

## **Сравнительная количественная оценка репаративного процесса при имплантации биокомпозиционных материалов в костные дефекты**

**И.А. Талашова, Е.В. Осипова, Н.А. Кононович**

### **Comparative quantitative evaluation of reparative process for implantation of biocomposition materials into bone defects**

**I.A. Talashova, E.V. Osipova, N.A. Kononovich**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. академика Г. А. Илизарова» Минздрава России, г. Курган (директор — д.м.н. А.В. Губин)

Изучено влияние имплантационных материалов на основе кальцийфосфатных соединений (КФС), выделенных из зрелой бычьей компактной костной ткани, в состав которых для улучшения остеоиндуцирующих свойств вводили органический матрикс, полученный из бычьей костной ткани, а также полипептидные факторы роста, выделенные из сыворотки крови животных с активным остеогенезом, – сывороточные белки. Животные были разделены на пять групп: 1) без имплантации; 2) костные дефекты заполняли КФС; 3) костные дефекты заполняли биокомпозитом, в состав которого входили КФС и органический матрикс; 4) костные дефекты заполняли биокомпозитом, включающим КФС и сывороточные белки; 5) костные дефекты заполняли биокомпозитом, содержащим КФС, органический матрикс и сывороточные белки. Результаты рентгенологического исследования и динамики оптической плотности тени дефекта на оцифрованных изображениях рентгенограмм показало, что внесение имплантационных материалов на основе КФС в композиции как с органическим матриксом, так и сывороточными белками способствовало возмещению дефектов.

**Ключевые слова:** дырчатые дефекты, кальцийфосфатное соединение, органический матрикс, сывороточные белки, компьютерный анализ изображений рентгенограмм, аппаратно-программный комплекс «ДиаМорф».

The authors have studied the effect of implantation materials based on calcium-phosphate compounds (CPhC), isolated from mature bovine compact bone tissue, into which both organic matrix derived from bovine bone tissue and polypeptide growth factors isolated from serum of animals with active osteogenesis – serum proteins, were injected to improve osteoinduction properties. Animals were divided into five groups: 1) that without implantation; 2) that where bone defects were filled with CPhC; 3) where bone defects were filled with biocomposite having CPhC and organic matrix in its composition; 4) where bone defects were filled with biocomposite including CPhC and serum proteins; 5) where bone defects were filled with biocomposite containing CPhC, organic matrix and serum proteins. The results of x-ray study and those of the dynamics of defect shadow optical density by the digitized x-ray images have demonstrated that addition of CPhC-based implantation materials composed with both organic matrix and serum proteins contribute to defect filling.

**Keywords:** perforated defects, calcium-phosphate compound, organic matrix, serum proteins, computer analysis of x-ray images, "DiaMorph" hard- and software complex.

Проблема возмещения дефектов костной ткани остается одной из актуальных задач современной медицины. Для ее решения применяют различные имплантационные материалы, однако среди них нет идеально совпадающих по своему составу и свойствам с нативной костной тканью [1, 2, 8, 12, 13, 14].

Известно, что основным компонентом неорганического костного матрикса являются кальцийфосфатные соединения (КФС), которые относятся к группе естественных метаболитов костной ткани и обладают способностью активизировать структурно-функциональные механизмы перестройки костной ткани [1, 8].

Нами разработаны технологии получения имплантационных материалов на основе кальцийфосфатных соединений, выделенных из зрелой

бычьей компактной костной ткани. Известно, что коллаген составляет около 90 % органического матрикса (ОМ) костной ткани и обладает способностью индуцировать ее регенерацию [9]. Поэтому для улучшения остеоиндуцирующих свойств разработанных имплантационных материалов в их состав вводили органический матрикс, полученный из бычьей костной ткани, а также полипептидные факторы роста, выделенные из сыворотки крови животных с активным остеогенезом – сывороточные белки (СБ) [4, 5, 9].

Цель нашего исследования – с помощью компьютерного анализа изображений рентгенограмм сравнить влияние состава биокомпозиционных материалов на течение репаративного процесса при возмещении дефектов костной ткани.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Имплантационные материалы изготавливали по технологии, разработанной в ФГБУ РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова [6, 7, 10, 11].

