

УДК 616.718.4-089.843:615.462]:616-003.9(045)

DOI: <http://dx.doi.org/10.15674/0030-598720182102-107>

Остеорепарация вокруг полилактида, имплантированного в метадиафизарный дефект бедренной кости (экспериментальное исследование)

В. Б. Макаров¹, Н. В. Дедух², О. А. Никольченко³

¹ ГУ «Специализированная многопрофильная больница № 1 МЗ Украины», Днепр

² ГУ «Институт геронтологии им. Д. Ф. Чеботарева НАМН Украины», Киев

³ ГУ «Институт патологии позвоночника и суставов им. проф. М. И. Ситенко НАМН Украины», Харьков

Polylactides are synthetic materials that are X-ray-transparent, do not result in immune reactions, easy to sterilize, degrade to CO₂ and H₂O after implantation into the bone — natural products of metabolic processes. Materials based on polylactides are constantly modified in order to improve osteointegration and mechanical properties, to create a controlled degradation. Objective: to study regeneration of bone and osteointegration of polylactide in the case of implantation it into the metadiaphys defect of the rats femur. Methods: we implanted samples of polylactide with size 3×2 mm into the metadiaphys bone defect of 35 white rats. We assessed bone regeneration due to histology study with morphometry in order to define osteointegration index in 15 days, 1, 3, 6 and 9 months after the removal of the samples. Results: on the 15th day the implant was surrounded by immature bone. High index of osteointegration — 46.6 ± 1.1 was observed. Active formation of bone tissue around the implant continued up to 3 months, on the later period index of osteointegration did not change. It can testify about stopping of bone remodeling. Host bone and bone marrow were without destructive changes. On the sites of polylactide, adjacent to the bone marrow and intertrabecular spaces, cells were located directly on the implant, we did not observe any cells infringement. Signs of inflammatory process were not found. In 9 months after surgery we did not find any destruction of polylactide, index of osteointegration was 97 %. Conclusions: polyplactide implants are characterized by low rate of resorption, high osteoconductive and osteointegrative properties, biocompatibility with bone. Key words: biodegradation of implants, polylactide, rats, metadiaphys of the femur, histology.

Полилактиди — синтетичні матеріали, які є рентген-прозорими, не приводять до імунної реакції, прості в стерилізації, після імплантації в кістку деградують до CO₂ і H₂O — природних продуктів метаболічних процесів. Матеріали на основі полілактидів постійно модифікують для поліпшення остеоінтеграції та механічних властивостей, створення можливості керованої деградації. Мета: вивчити регенерацію кістки й остеоінтеграцію полілактиду за умов імплантації в метадіафізарний дефект стегнової кістки щурів. Методи: у метадіафізарні дефекти стегнової кістки 35 білим щурам імплантували зразки полілактиду розміром 3×2 мм. Оцінювали регенерацію кістки за допомогою гістологічного дослідження з морфометрією для визначення індексу остеоінтеграції через 15 діб, 1, 3, 6 і 9 міс. після введення дослідних зразків. Результати: на 15-ту добу імплантат був оточений незрілою кістковою тканиною. Визначено високий індекс остеоінтеграції — 46,6 ± 1,1. Активне формування кісткової тканини навколо імплантатів тривало до 3 міс., на наступні терміни показник остеоінтеграції не змінювався, що може свідчити про завершення перебудови кістки. Материнська кісткова тканина і кістковий мозок — без виражених деструктивних порушень. На ділянках полілактиду, прилегло до кістковому мозку міжтрабекулярних просторів, клітини розташовувалися безпосередньо на імплантаті, порушення їхнього складу або осередків клітинного детриту не виявлено. Ознак запального процесу не зафіксовано. Через 9 міс. після операції деформації та руйнування полілактиду не визначено, індекс остеоінтеграції становив 97 %. Висновки: імплантати з полілактиду характеризуються низькою швидкістю резорбції, високими остеокондуктивними й остеоінтегративними властивостями, біосумісністю з кістковою тканиною. Ключові слова: біодеградація імплантатів, полілактид, щури, метадіафіз стегнової кістки, гістологія.

