

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА СВОЙСТВ 3D-ПОРИСТОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ ФОСФАТА КАЛЬЦИЯ НА МОДЕЛИ МОНОКОРТИКАЛЬНОГО ДИАФИЗАРНОГО ДЕФЕКТА БЕДРЕННОЙ КОСТИ КРЫСЫ

В.Э.Дубров¹, Е.С.Климашина^{2,3}, И.М.Щербаков¹,
Г.А.Шипунов¹, В.И.Путляев^{2,3}, П.В.Евдокимов^{2,3},
А.А.Тихонов², Д.А.Зюзин¹, Н.В.Данилова¹, П.Г.Мальков¹

¹Факультет фундаментальной медицины, ²факультет наук о материалах, ³химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, РФ

Исследован *in vivo* новый аллопластический высокопроницаемый материал на основе трикальциевого фосфата с архитектурой Кельвина, созданной с помощью стереолитографической 3D-печати. У крыс моделировали монокортикальный дефект бедренной кости и имплантировали материал в зону дефекта. Через 24 нед животных выводили из эксперимента и проводили гистологическое исследование зоны дефекта. Зафиксировано по одному перелому бедренной кости с миграцией фиксатора при использовании исследуемого материала и синтетического материала сравнения chronOS®. Изучаемый материал по сравнению с традиционным костнопластическим материалом обладал лучшими osteoconductive свойствами, о чем свидетельствует большее количество костных trabeculae и их площадь в зоне замещения дефекта.

Ключевые слова: костнозамещающие материалы, 3D-печать, архитектура Кельвина, дефекты кости

В клинической практике часто возникает необходимость в костной пластике — восполнении объема утраченной кости из-за компрессии в зоне перелома, возникновения ее дефектов после резекции доброкачественных опухолей, зоны ложных суставов и т.п. [1,7]. “Золотым стандартом” пластического материала считается аутологическая губчатая костная ткань, сочетающая в себе остеогенные, osteoinductive и osteoconductive свойства [4,9], однако ее применение лимитировано ограниченным объемом доступной к изъятию кости в организме, а также развивающейся “болезнью донорского места” [5]. Для решения этой проблемы было предложено использование различных allo- и ксенологических материалов. Использование allo-

кости и ксенологических материалов, к сожалению, сопряжено с риском передачи парентеральных инфекций, поэтому пристальное внимание исследователей уделяется созданию и изучению аллопластических костнозамещающих материалов [3,4,11].

Цель данного исследования — изучить способность к биодеградации и osteoconductive свойства нового аллопластического материала на основе трикальциевого фосфата с заданной 3D-пористой архитектурой на модели критического диафизарного монокортикального дефекта бедренной кости крысы.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследуемый материал представляет собой биорезорбируемые макропористые 3D-конструкции нового поколения на основе трикальциевого фос-

фата ($\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), полученные методом быстрого прототипирования — стереолитографической 3D-печати с последующим удалением фотополимера и спеканием керамического каркаса [12]. Общая пористость составляет около 80%, каналы связных пор имеют размеры 1250 мкм и переходы между ними 750 мкм, что обеспечивает максимальную проницаемость такой архитектуры. 3D-модели структур были созданы с помощью программного пакета SolidWorks 2013 (рис. 1). В качестве материала сравнения использовали широко распространенный, полностью синтетический, коммерческий костнозамещающий материал с аналогичным химическим составом chronOS® (DePuy Synthes, Johnson & Johnson). В этом материале общая пористость составляет около 55%, размер пор — 300 мкм, а переходы между ними — 50 мкм. Тестируемый материал перед имплантацией стерилизовали обработкой в сухожаровом шкафу WS-200 при 180°C и длительности цикла обработки 60 мин.

Исследование выполнено на крысах линии Wistar в возрасте 25-30 нед. Содержание животных, периоперационное обезболивание и антибиотикопрофилактику проводили по международным протоколам, одобренным этическим комитетом МГУ им. М.В. Ломоносова [2,6,8].

Крыс распределяли случайным образом в две группы по 6 особей в каждой. Для наркотизации использовали золетил (тилетамин, золазепам) и ксилазин в дозах 50 и 11 мг/кг внутривенно. После осуществления доступа на диафизарном участке кости фрезой выполняли дефект полуцилиндрической формы длиной 0.7 см и радиусом 0.3 см. У животных № 1-6 дефект заполняли подготовленным материалом chronOS® в виде полуцилиндрического блока (группа сравнения), а у животных № 7-12 — исследуемым материалом (опытная группа). Блоки фиксировали в кости с помощью титановой мини-пластины толщиной 0.6 мм и 4 титановых винтов диаметром 1.2 мм, длиной 6 мм (“Конмет”).

