690950 Russian Federation), <sup>3</sup> Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690950 Russian Federation), <sup>4</sup> Marine Biology Institute FEB RAS (17 Palchevskogo St. Vladivostok 690022 Russian Federation)

**Background.** Research objective is a comparative analysis of bone tissue regeneration in vivo after implantation original calcium-phosphate materials.

**Methods.** In the experiment on male rats, the samples of hydroxyapatite and strontium-substituted hydroxyapatite were implanted on the surface of the created defect of tibia. Histological examination of the material was held in a month.

**Results.** It is found that using these materials allows full substitution of bone defect, boost the formation and differentiation of bone tissue, strengthen mineralization of newly formed osteons, and caused minimal destructive reorganization in intact areas.

**Conclusions.** The studied materials can be considered as promising inorganic structures for regenerative medicine.

**Keywords:** calcium phosphate, resorbable materials, bone regeneration, rats.

Pacific Medical Journal, 2015, No. 4, p. 48–52.

В последние десятилетия во всем мире ведутся поиски биосовместимых материалов с целью использования их в травматологии, ортопедии и стоматологии. Наблюдается тенденция к увеличению удельного веса хирургических технологий в структуре методов лечения больных с патологией костной ткани. В клиническую практику внедрены импланты из керамики, биополимеров, металлов, углеродосодержащих и композитных материалов. Искусственный материал, замещающий кость, должен по своим физико-химическим и биологическим свойствам приближаться к нормальной костной ткани, быть остеосовместимым, способствовать оптимальному течению репаративных процессов [1, 6]. Наиболее близкими к минеральной составляющей костной ткани являются керамические материалы на основе гидроксиапатита (ГА)  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  и трикальциевого фосфата  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  [9].

Дюйзен Инесса Валерьевна – д-р мед. наук, в.н.с. центральной научно-исследовательской лаборатории ТГМУ, в.н.с. лаборатории фармакологии ИБМ ДВО РАН; e-mail: duval@mail.ru

Важную роль в составе биологического ГА играют неорганические компоненты, в частности катионы натрия, стронция, меди, цинка и анионы фтора, карбоната и хлора. Известно, что эти элементы влияют на такие характеристики костного минерала, как кристалличность, поведение при разрушении и механические свойства. Описаны также биологические эффекты неорганических соединений, связанные с остеогенезом, важные для терапии болезней и разрушения костей [14].

В последнее время большое внимание уделяется влиянию стронциевого замещения на свойства биологических материалов на основе ГА [10–12]. В работе Y. Li et al. [11] установлено, что после 12 недель лечения титановые импланты с покрытиями на основе ГА, содержащие 10%  $\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , показали улучшенную остеointegrацию по сравнению с «чистым» ГА, а удельная плотность костной ткани и контакта «кость–имплант» возросла на 70,9 и 49,9%, соответственно (по данным гистоморфометрии). Отношение объема костного вещества и доля остеointegrации увеличивались на 73,7 и 45,2% (по данным микрокомпьютерной томографии), а максимальная выталкивающая сила и предельная сила сдвига – на 107,2 и 132,9%, соответственно. Эти результаты указывают на возможность использования покрытий из фосфата стронция для улучшения фиксации имплантов в остеопорозной кости. Обнаружено, что ионы стронция могут быть скорее замещены в октакальциевом фосфате, чем в ГА [12]. Предполагается, что эти ионы способствуют остеогенезу, внедряясь в метастабильную фазу октакальциевого фосфата в процессе образования зародышей ГА. Показано также, что ионы, высвобождающиеся из стронций-замещенных биостекол, улучшают метаболическую активность остеобластов [10].

Целью настоящей работы стал сравнительный анализ регенерации костной ткани *in vivo* после имплантации оригинальных кальций-фосфатных материалов.