Ключевые слова: биодеградация имплантатов, полилактид, крысы, метадиафиз бедренной кости, гистология

Введение

Прогресс в создании новых материалов для медицинского применения в значительной степени определяется знанием механизма их взаимодействия с тканями и органами. В последние годы внимание ортопедов-травматологов привлекают синтетические вещества, что связано с простотой их изготовления на основе химической модификации структуры, хорошими остеокондуктивными качествами, биосовместимостью, а также контролируемой способностью к остеоинтеграции, что обеспечивает механические свойства в зависимости от химического состава и технологии получения [1, 2].

Среди таких материалов в поле зрения специалистов находятся полилактиды — рентген-прозрачные, простые в стерилизации, обладающие после имплантации в кость различной кинетикой биодеградации (в зависимости от молекулярной массы) с образованием CO_2 и H_2O — естественных продуктов метаболических процессов, протекающих в организме [3–6].

В 1966 году были проведены первые эксперименты по изучению биосовместимости и перестройки кости после использования биодеградируемых полилактидов [7, 8]. В условиях фиксации пластинами или винтами костей у животных авторы установили, что эти материалы нетоксичны, не вызывают иммунологических реакций, характеризуются способностью биодеградировать с замещением костной тканью, могут быть использованы при остеопорозе. Однако исследования показали, что механические свойства материалов на основе полилактидов относительно быстро теряются после имплантации из-за ускоренной биодеградации [8].

Прогресс в области использования биорезорбируемых материалов наметился после создания сополимеров на основе полигликолевой и полилактидной кислот, проявивших после имплантации в коленный сустав способность к биодеградации и повышенные механические свойства [9]. На сегодня использование в медицине различных модификаций полилактидов и их составных полимерных материалов одобрено FDA (Food and Drug Administration, США) [10]. Биополимеры на основе полилактидов и их композитов применяют в качестве фиксирующих устройств, винтов, скоб, штифтов, стержней для стабилизации переломов различной локализации, в том числе и на фоне остеопороза [11].

Однако опубликованы также данные о негативных тканевых реакциях на деградируемые полимеры (воспалительной, остеолитической вокруг имплантата), что является основным недостатком и ограничивает их клиническое применение [12, 13]. Поэтому материалы на основе полилактидов модифицируют и оценивают их влияние на биологические объекты. В случае костных имплантатов обычно изучают их перестройку в губчатой и компактной костных тканях.

Цель исследования: изучить регенерацию кости и остеоинтеграцию полилактида в условиях имплантации в метадиафизарный дефект бедренной кости крыс.

Материал и методы

Эксперимент на крысах проведен на базе отдела экспериментального моделирования и трансплантологии с экспериментально-биологической клиникой ГУ «ИППС им. проф. М. И. Ситенко НАМН» в соответствии с требованиями по гуманному отношению к животным [14, 15]. Протокол экспериментов на животных был утвержден комитетом по биоэтике (№ 158 от 21.11.2016).

Образцы для имплантации изготовлены в виде цилиндров 3×2 мм из синтетического материала. Химическое название этого биополимера — полилактидная смола, полученная на основе полимеризации смеси D- и L-форм лактида в соотношении от 24 : 1 до 32 : 1 [16]. Далее в тексте использован термин «полилактид».

Техника выполнения хирургического вмешательства. Под общим внутримышечным обезболиванием (кетамин 50 мг/кг) в условиях асептики и антисептики 35 крысам-самцам (возраст 6 мес., средняя масса тела (260 ± 24) г) передне-латеральным доступом к дистальному метадиафизу левой бедренной кости в области выше зоны роста с помощью стоматологического бора моделировали стандартный дырчатый дефект диаметром 2 мм и глубиной 2,5 мм и имплантировали в него образец биоматериала. Кожную рану ушивали одиночными узловыми швами.