Эксперимент по имплантации выполнен на 20 взрослых беспородных собаках в возрасте от одного года до трех лет с массой тела  $9,9 \pm 1,0$  кг. В ходе эксперимента у опытных животных в стерильных условиях под общим наркозом создавали дырчатые дефекты в виде усеченных конусов диаметром 5 мм и глубиной 7 мм в проксимальных метафизах большеберцовых и плечевых костей и заполняли их разработанными композиционными материалами.

Экспериментальные исследования проводили, руководствуясь требованиями, изложенными в «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (1986 г.), с соблюдением этических норм и гуманного отношения к объектам изучения.

Животные были разделены на пять групп:

1) в первой группе в костные дефекты имплантационные материалы не вносили – группа без имплантации;

2) во второй – костные дефекты заполняли кальцийфосфатным соединением (КФС);

3) в третьей – биокомпозитом, в состав которого входили кальцийфосфатное соединение и органический матрикс (ОМ) – (КФС+ОМ);

4) в четвертой – биокомпозитом, включающим кальцийфосфатное соединение и сывороточные белки (СБ) – (КФС+СБ);

5) в пятой – биокомпозитом, содержащим кальцийфосфатное соединение, органический матрикс и сывороточные белки – (КФС+ОМ+СБ).

Для изучения влияния состава биокомпозиционных имплантационных материалов на течение

репаративного процесса при возмещении костных дефектов проводили рентгенографию оперированных конечностей до операции, в день операции, через 21 и 42 суток после операции. Оцифровку и анализ изображений рентгенограмм выполняли на аппаратно-программном комплексе «ДиаМорф» (Россия).

Для определения оптической плотности тени дефекта на оцифрованных изображениях рентгенограмм исследуемый участок выделяли стандартной прямоугольной рамкой и увеличивали в 3 раза. После этого выполняли высокочастотную фильтрацию, позволяющую повысить контрастность изображения и подчеркнуть границы дефекта. Интерактивно (с помощью «мыши») оконтуривали границы дефекта, полученный оверлейный контур копировали на исходное изображение. Затем удаляли изображение, находящееся вне контура, и в результате на экране оставался подлежащий анализу участок – изображение дефекта. Измеряли среднюю яркость тени дефекта, а также теней мягких тканей и фона изображения рентгенограммы на уровне дефекта. Полученные значения яркости использовали для расчета оптической плотности (ОП).

Для статистической обработки результатов использовали программы «Microsoft Excel – 97» и «AtteStat» Версия 1.0. [3].

Полученные данные при нормальном распределении представлены в виде среднего арифметического значения и стандартного отклонения, а в случае распределения, отличающегося от нормального, – в виде медианы и интерквартильного размаха. Для определения значимости различий между группами применяли t-критерий Стьюдента и критерий Вилкоксона. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На изображениях рентгенограмм, выполненных до операции, средняя ОП тени метафиза в предполагаемом месте создания дефекта составляла  $0,30 \pm 0,15$  усл. ед.

В день операции в группе без имплантации созданный дефект на рентгенограммах представлял собой окружность с четко выраженными ровными краями. ОП тени дефекта была в 2 раза ниже дооперационных значений и составляла  $51,4 \pm 23,0$  % ( $p < 0,001$ ) от ОП неповрежденного метафиза.

В группах с имплантацией материалов визуально на рентгенограммах в день операции в области дефекта наблюдали окружность высокой плотности с четкими, ровными контурами.

При анализе оцифрованных изображений рентгенограмм на этапах эксперимента наблюдали статистически значимое различие между значениями ОП теней дефектов, заполненных КФС, КФС+ОМ, КФС+СБ, КФС+СБ+ОМ, ОП не-

поврежденных участков метафиза и соответствующими показателями группы без имплантации (табл. 1).

К 21-м суткам после операции на рентгенограммах в группе без имплантации полость дефекта перекрывали облаковидные тени гомогенной структуры. Края дефектов становились менее четкими. ОП тени дефекта значительно увеличивалась по сравнению с показателями ОП в день операции, но оставалась значительно ниже показателей неповрежденного метафиза.

В группе КФС визуально наблюдали снижение плотности в периферических участках дефектов. В группах КФС+ОМ и КФС+СБ полость дефекта заполняли неравномерно расположенные тени разной плотности, в группе КФС+СБ+ОМ тени дефекта имели высокую плотность с отдельными участками просветления. Края дефектов во всех группах становились нечеткими.