**Материал и методы.** Для изготовления неорганических имплантов был разработан новый метод получения фосфатов металлов взаимодействием растворов олеатов металлов с раствором трибутилфосфата [3, 5]. Созданы низкоразмерные порошки ГА, допированные примесями, ставшими неотъемлемой частью костной ткани. Полученный этим методом порошок состоит из слипшихся частиц, имеющих удлиненную, оплывшую,

близкую к призматической форму. Среднестатистические размеры частиц  $150 \times 150 \times 300$  нм. Слипшиеся частицы представляют собой пористый агломерат со щелевидной формой пор, ширина которых составляет 100–150 нм. При пиролизе раствора олеата стронция с трибутилфосфатом образуется соединение состава  $\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , изотипное ГА. При смешивании олеатов стронция и кальция получены образцы ГА, в котором атомы кальция частично замещены на стронций – стронций-замещенный гидроксипатит (СЗГА). В настоящей работе применяли наноразмерные образцы ГА, содержащие 20% стронция. Образец СЗГА состоит из слипшихся между собой комков частиц. Поперечные размеры комков – 100–300 нм. Размеры частиц, составляющих комки, –  $50 \pm 20$  нм. Слипшиеся комки представляют собой пористый агломерат с размерами пор 50–100 нм.

Использованы беспородные белые крысы-самцы весом 180–200 г в возрасте 4 месяцев. Животные получены из вивария ТИБОХ ДВО РАН. Исследование проводило в соответствии с Правилами проведения работ и использования экспериментальных животных (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.).

Для изучения биологических свойств образцов выполнена их имплантация в большую берцовую кость крыс. В ходе операции под общим эфирным наркозом в асептических условиях проводилось рассечение мягких тканей над областью вмешательства на передне-латеральной поверхности кости. С помощью дрели с диаметром сверла 2 мм формировали краевой костный дефект длиной 1 см и глубиной 1 мм (без проникновения в костномозговой канал). На поверхность костного дефекта накладывалась паста, содержащая предварительно разведенный в растворе антибиотика исследуемый порошок. Фиксацию материала осуществляли путем наложения биополимерной коллагеновой биодеградируемой пленки с последующим послойным ушиванием тканей над раной. Послеоперационный уход за животными осуществлялся в соответствии с традиционными правилами – антибиотики (линкомицин) в течение 3 дней. Состояние операционной раны во всех случаях не требовало дополнительной местной терапии.

Животные были разделены на группы в зависимости от используемого материала:

*контрольная* (6 животных), в которой после формирования костного дефекта не проводилась имплантация материала;

*группа ГА* (6 животных) с имплантацией гидроксипатита;

*группа СЗГА* (6 животных) с имплантацией стронций-замещенного гидроксипатита;

*интактная группа* (3 животных) включала крыс без операционных и фармакологических воздействий.

Забор материала для гистологического исследования выполнялся через месяц после операции. Животные выводились из опыта путем декапитации после

легкого эфирного наркоза. Участок большеберцовой кости фиксировали 12 часов в 4% забуференном растворе параформальдегида, отмывались в 0,1М натрий-фосфатном буфере (рН 7,2) с 5–6-кратной сменой раствора и после декальцинации в 7% трихлоруксусной кислоте (37°C, 1 сутки на мешалке) заливались в парафин по общепринятой методике. Парафиновые срезы (10 мкм) выполнялись в направлении, поперечном по отношению к длинной оси кости и окрашивались гематоксилин-эозином по стандартной методике.

**Результаты исследования.** В каждой экспериментальной группе морфогенетические процессы проходили с разной степенью выраженности в зоне повреждения кости и в участках отдаленной от травмы костной ткани. У животных контрольной группы на месте повреждения даже через месяц не происходило восстановления объема кости, регистрировались очаги истончения кортикального слоя (рис., а). При этом фиброзная пластинка периоста в зоне травмы была заметно утолщена и в ряде случаев разволокнена. В целом костеобразование у данных крыс имело незавершенный характер – встречались лишь единичные новообразованные остеоны, которые были сформированы небольшим числом остеобластов, расположенных вокруг редких полнокровных капилляров (рис., г), многие из которых проникали в кость из периостальной пластинки. Межклеточное вещество в большинстве случаев содержало внушительное число коллагеновых волокон и аморфную оксифильную матрицу. Минерализация новообразованных остеонов у животных контрольной группы носит весьма умеренный характер – были видны лишь слабо-базофильные линии склеивания (рис., г), располагавшиеся вокруг единичных остеонов и в поверхностных отделах кортикального слоя. В ряде случаев у контрольных животных наблюдались признаки избыточной перестройки костной ткани. Минерализованный остеоид представлял собой обильные нагромождения, что внешне создавало впечатление экзофитного выроста (костной мозоли).

Зачастую со стороны периоста регистрировались обильные зоны резорбции кортикального слоя. В отдаленных от травмы участках кость имела признаки выраженной структурной перестройки, свидетельствующей о процессах де- и реминерализации (рис., ж). На месте разрушенных остеонов располагается большое количество перегруженных гранулами макрофагов-остеокластов (рис., з); гранулярные включения регистрировались и в межклеточном матриксе.