Животных после операции выводили из эксперимента через 15 сут, 1, 3, 6 и 9 мес. (по 7 на каждый срок исследования) путем декапитации с использованием эфирного наркоза. Применение такого способа эвтаназии обусловлено необходимостью забора крови для клинического и биохимического исследований.

Для морфологического анализа выделяли дистальные участки бедренных костей с областью имплантации, в которой на всех сроках

исследования располагался образец (рис. 1, а). Бедренные кости обрабатывали гистологическими методами [17]. После фиксации в растворе 10 % нейтрального формалина, декальцинации в 4 % растворе азотной кислоты, материал обезвоживали в этиловом спирте (от 70° до 96°) и смеси Никифорова (этиловый спирт и диэтиловый эфир, 1 : 1), затем заключали в целлоидин. Из полученных блоков (рис. 1, б) изготавливали срезы (8–10 мкм), окрашивали железным гематоксилином Вейерта и эозином, а также пикрофуксином по Ван-Гизону и исследовали под световым микроскопом Olympus BX63.

В работе использован *морфометрический метод* определения индекса остеоинтеграции с помощью планиметрической окулярной сетки (289 точек пересечений) [18] под микроскопом MICROS (Austria) при увеличении 100. В поле зрения подсчитывали количество точек (пересечение сторон квадратов) по периметру имплантата в костном ложе (область периоста не учитывали) и принимали за 100 %. Отдельно учитывали точки, попавшие на костную ткань, и выражали в процентах от общего периметра, что отражало индекс остеоинтеграции [19]. У каждого животного оценивали по три центральных среза. Цифровые показатели обработаны статистически с использованием метода Стьюдента, различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

На всех сроках исследования поведение животных не было нарушено, они активно передвигались по клетке. Воспалительной реакции со стороны кожи в области имплантированного материала не выявлено.

Через 15 сут после имплантации в области кортекса и губчатой кости на гистологических срезах четко определялся участок, заполненный полилактидом. Имплантат округлой формы со стороны костного ложа плотно прилегал к кортексу и костным трабекулам материнской кости, местами контактировал с костным мозгом. По его периметру обнаружены узкие напластования соединительной ткани и грубоволокнистые костные трабекулы (рис. 2).

В зонах расположения образца в кортексе между ним и костным ложем выявлены грубоволокнистые костные трабекулы с преостеоцитами, которые не были окружены капсулами (рис. 3). На небольших участках между имплантатом и кортексом формировался слой остеобластов, образующих остеоид. В кортексе обнаружены

небольшие территории без клеток и очаги расщепления матрикса, возникшие вследствие травматического повреждения. Однако на значительных по протяженности участках отмечены репаративные проявления — формирование костной ткани по стенкам остеонов и вращание фиброретикулярной ткани в трещины.

Образцы, расположенные в зоне трабекулярной кости, были плотно окружены тонким слоем новообразованной незрелой костной ткани с высокой плотностью остеобластов, что способствовало формированию контактов с трабекулами.

На участках полилактида, прилежащего к костному мозгу межтрабекулярных пространств, клетки располагались непосредственно на нем. Не выявлено нарушения клеточного состава костного мозга или очагов клеточного детрита.

На поверхности имплантата, выступающего из кости, зафиксировано формирование периоста, представленного узкой полоской соединительной ткани с коллагеновыми волокнами и единичными фибробластами между ними (рис. 2, а).

Известно, что после имплантации реакцией на биосовместимые материалы является воспаление, которое длится не более двух недель, а его персистенция свыше трех недель отражает негативные стороны имплантата [20]. В проведенном нами исследовании на 15 сут признаков воспалительной реакции не зафиксировано ни на поверхности полилактида, ни в костном мозге межтрабекулярных пространств губчатой кости, что свидетельствует об отсутствии токсичности материала и его хорошей биосовместимости.