Исследуемый материал располагали в области дефекта таким образом, чтобы диагональное направление $\langle 111 \rangle$ структуры керамической конструкции было соосно оси диафиза.

Через 24 нед после выполнения операции животных выводили из эксперимента по стандартной методике с последующим забором материала (участок бедренной кости, на котором выполнялся дефект) для гистологического исследования [10]. Материал фиксировали в 10% нейтральном растворе формальдегида в течение 24 ч, после чего образцы декальцинировали в 25% растворе трилона Б при pH 7.0 и комнатной температуре на Orbital Shaker OS-20 biosan. После декальцинации промывали в дистиллированной воде, гистологическую проводку и заливку проводили по стандартной методике. Срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Препараты оценивали в световом микроскопе Leica DM LB2 (Carl Zeiss) и фотографировали с помощью цифровой камеры AxioCam ICc3 (Carl Zeiss). Способность к биодеградации оценивали по наличию или отсутствию фрагментов материала в образцах. Остеокондуктивные свойства — путем подсчета количества и площади новообразованных трабекул на месте материала за пределами кортикального слоя. Оценку проводили для 3 срезов каждого образца. Площадь измеряли в мм² с помощью программы Fiji [13].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью непараметрического *U* критерия Манна—Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обе группы животных были сопоставимы по массе тела на момент включения в исследование (группа сравнения — 363±14 г, опытная группа — 352±42 г) и вывода из него (447±46 и 410±63 г соответственно). Глубоких инфекционных осложнений не зафиксировано.

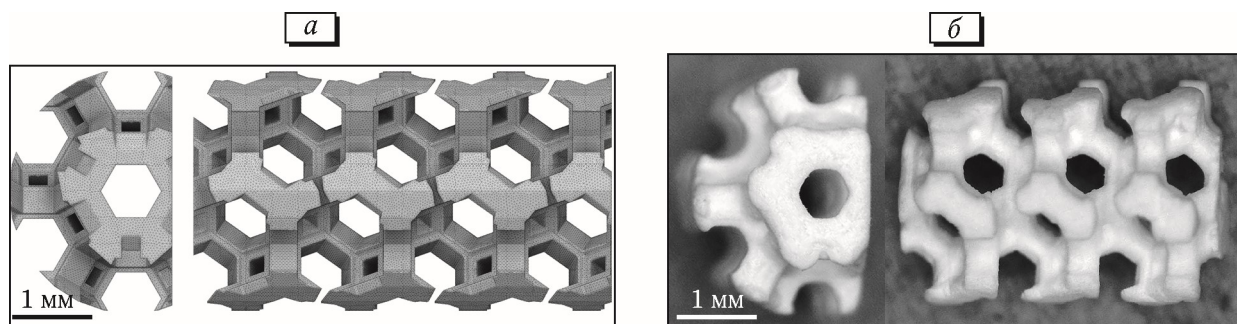


Рис. 1. Имплантаты для малых лабораторных животных.

a — компьютерная модель для стереолитографической печати; *б* — керамические имплантаты специальной формы с архитектурой Кельвина. Внешний диаметр керамической конструкции 3 мм.

По данным аутопсии выявлено два осложнения течение процесса репарации — по одному в каждой группе. У животного № 2 (группа сравнения) выявлен перелом кости с миграцией фиксатора, что завершилось консолидацией с угловой деформацией, однако произошло рассасывание материала и замещение дефекта. У животного № 9 (опытная группа) также отмечен перелом кости в зоне дефекта, миграция фиксатора и материала и консолидация перелома с формированием костной мозоли. Зона дефекта не была заполнена вследствие миграции материала, мелкие фрагменты которого обнаруживались в окружающих мягких тканях.

Гистологические результаты получены у всех животных, кроме крысы № 9. Результаты гистологического исследования крысы № 5 (группа сравнения) и № 8 (опытная группа) представлены на рисунке 2.

Макроскопически резорбцию материала и замещение его костной тканью отмечали во всех случаях, кроме животного № 9. При гистологической

оценке также отмечалась полная резорбция материала к 24-й неделе в обеих группах. В опытной группе среднее количество трабекул на гистологическом срезе составило 13.8 ± 2.3 , в группе сравнения — 8.4 ± 2.1 , что значительно меньше ($U=63.5$, $U_{\text{крит. значение}}=70$, $p<0.01$). Средняя площадь трабекул составила в опытной группе $0.13 \pm 0.09 \text{ мм}^2$, в группе сравнения — $0.10 \pm 0.05 \text{ мм}^2$, что также значительно меньше ($U=82$, $U_{\text{крит. значение}}=88$, $p<0.05$).