Костная ткань животных с имплантированными неорганическими образцами претерпевала более упорядоченные изменения, приводившие к формированию достаточно зрелой кости. Через месяц после травмы область дефекта восстанавливалась и представлялась пластинчатой костью с системой остеонов и гаверсовых каналов. В группе ГА остеоны были многочисленнее, относительно правильной формы, крупными и были сформированы большим числом

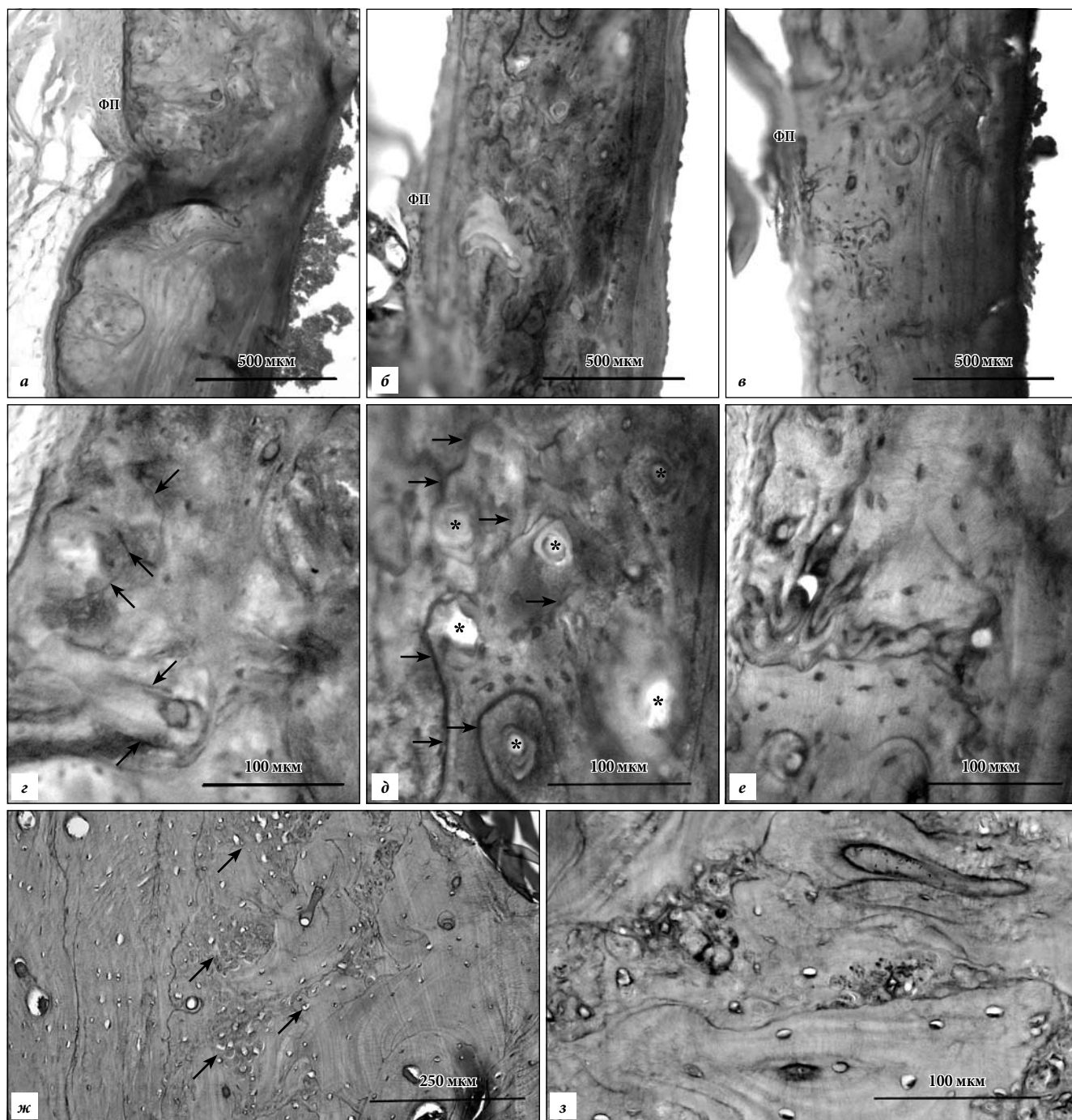


Рис. Морфология костной ткани у животных с поверхностной травмой большеберцовой кости после имплантации ГА и СЗГА:

*a* – участок новообразованной кости с заметным дефектом объема и утолщением фиброзной пластинки периоста у крысы контрольной группы через месяц после операции; *б* – участок новообразованной кости с многочисленными остеонами крупных размеров у животного группы ГА; *в* – морфология новообразованной кости у животного группы СЗГА; *г* – в костном регенерате животных контрольной группы содержится мало остеобластов, кровеносные сосуды немногочисленны (указаны стрелками), слабоминерализованное межклеточное вещество с редкими линиями склеивания; *д* – участок новообразованной кости с многочисленными остеонами крупных размеров (указаны звездочками) и интенсивными зонами минерализации (указаны стрелками) у животного группы ГА; *е* – участок костного регенерата с остеонами неправильной формы, большим числом остеобластов и многочисленными линиями минерализации у животного группы СЗГА; *ж* – реактивные изменения в отдаленных участках кости животных контрольной группы (стрелками указаны разрушенные остеоны вокруг облитерированных сосудов); *з* – макрофаги, перегруженные гранулами минерального вещества в участках резорбированной кости животных контрольной группы. ФП – фиброзная пластинка. Окраска гематоксилином и эозином.

остеобластов (рис., б, д). Многочисленные сосуды, входящие в состав гаверсовых каналов, происходили из элементов внутреннего циркуляторного русла, и не были полнокровными (рис., д). Остеоформирование

носило относительно законченный вид, при этом кость восстанавливалась в полном объеме без фрагментов истончения. Обращало на себя внимание обилие линий склеивания, что свидетельствует о высокой

интенсивности минерализации вновь образованных остеонов (рис., д). Гиперпластической реакции со стороны периоста, а также формирования остеофитов не отмечено.

Морфология новообразованных остеонов при введении СЗГА была несколько иной: по всему объему новообразованной кости в разных направлениях располагались остеоны неправильной вытянутой или звездчатой формы, окруженные интенсивными полосами склеивания (рис., в, е). Важно отметить, что входившие в состав новообразованных остеонов клетки имели признаки высокой дифференцировки – развитую систему костных канальцев. Можно предположить, что данная морфологическая картина является следствием высоких темпов образования, дифференцировки и минерализации новых структурных элементов кости, которые с течением времени претерпевают морфологические адаптации к нагрузке. В группе СЗГА, так же, как и у контрольных животных, в процессы регенерации активно включались фиброзные и сосудистые элементы периоста – это документировалось утолщением его фиброзной пластинки и большим числом образующих остеоны сосудов, проникавших из надкостницы.

Деструктивные явления в зонах, отдаленных от места костной травмы на фоне введения ГА и СЗГА были минимальными и представлены очаговыми изменениями среди сохраненных остеонов. Макрофагов в этих образцах не обнаружено.

**Обсуждение полученных данных.** Гистологический анализ новообразованной кости через месяц после начала эксперимента позволил выявить ряд специфических особенностей регенерации ткани у животных разных групп. Общими признаками регенерации в зоне травмы были следующие:

- ♦ регенерация дефекта кости происходила за счет аппозиционного роста и приводила к формированию остеонов, окруженных линиями склеивания (базофильные линии, расположенные по периферии остеонов и свидетельствующие о минерализации костной матрицы);
- ♦ в участках, расположенных на расстоянии 1–1,5 мм от границ травматического дефекта наблюдались процессы реконструкции интактной костной ткани;
- ♦ реакция периоста на травму выражалась в разной степени гиперплазии фиброзного слоя;
- ♦ во всех случаях не было отмечено наличия патогенной микрофлоры и признаков местной воспалительной реакции;
- ♦ через месяц после операции у животных с имплантированными образцами наличия неутрализованного неорганического (кристаллического) материала не выявлено.

Регенерация кости при поверхностном повреждении у животных группы контроля в большинстве случаев происходила не в полном объеме. Новообразованные элементы ткани характеризовались малым

числом клеток, слабоорганизованным остеоидом с невысоким уровнем минерализации. Спонтанное заживление даже небольшого по объему дефекта сопровождалось деструктивными процессами в интактной кости – в кортикальном отделе на месте вновь образованной ткани и в участках, отдаленных от места травмы, наблюдалось уменьшение в размерах и рассасывание остеонов, формирование лакун резорбции и нагруженных минеральными гранулами макрофагов. Данные морфологические признаки могут быть отражением дефицита компонентов неорганической матрицы, источником которого в данном случае служат участки интактной кости.