Через 1 мес. образцы из полилактида практически по всему периметру были окружены новообразованной костной тканью, четкая граница между которой и кортексом отсутствовала (рис. 4), что свидетельствует о хороших остеоинтегративных свойствах материала. В губчатой кости на поверхности образцов располагались узкие зрелые костные трабекулы и лишь на небольших участках полилактид контактировал с костным мозгом межтрабекулярных пространств (рис. 4, б).

Над имплантатами сформировались узкие прослойки зрелой костной ткани, над которыми располагался периост, выполненный параллельными пучками коллагеновых волокон с единичными фибробластами между ними.

Через 3 мес. имплантаты были замурованы костной тканью, границ между материнской и новообразованной тканью вокруг полилактида не выявлено. Вокруг образцов и на расстоянии

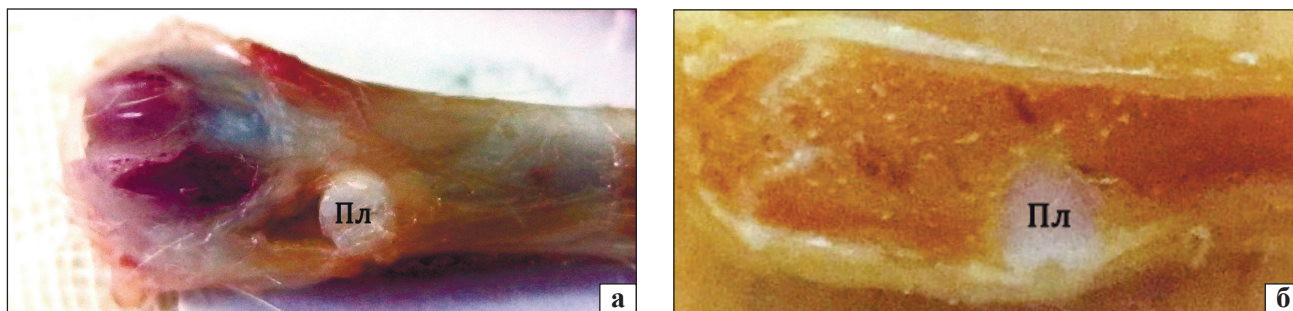


Рис. 1. Имплантат из полилактида (Пл) в области дистального метадиафиза бедренной кости: а) материал, выделенный для гистологического исследования; б) область гистологического среза с материала, заключенного в целлоидин. 9 мес. после имплантации