Таким образом, использование структуры Кельвина для создания макропористых имплантатов позволяет повысить физическую проницаемость материала. Проницаемость костнозамещающего материала chronOS® ограничена своей структурой (пористость, размер пор и переходов между двумя соседними порами). Для увеличения проницаемости данного материала необходимо увеличение размера пор и переходов между ними или наличие, например, сквозных каналов, что невозможно получить в используемом для его создания технологическом процессе при сохранении

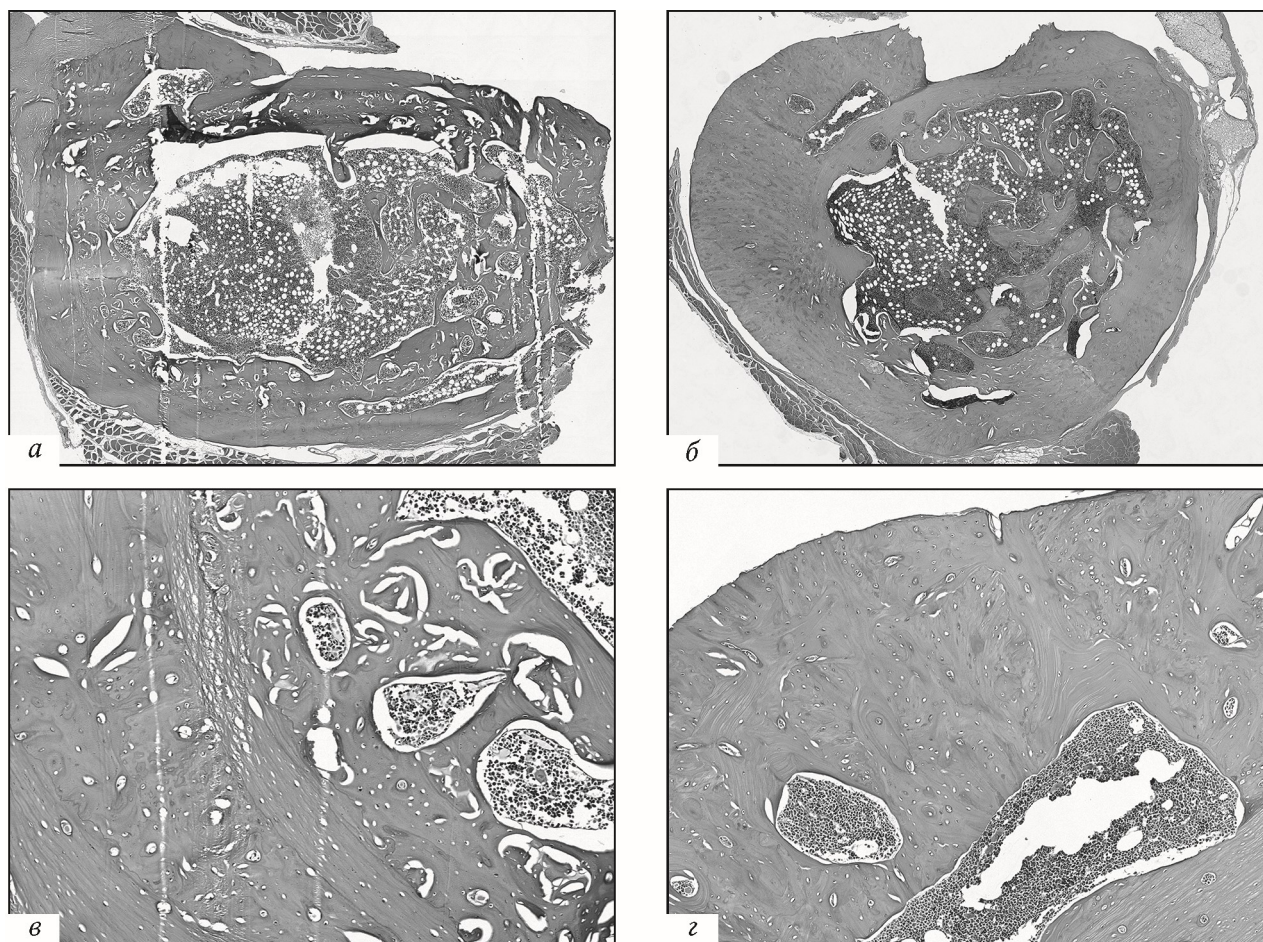


Рис. 2. Гистологические препараты бедренной кости на уровне дефекта. Полное замещение структуры дефекта костной тканью с восстановлением кортикального слоя. Окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 10$ (а, б), $\times 200$ (в, з). а, в — бедренная кость крысы № 5 (chronOS®). б, з — бедренная кость крысы № 8 (исследуемый материал).