Современные подходы к реконструктивной терапии заболеваний костной ткани активно применяют остеокондуктивный и остеоиндуктивный ресурсы природных и синтетических материалов на основе ГА [2, 7]. В нашем исследовании проведен анализ формирования новой кости при использовании материалов, разработанных по оригинальной методике и включающих наноразмерные частицы минералов [3, 4]. Важным отличием данных имплантов от известных и используемых в регенеративной медицине неорганических композитных конструкций является минимальный размер частиц и наличие пор определенного размера, что предполагает более высокие параметры биосовместимости, биодеградации и остеокондуктивности [8].

Морфологический анализ костей животных, тканевой дефект которых был заполнен гранулами ГА или СЗГА, свидетельствует не только об ускорении темпов минерализации, но и о наличии ряда остеоиндуктивных эффектов. Объем костного дефекта был восстановлен в полном объеме, при этом состав новообразованных остеонов был представлен не только молодыми остеообластами, но и клетками с признаками более высокой дифференцировки.

Как известно, замещение части ионов кальция в минеральных тканеинженерных конструкциях на ионы стронция сопровождается рядом позитивных эффектов в отношении биологической эффективности материала [13]. В этом случае, наряду с более активным включением компонентов минерала в состав неорганического матрикса кости наблюдается ряд эффектов, свидетельствующих об остеоиндуктивной активности данной минеральной композиции. Ионы стронция активируют митотическую и синтетическую функцию остеобластов, тормозят дифференцировку остеокластов, усиливая таким образом не только биосовместимость, но и биологическую активность минерала [10]. Морфологические признаки новообразованной кости при использовании в нашем эксперименте СЗГА свидетельствуют о возможной реализации именно этих эффектов биоматериала – более быстрое образование остеонов и их ранняя минерализация проходили на фоне минимальных изменений со стороны интактных отделов кости.

## Выводы

1. Экспериментальным путем установлено, что перестройка костной ткани после повреждения, а также на фоне введения имплантов, содержащих ГА и СЗГА, происходит идентично – за счет аппозиционного роста, с образованием новых остеонов в месте травмы и реорганизацией кости в отдаленных участках. Через месяц от начала эксперимента регенерат представлен пластинчатой костью.

2. В течение месяца после введения неорганических имплантов в зону дефекта кости наступает их полная элиминация и деградация.

3. В отсутствии экзогенного введения ГА и СЗГА (группа контроля) даже в условиях относительно небольшого по объему костного дефекта, регенерация происходит за счет внутренних минеральных резервов.

4. Морфогенез кости после введения костных имплантов, содержащих ГА и СЗГА, протекает идентично по морфологическим признакам с регенерацией кости у контрольных животных, хотя и интенсивными темпами, в более полном объеме, с минимальными привлечением реактивных изменений в отдаленных участках ткани.

5. В группе ГА структура новообразованной кости максимально соответствовала параметрам интактной кости, морфология новообразованных костных структур в группе СЗГА свидетельствовала об ускорении темпов образования и минерализации на фоне минимальных перестроек в отдаленных от травмы участках костной ткани.

Таким образом, разработанные нами материалы могут рассматриваться как перспективные неорганические конструкции для регенеративной медицины. ГА и СЗГА в модели травмы кортикального слоя длинной трубчатой кости демонстрируют реализацию остеокондуктивного и остеоиндуктивного эффектов. Замещение костного дефекта проходит в полном объеме, с ускорением темпов образования тканевых элементов кости, минерализации новообразованных остеонов и с минимальными перестройками в интактных зонах. Биodeградация материала происходит в течение одного месяца и не сопровождается признаками воспаления и реакций отторжения. Для обоснования клеточных механизмов реализации обнаруженных эффектов необходимы дальнейшие детальные исследования.