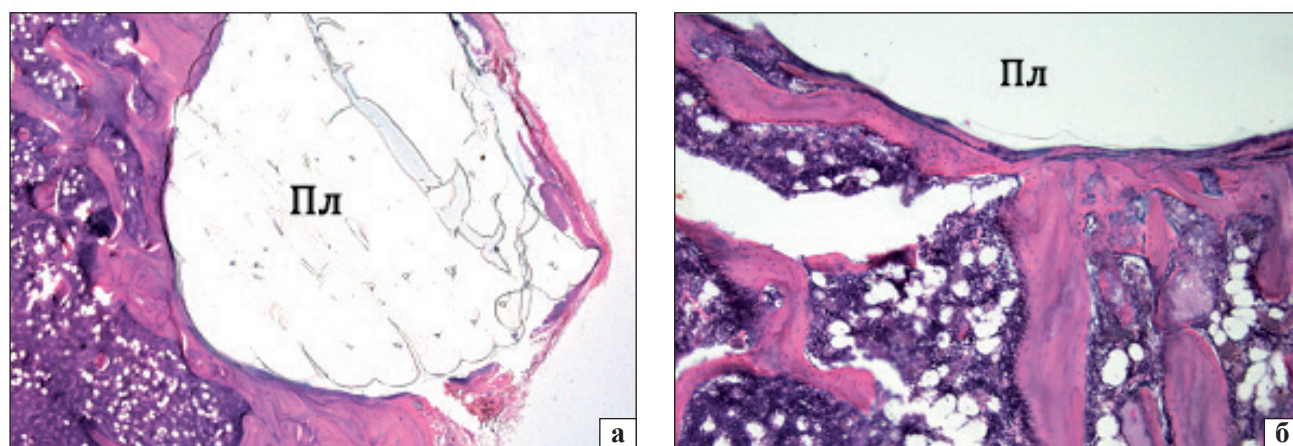


Рис. 2. Имплантат из полилактида (Пл) в костном ложе: а) наложение соединительной ткани на поверхности имплантата, ув. 40; б) узкие прослойки грубоволокнистой костной ткани между имплантатом и материнскими трабекулами, ув. 100. 15 сут после имплантации. Гематоксилин и эозин

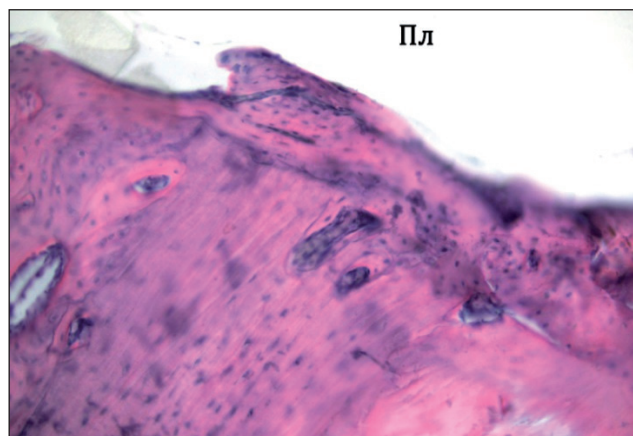


Рис. 3. Новообразованные костные трабекулы между кортексом и имплантатом (Пл). Небольшие участки без клеток в кортексе. 15 сут после имплантации. Гематоксилин и эозин. Ув. 400

от них деструктивных нарушений в области кортекса и губчатой кости не обнаружено. Полилактид сохранял форму, признаки его деформации отсутствовали, что свидетельствует об уравнивании механической нагрузки на сформированную систему «имплантат – кость».

Отличительных особенностей в перестройке костной ткани на поверхности материала через 6 и 9 мес. не отмечено. Образцы из полилактида располагались в области кортекса и губчатой кости, сохраняли целостность, их деформации не выявлено (рис. 5). Лишь на небольших краевых участках имплантата обнаружено врастание костной ткани на глубину не более 1–2 мм, что способствует повышению остеоинтеграции. Признаков локального остеопороза вокруг материалов не отмечено.

Известно, что на скорость биодеградации влияют различные факторы — окружающая среда, химические свойства полилактидов, включая молекулярную массу и состав, способ стерилизации, область имплантации [2, 6]. По данным литературы, винты из полигликолидов рассасываются через 6 мес., а из полилактидов — от 12 до 24 мес. [21]. В нашем исследовании через 9 мес. биодеградации имплантатов не выявлено.

При оценке индекса остеоинтеграции полилактида установлено, что уже на 15 сут он был достаточно высоким — $46,6 \pm 1,1$, через 1 мес. — повышался в 1,55 раза, что отражает тесный