Оптическая плотность тени дефекта на этапах эксперимента

| Группа          | Количество дефектов, n | Оптическая плотность тени дефекта, усл. ед. |                           |                           |
|-----------------|------------------------|---------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                 |                        | день операции                               | 21-е сутки после операции | 42-е сутки после операции |
| Без имплантации | 16                     | 0,15±0,07***                                | 0,22±0,08*                | 0,19±0,08**               |
| КФС             | 16                     | 0,23±0,07#                                  | 0,27±0,08#                | 0,21±0,01                 |
| КФС+ОМ          | 16                     | 0,17 (0,14;0,31)                            | 0,29±0,14                 | 0,32±0,03#                |
| КФС+СБ          | 16                     | 0,27±0,11##                                 | 0,28±0,09                 | 0,37±0,07#                |
| КФС+СБ+ОМ       | 16                     | 0,26±0,08##                                 | 0,27±0,09                 | 0,17±0,09*                |

Примечание: различия значимы по сравнению с неповрежденным участком метафиза: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001. Различия значимы по сравнению с группой без имплантации: # p<0,05; ## p<0,01.

ОП теней дефектов в группах КФС, КФС+ОМ увеличивалась, а в группах КФС+СБ, КФС+СБ+ОМ не изменялась по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. Установлены статистически значимые различия между показателями ОП тени дефектов, заполненных КФС, и группой без имплантации.

Через 42 суток после операции в группе без имплантации края дефекта были сглажены (рис. 1, б). ОП тени дефекта снижалась, по сравнению с предыдущим сроком наблюдения, до 0,19 ± 0,08 усл. ед. (p < 0,01) и была статистически значимо в 1,6 раза меньше ОП тени неповрежденного участка диафиза.

В группах с имплантацией КФС (рис. 1, в) и КФС+СБ+ОМ (рис. 1, е) на рентгенограммах контуры дефектов слабо определялись или были заметно сглажены. Полости дефектов перекрывали тени гомогенной структуры, имеющие более низкую плотность по сравнению с днем операции. В группах КФС+ОМ (рис. 1, г) и КФС+СБ (рис. 1, д) в одних случаях четкая граница полости дефекта отсутствовала, в других отмечали уменьшение диаметра области дефекта, ограниченной волнообразными краями. В полости дефекта наблюдали неоднородные тени, плотность которых приближалась к плотности прилежащих неповрежденных участков метафиза.

ОП тени дефектов в группах КФС и КФС+СБ+ОМ снижалась, при этом в последней она статистически значимо отличалась от показателей неповрежденного метафиза. В группах КФС+ОМ и КФС+СБ, напротив, ОП теней дефектов увеличива-

лась и значимо отличалась от показателей группы без имплантации.

Таким образом, результаты исследования показали, что в группе без имплантации к 42-м суткам после операции полноценного заполнения дефекта костной тканью не происходило, о чем свидетельствуют статистически значимые различия между значениями ОП теней дефектов в группе без имплантации и участка неповрежденного метафиза.

Изменения ОП на этапах эксперимента в группе КФС+СБ+ОМ напоминали динамику ОП при заполнении дефектов КФС, когда ОП теней дефектов повышалась к 21-м суткам и снижалась к 42-м суткам после операции.

Для групп, в которых к КФС добавляли только ОМ, характерна другая динамика ОП: ее постепенное повышение к концу периода наблюдения. При этом показатели ОП в группах КФС+ОМ были статистически значимо выше значений группы без имплантации в соответствующие сроки эксперимента.

В группе КФС+СБ ОП тени дефекта увеличивалась только к 42-м суткам после операции, при этом через 21 сутки после операции она не изменялась, оставаясь на уровне значений в день операции.

Необходимо отметить, что значения ОП теней дефектов в группах КФС, КФС+ОМ и КФС+СБ на всех сроках эксперимента, а в группе КФС+СБ+ОМ - в день операции и через 21 сутки после нее, не имели статистически значимых различий с показателями неповрежденного метафиза.