механических свойств. Полученные результаты позволяют утверждать, что архитектоника исследуемого материала благодаря своей заданной высокой пористости, наличию прямых каналов, а также трехмерной организации системы пор повышает его остеокондуктивные свойства, не влияя на способность к биодеградации.

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 17-79-20427). Результаты, использованные в работе, получены на оборудовании, приобретенном за счет средств Программы развития Московского университета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бартов М.С., Громов А.В., Попонова М.С., Савина Д.М., Никитин К.Е., Грунина Т.М., Манских В.Н., Гра О.А., Лунин В.Г., Карягина А.С., Гинцбург А.Л. Современные подходы к исследованию новых остеогенных биоматериалов на модели регенерации краниальных дефектов критического размера у крыс // Бюл. exper. биол. 2016. Т. 162, № 8. С. 242-246.
2. Мигулева И.Ю., Савотченко А.М., Петухова М.Н., Папанинов А.С., Клюквин И.Ю., Кислицына О.С., Сластинин В.В. Две новые модели экспериментального дефекта кости на голени крысы для исследования регенерации костной ткани после пластики различными материалами // Вопросы реконструкт. и пласт. хирургии. 2015. Т. 18, № 2. С. 34-45.
3. Олесова В.Н., Амхадова М.А., Симакова Т.Г., Миргазизов М.З., Пожарицкая М.М. Экспериментальное обоснование эффективности отечественного остеоиндуктивного материала "Gamalant-паста-ФОРТЕ Плюс" в хирургической стоматологии // Бюл. exper. биол. 2016. Т. 162, № 11. С. 618-620.
4. Dau M., Ganz C., Zaage F., Frerich B., Gerber T. Hydrogel-embedded nanocrystalline hydroxyapatite granules (elastic blocks) based on a cross-linked polyvinylpyrrolidone as bone grafting substitute in a rat tibia model // Int. J. Nanomedicine. 2017. Vol. 12. P. 7393-7404.
5. Dimitriou R., Mataliotakis G.I., Angoules A.G., Kanakaris N.K., Giannoudis P.V. Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review // Injury. 2011. Vol. 42, Suppl. 2. P. 3-15.
6. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council // Official Journal of the European Union. Retrieved April 17, 2016.
7. Finkemeier C.G. Bone-grafting and bone-graft substitutes // J. Bone Joint Surg. Am. 2002. Vol. 84-A, N 3. P. 454-464.
8. Gaertner D.J., Hallman T.M., Hankenson F.C., Batchelder M.A. Anesthesia and Analgesia in Rodents // Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals / Eds R.Fish, P.Danneman, M.Brown, A.Karas. Academic Press, 2008. P. 239-297.
9. Kolk A., Handschel J., Drescher W., Rothamel D., Kloss F., Blessmann M., Heiland M., Wolff K.D., Smeets R. Current trends and future perspectives of bone substitute materials — from space holders to innovative biomaterials // J. Craniomaxillofac. Surg. 2012. Vol. 40, N 8. P. 706-718.
10. Leary S., Underwood W., Anthony R., Cartner S., Corey D., Grandin T., Greenacre C.B., Gwaltney-Bran S., McCrackin M.A., Meyer R. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals. Schaumburg, 2013.
11. Maus U., Andereya S., Gravius S., Ohnsorge J.A., Niedhart C., Siebert C.H. BMP-2 incorporated in a tricalcium phosphate bone substitute enhances bone remodeling in sheep // J. Biomater. Appl. 2008. Vol. 22, N 6. P. 559-576.
12. Putlyaev V.I., Evdokimov P.V., Safronova T.V., Klimashina E.S., Orlov N.K. Fabrication of osteoconductive $Ca_{3-x}M_{2x}(PO_4)_2$ (M=Na, K) calcium phosphate bioceramics by stereolithographic 3D printing // Inorganic Materials. 2017. Vol. 53, N 5. P. 529-535.
13. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.Y., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis // Nat. Methods. 2012. Vol. 9, N 7. P. 676-682.

Получено 24.04.18