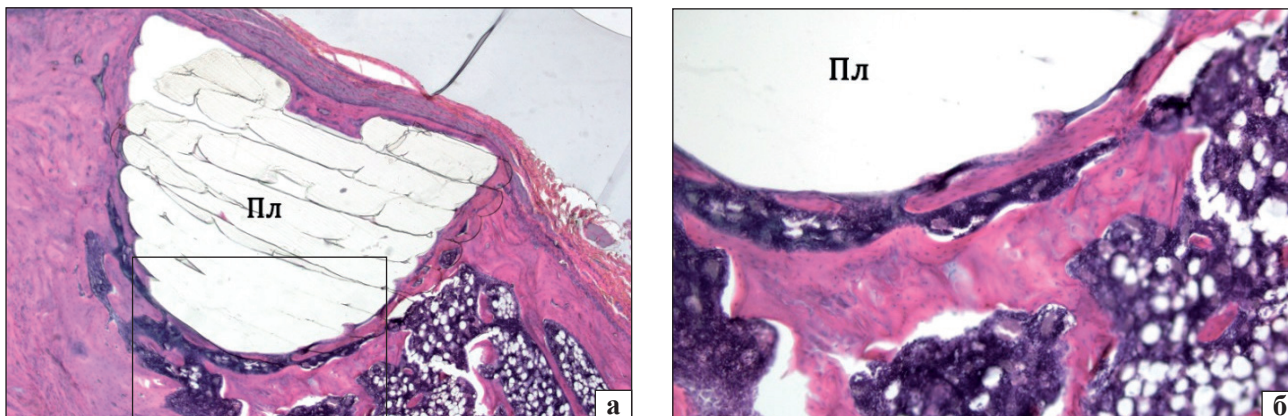


Рис. 4. Имплантат из полилактида в области компактной и губчатой костей: а) новообразованная костная ткань вокруг материала, ув. 40; б) участок губчатой кости, костные трабекулы и небольшие очаги костного мозга на поверхности имплантата. Фрагмент рис. 4, а, ув. 100. 1 мес. после операции. Гематоксилин и эозин

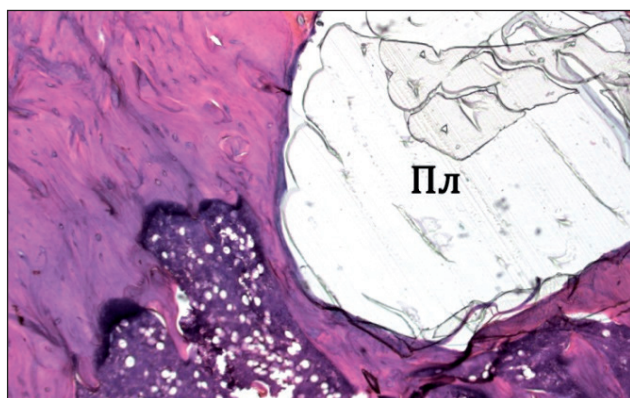


Рис. 5. Зрелая костная ткань вокруг имплантата из полилактида (Пл). 9 мес. после имплантации. Гематоксилин и эозин. Ув. 400

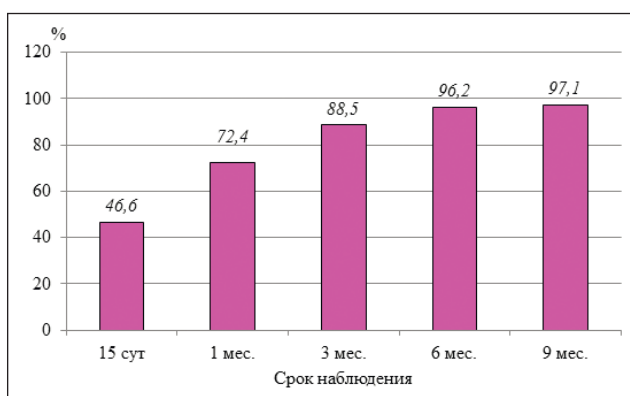


Рис. 6. Диаграмма индекса остеointеграции (%) полилактида, имплантированного в метадиафизарный дефект у крыс

контакт материала с окружающей костной тканью (рис. 6). Значимое повышение индекса остеointеграции в 1,2 раза выявлено через 3 мес. по сравнению с 1 мес. ($p < 0,05$). Не обнаружено различий через 3, 6 и 9 мес. при сравнении показателей между собой.