Рис. 1. Рентгенограммы плечевых костей экспериментальных животных: а – неповрежденный метафиз; б – в день операции после имплантации КФС; через 42 суток после имплантации: в – без имплантации; г – КФС; д – КФС+ОМ; е – КФС+СБ; ж – КФС+ОМ+СБ

## ВЫВОДЫ

Суммируя приведенные выше результаты рентгенологического исследования и динамики оптической плотности тени дефекта на оцифрованных изображениях рентгенограмм, можно сделать следующее заключение. В группе без имплантации к концу опыта возмещение дефекта не происходило, о чем свидетельствуют показатели ОП тени дефекта, которые были статистически значимо ( $p < 0,01$ ) меньше ОП тени неповрежденного участка диафи-

за. Внесение имплантационных материалов на основе кальцийфосфатных соединений, выделенных из костной ткани сельскохозяйственных животных, в композиции как с ОМ, так и СБ способствовало возмещению дефектов, что подтверждается данными компьютерного анализа изображений рентгенограмм – плотность тени области дефекта к концу эксперимента не имела значимых отличий от плотности участка неповрежденного метафиза.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Активизация репаративного остеогенеза с помощью биоактивных резорбируемых материалов - кальцийфосфатной биокерамики и комплексного препарата Коллапан / Г. Н. Берченко [и др.] // Ортопедия, травматология и протезирование. 2000. № 2. С. 96.
2. Безруков В. М. Гидроксипатит как субстрат для костной пластики: теоретические и практические аспекты проблемы // Стоматология. 1996. № 3. С. 7-12.
3. Гайдышев И. П. Решение научных и инженерных задач средствами Excel, VBA и C/C++. СПб.: БХВ - Петербург, 2004. 512 с.
4. Десятниченко К. С., Ларионов А. А., Лунева С. Н. // Паллиатив. медицина и реабилитация. 1998. № 2-3. С. 179-180.
5. Соловьев Г. С. Факторы стимуляции регенераторных процессов хрящевой и костной ткани // Эпителий и соединительная ткань в нормальных, экспериментальных, патологических условиях : тез конф. морфологов Сибири. Тюмень, 1983. С. 228-230.
6. Талашова И. А., Силантьева Т. А. Качественный и количественный состав имплантационных кальцийфосфатных материалов // Успехи совр. естествознания. 2007. № 11. С. 5-9.
7. Талашова И. А., Силантьева Т. А. Лабораторное выделение кальцийфосфатных соединений из костной ткани крупного рогатого скота и определение их состава методом электронно-зондового микроанализа // Гений ортопедии. 2007. № 4. С. 71-75.
8. Щепеткин И. А. Кальцийфосфатные материалы в биологических средах // Успехи совр. биологии. 1995. Т. 115, вып. 1. С. 58-73.
9. Щепеткин И. А. Полипептидные факторы остеогенеза // Успехи совр. биологии. 1994. Т. 114, вып. 4. С. 454-466.
10. Способ выделения коллагена из костной ткани сельскохозяйственных животных : пат. 2288729 Рос. Федерация. № 2003134131/15 ; заявл. 24.11.03 ; опубл. 10.12.06, Бюл. №34. 3 с.
11. Биоимплантат для возмещения дефектов минерализованных тканей и способ его получения : пат. 2311167 Рос. Федерация. № 2005100254 ; заявл. 11.01.05 ; опубл. 27.11.07, Бюл. №33. 3 с.
12. Viable bone formation in porous hydroxyapatite: marrow cell-derived in vitro bone on the surface of ceramics / T. Yoshikawa [et al.] // J. Biomed. Mater. Eng. 1997. Vol. 7, No 1. P. 49-58.
13. Vuola J., Taurio R., Goransson H. Compressive strength of calcium carbonate and hydroxyapatite implants after bone-marrow-induced osteogenesis // Biomaterials. 1998. Vol. 19, No 1-3. P. 223-227.
14. Williams C., Meyers J., Robinson R. Hydroxyapatite augmentation of the anterior portion of the maxilla with a modified transpositional flap technique // Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. 1991. Vol. 72, No 4. P. 395-399.

Рукопись поступила 08.02.2010.

## Сведения об авторах:

1. Талашова Ирина Александровна – ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздравсоцразвития, г. Курган, клинично-экспериментальный лабораторный отдел, старший научный сотрудник, к.б.н.
2. Осипова Елена Владимировна – ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздравсоцразвития, г. Курган, научно-клиническая лаборатория микробиологии и иммунологии, старший научный сотрудник, к.б.н.
3. Кононович Наталья Андреевна – ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздравсоцразвития, г. Курган, лаборатория коррекции деформаций, удлинения конечностей, старший научный сотрудник, к.в.н.