## Литература

- Гнеденков С.В., Шаркеев Ю.П., Синебрюхов С.Л. [и др.] Функциональные покрытия для имплантационных материалов // Тихоокеанский медицинский журнал, 2012. № 1. С. 12–19.
- Гололобов В.Г. Клеточно-дифференциальные и гистионные составляющие посттравматического остеогенеза // Biomedical and Biosocial Anthropology. 2007. No. 9. С. 236–237.
- Медков М.А., Грищенко Д.Н., Стеблевская Н.И. [и др.] Получение наноразмерных порошков и покрытий фосфатов кальция // Химическая технология. 2011. Т. 12, № 6. С. 343–347.
- Медков М.А., Грищенко Д.Н., Стеблевская Н.И. [и др.] Получение кальцийфосфатных порошков и стеклокерамических покрытий // Химическая технология. 2013. Т. 14, № 5, С. 257–262.
- Патент РФ № 2457174. Способ получения наноразмерных порошков гидроксипатита / Грищенко Д.Н., Медков М.А., Стеблевская Н.И.; опубл. 25.07.2012 г. Бюл. № 21.
- Сафронова Т.В., Путляев В.И. Медицинское неорганическое материаловедение в России: кальцийфосфатные материалы. // Наносистемы: физика, химия, математика. 2013. Т. 4, № 1. С. 24–47.
- Conz M.B., Granjeiro J.M., Soares G.A. Hydroxyapatite crystallinity does not affect the repair of critical size bone defects. // J. Appl. Oral. Sci. 2011. Vol. 19, No. 4. P. 337–342.
- Cyster L.A., Grant D.M., Howdle S.M. [et al.] The influence of dispersant concentration on the pore morphology of hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering // Biomaterials. 2005. Vol. 26. P. 697–702.
- Dorozhkin S.V. Bioceramics of calcium orthophosphates // Biomaterials. 2010. Vol. 31, No. 7. P. 1465–1485.
- Gentleman E., Fredholm Y.C., Jell G. [et al.] The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro // Biomaterials. 2010. Vol. 31, No. 14. P. 3949–3956.
- Li Y., Li Q., Zhu S. [et al.] The effect of strontium-substituted hydroxyapatite coating on implant fixation in ovariectomized rats // Biomaterials. 2010. Vol. 31, No. 34. P. 9006–9014.
- Matsunaga K., Murata H. Strontium Substitution in bioactive calcium phosphates: A first-principles study // J. Phys. Chem. 2009. Vol. 113, No. 11. P. 3584–3589.
- Vestermark M.T., Hauge E.-M., Soballe K. [et al.] Strontium doping of bone graft extender. Effect on fixation of allografted experimental implants // Acta Orthopaedica. 2011. Vol. 82, No. 5. P. 614–621.
- Yang L., Perez-Amodio S., Barrere-de Groot F.Y. [et al.] The effects of inorganic additives to calcium phosphate on in vitro behavior of osteoblasts and osteoclasts // Biomaterials. 2010. Vol. 31, No. 11. P. 2976–2989.

Поступила в редакцию 24.03.2015.

## Особенности остеорепарации при использовании биоматериалов на основе гидроксипатита и стронций-замещенного гидроксипатита

М.А. Медков<sup>1</sup>, Д.Н. Грищенко<sup>1</sup>, В.С. Руднев<sup>1, 2</sup>, И.В. Шулепин<sup>3</sup>, А.С. Череповский<sup>3</sup>, А.И. Пономаренко<sup>3</sup>, И.В. Дюйзен<sup>3, 4</sup>

<sup>1</sup> Институт химии ДВО РАН (690022, г. Владивосток, пр-т 100-летия Владивостока, 159), <sup>2</sup> Дальневосточный федеральный университет (690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8), <sup>3</sup> Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т. Острякова, 2) <sup>4</sup> Институт биологии моря ДВО РАН (690022, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17)

**Введение.** Цель настоящей работы – сравнительный анализ регенерации костной ткани *in vivo* после имплантации оригинальных кальций-фосфатных материалов.

**Материал и методы.** В эксперименте на крысах-самцах образцы гидроксипатита и стронций-замещенного гидроксипатита имплантировали на поверхность созданного дефекта большой берцовой кости. Гистологическое исследование материала проведено через месяц.

**Результаты исследования.** Установлено, что использование данных материалов приводит к полному замещению костного дефекта, ускоряет темпы образования и дифференцировки тканевых элементов кости, усиливает минерализацию новообразованных остеонов и вызывает минимальные деструктивные перестройки в интактных зонах.

**Обсуждение полученных данных.** Исследованные материалы могут рассматриваться как перспективные неорганические конструкции для регенеративной медицины.

**Ключевые слова:** фосфаты кальция, резорбируемые материалы, регенерация кости, крысы.