Ранее мы изучили результаты введения полилактида в диафизарный отдел бедренной кости [22] и установили, что перестройка кортекса вокруг материала активно происходит в основном до 3 мес., имплантаты на этот срок и позднее были окружены зрелой костной тканью, их полной деградации через 6 мес. не обнаружено. В настоящем исследовании также выявлено, что активное формирование костной ткани вокруг образцов из полилактида происходило до 3 мес., на последующие сроки показатель остеointеграции не изменялся, что может свидетельствовать о завершении перестройки вокруг имплантатов.

Низкая скорость резорбции исследованного полилактида, высокий индекс остеointеграции (97 % через 9 мес.) дает возможность рекомендовать его для изготовления фиксирующих устройств длительного использования.

Выводы

Результаты экспериментальной работы, проведенной на крысах, свидетельствуют о высокой остеointеграции полилактида практически на всех сроках исследования — не выявлено деструкции окружающей костной ткани и костного мозга, а также признаков воспалительного процесса. Имплантаты плотно располагались в воспроизведенном дефекте, были окружены новообразованной костной тканью. Материнская костная ткань и костный мозг без выраженных деструктивных нарушений. Не зафиксировано деформации и разрушения биоматериала, врастания в него соединительной или костной тканей на конечный срок эксперимента 9 мес.

Образцы, изготовленные из исследованного полилактида характеризуются высокими остеокондуктивными и остеointегративными

свойствами, обладают биосовместимостью с костной тканью.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Список литературы

1. Использование современных синтетических материалов при замещении костных дефектов методом индивидуальной контурной пластики / Т. З. Мамуладзе, В. А. Базлов, В. В. Павлов, М. А. Садовой // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. — 2016. — № 11. — С. 451–455.
2. Properties and medical applications of polylactic acid: A review / K. Hamad, M. Kaseem, H. W. Yang [et al.] // eXPRESS Polymer Letters. — 2015. — Vol. 9 (5). — P. 435–455. — DOI: 10.3144/expresspolymlett.2015.42.
3. Севастьянов В. И. Биоматериалы для искусственных органов / В. И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. — 2001. — № 3–4. — С. 123–131.
4. Биорезорбируемые полимеры в ортопедии и травматологии / В. А. Радченко, Н. В. Дедух, С. В. Малышкина, Л. М. Бенгус // Ортопедия, травматология и протезирование. — 2006. — № 3. — С. 116–124.
5. Farah S. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review / S. Farah, D. G. Anderson, R. Langer // Adv. Drug Deliv. Rev. — 2016. — Vol. 107. — P. 367–392. — DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.012>.
6. Savaris M. Influence of different sterilization processes on the properties of commercial poly (lactic acid) / M. Savaris, V. doc Santos, R. N. Brandalise // Mater. Sci. Eng. — 2016. — Vol. 69. — P. 661–667. — DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.031>
7. Biodegradable poly (lactic acid) polymers / R. K. Kulkarni, E. G. Moore, A. F. Hegyeli, F. Leonard // J. Biomed. Mater. Res. — 1971. — Vol. 5. — P. 169–181.
8. Mainil-Varlet P. J. Polylactides in orthopaedic surgery and their potential for the fixation of porotic bones [web source] / P. J. Mainil-Varlet // University of Groningen. — 1996. — P. 137–142. — Available from: <https://www.rug.nl/research/portal/files/14668781/File0025.PDF>.
9. Causes of the clinical tissue response to polyglycolide and polylactide implants with an emphasis on the knee / P. Tuompo, E. K. Paritio, H. Patiala [et al.] // Arch. Orthop. Trauma Surg. — 2001. — Vol. 121 (5). — P. 261–264. — DOI: <https://doi.org/10.1007/s004020000221>.
10. Biomedical applications of poly(lactic acid) / R. P. Pawara, S. U. Tekalea, S. U. Shisodia [et al.] // Recent Patents on Regenerative Medicine. — 2014. — Vol. 4 (1). — P. 40–51. — DOI: 10.2174/2210296504666140402235024.
11. Хонинов Б. В. Возможности применения биодеградируемых материалов в травматологии и ортопедии (обзор литературы) / Б. В. Хонинов, О. Н. Сергунин, П. А. Скороглазов // Вестник Российского государственного медицинского университета. — 2014. — № 1. — С. 20–24.
12. Are there any complications with bioabsorbable fixation devices? A 10 year review in orthognathic surgery / P. Laine, R. Kontio, C. Lindqvist, R. Suuronen // Int. J. Oral Maxillofac. Surg. — 2004. — Vol. 33 (3). — P. 240–244. — DOI: 10.1006/ijom.2003.0510.
13. Bioabsorbable materials in orthopaedics / G. M. Kontakis, J. E. Pagkalos, T. I. Tosounidis [et al.] // Acta Orthop. Belg. — 2007. — Vol. 73 (2). — P. 159–169.
14. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Страсбург, 18 березня 1986 року: офіційний переклад. — Київ : Парламентське видавництво, 2000. — URL: http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/994_137.
15. Закон України № 3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження». — Київ : Відомості Верховної Ради України, 2006. — URL: <http://zakon5.rada.gov.ua/laws/show/3447-15>.
16. NatureWorks LLC. Ingeo™ Biopolymer 4032D Technical Data Sheet. — URL: https://www.natureworkslc.com/~media/Files/NatureWorks/Technical-Documents/Technical-Data-Sheets/TechnicalDataSheet_4032D_general_pdf.pdf.
17. Саркисов Д. С. Микроскопическая техника / Д. С. Саркисов, Ю. Л. Перов. — М. : Медицина, 1996. — 542 с.
18. Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия / Г. Г. Автандилов. — М. : Медицина, 1990. — 381 с.
19. Albrektsson T. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration / T. Albrektsson, C. Johansson // Eur. Spine J. — 2001. — Vol. 10 (Suppl. 2). — P. S96–101. — DOI: <https://doi.org/10.1007/s005860100282>.
20. Гигантские клетки инородных тел и тканевые реакции на поверхности имплантатов / А. А. Должиков, А. Я. Колпаков, А. Л. Ярош [и др.] // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». — 2017. — № 3. — С. 86–94. — DOI: <http://dx.doi.org/10.21626/vestnik/2017-3/15>.
21. Биодеградируемые импланты в ортопедии и травматологии. Наш первый опыт / В. В. Агаджанян, А. А. Пронских, В. А. Демина [и др.] // Политравма. — 2016. — № 4. — С. 85–93.
22. Перебудова кістки навколо полілактиду, імплантованого у діафіз стегнової кістки / Н. В. Дедух, О. А. Нікольченко, В. Б. Макаров // Вісник проблем біології і медицини. — 2018. — Вип. 1, Том 1 (142). — С. 275–279. — DOI: 10.29254/2077-4214-2018-1-1-142-275-279.

Статья поступила в редакцию 16.05.2018

OSTEOREPARATION AROUND THE POLYLACTIDE, IMPLANTED INTO THE METADIAPHYS DEFECT OF THE FEMUR (EXPERIMENTAL STUDY)

V. B. Makarov¹, N. V. Dedukh², O. A. Nikolchenko³

¹ SE «Specialized Multidisciplinary Hospital № 1 of the Ministry of Health of Ukraine», Dnipro

² SI «Institute of Gerontology named after D. F. Chebotarev of NAMS Ukraine», Kyiv

³ Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv

✉ Vasyly Makarov, PhD in Orthopaedics and Traumatology: vasylmakarov2010@gmail.com

✉ Ninel Dedukh, Dr. Biol. Sci., Prof.: dedukh_ninel@ukr.net

✉ Olga Nikolchenko, PhD in Biol. Sci.: o_nikolchenko@ukr.net