

Изучение в эксперименте специфического действия лекарственного препарата на основе нанокристаллического «Геля гидроксиапатита» при переломе длинной трубчатой кости

Анализ данных специализированных литературных источников и собственный клинический опыт позволяет отметить, что, несмотря на значительные достижения клинической и экспериментальной травматологии проблема нарушения процессов консолидации костной ткани после перелома кости (псевдоартрозы, длительное несращение) все еще остаётся актуальной. Большая медико-социальная значимость данной проблемы обусловлена не только значительным количеством случаев неудач при лечении переломов, в первую очередь большой берцовой кости, но и длительными сроками лечения, высокой стоимостью лечения, значительной частотой выхода на первичную инвалидность [1,2,3,4,5]. В связи с этим можно наблюдать активный поиск новых методов решения данной проблемы [12,13].

В последнее время большой интерес для специалистов представляют материалы созданные на основе основного ортофосфата кальция $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, известного также под названием гидроксиапатит (ГА), который является главной неорганической составляющей костной и зубной тканей живого организма [6]. По своим физико-химическим свойствам и физиологическим реакциям в организме синтетический мелкодисперсный кристаллический гидроксиапатит можно сравнить с неорганическим компонентом костной ткани: он характеризуется высокой химической чистотой и строгой стехиометрической однообразностью. В эксперименте на культуре остеобластов *in vitro* было установлено, что синтетические препараты активизируют функциональную и пролиферативную активность этих клеток [11]. Вместе с тем, работами отечественных и зарубежных учёных было доказано, что физико-химические свойства и биологическая активность данных материалов могут существенно варьироваться в зависимости от способа их получения, а значит имеются пути повышения их эффективности, как стимулятора репаративного остеогенеза [7,8]. В Институте общей и неорганической химии НАН Беларуси с использованием оригинальной методики был синтезирован и в настоящее время выпускается РУП «Белмедпрепараты» лекарственный препарат аналогичного характера – «Гель гидроксиапатита». «Гель гидроксиапатита» рекомендован для применения в стоматологической и травматологической практике при лечении кист и переломов верхней и нижней челюсти, свежих переломов трубчатых костей, ложных суставов и длительно не срастающихся переломов. Метод синтеза данного препарата основан на осаждении гидроксиапатита из водных растворов хлористого кальция $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ концентрацией 0,08-0,63 моль/л. и двузамещенного фосфата аммония $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ концентрацией 0,06-0,23 моль/л. в щелочной среде. Это позволило получить гидроксиапатит высокой степени чистоты (99,9%), практически без наиболее часто сопровождающих примесей трикальцийфосфата, оксида кальция, карбоната кальция, далита и других [7,8]. Полученный по такому методу, нанокристаллический

гидроксиапатит является термодинамически нестабильным, и, следовательно, предполагает большую биологическую активность, поскольку при взаимодействии с биологическими жидкостями, будучи вовлеченным в процессы остеогенеза, может с большей легкостью трансформироваться в ионы кальция и фосфата [9,10].

В связи с тем, что изучение специфической активности лекарственного препарата «Гель гидроксиапатита» в условиях металлоостеосинтеза перелома длинной трубчатой кости не производилось, было принято решение о проведении настоящего экспериментального исследования¹. В качестве объекта доклинических исследований были выбраны белые беспородные крысы обоего пола стадного содержания вивария ЦНИЛ БелМАПО с исходной массой 150-220 грамм.

Выбор белых крыс в качестве объекта эксперимента был обусловлен тем, что большинство работ по изучению биологической активности различных имплантационных материалов проводится именно на этом виде лабораторных животных. Это позволяет сопоставлять результаты собственных исследований с данными других авторов. При этом принимался так же во внимание и тот факт, что данный вид животных хорошо изучен, а их стоимость относительная низкая. Для эксперимента отбирались половозрелые особи однородные по размерам, массе, внешнему виду, без видимых признаков какой-либо патологии, с гладкой шерстью, без аномалий в поведении и потреблении воды и кормов. Животных, общим количеством 48 особей, взвешивали на электронных весах, затем формировали три контрольные и три опытные группы, каждую из групп по восемь голов в каждой, помещали в отдельную клетку, где животные находились в стандартной обстановке, в условиях оптимального микроклимата и режима питания.

Исследования по изучению специфической активности данного лекарственного средства проводились с использованием модели перелом-дефекта большой берцовой кости задней лапы крысы. Обезболивание и обездвиживание животных достигались использованием смеси растворов фентанила-0,005% и дроперидола-0,25% в дозах 0,1мл/100 г массы и 0,2 мл/100 г массы тела соответственно. После инъекции этих препаратов животные укладывались спиной вниз на стерильную дощечку прямоугольной формы с вбитыми по углам гвоздями, к которым привязывались резинки с резиновыми

Примечание: 1 - экспериментальные исследования выполнялись в рамках заданий ГНТП «Новые лекарственные средства» и ОНТП «Реабилитационные технологии»

кольцами на конце. Последними фиксировали передние и задние лапки крысы. Далее крыса обкладывалась стерильными салфетками с оставлением непокрытым операционного поля (левая задняя лапка). Разрез кожи длиной около двух сантиметров производился в проекции передне-внутренней поверхности большой берцовой кости, мягкие ткани тупо смещали в стороны и обнажали кость. Перелом воспроизводился путём перекусывания кости острыми кусачками Листона на уровне середины диафиза. Затем, проксимально и

дистально от линии перелома, стоматологическим бором формировалось продольное отверстие в передней стенке большой берцовой кости крысы размерами 2х6 мм и глубиной около 2мм. Таким образом, создавался дефект - «депо» ёмкостью в среднем около 20мм³ для внесения исследуемого препарата. На следующем этапе хирургического вмешательства в области бугристости большой берцовой кости при помощи бора формировалось круглое отверстие, через которое антеградно в костно- мозговой канал дистального отломка кости вводился фрагмент стерильной инъекционной иглы, выполняющий роль интрамедуллярной металлоконструкции. Отломки адаптировались, в результате чего достигался стабильный металлоостеосинтез костных отломков большой берцовой кости. В опытных группах животных, в сформированный костный дефект имплантировали исследуемый препарат, после чего рана послойно зашивалась кетгутом. Масса препарата, помещаемого в зону костного перелом-дефекта, была, в среднем, в пределах 2-3 мг. Данный объем введенного препарата пропорционально сопоставим с предполагаемыми объемами его использования в клинике. В контрольной группе сформированный костный перелом- дефект заполнялся кровяным сгустком.

В послеоперационный период осуществлялся визуальный контроль заживления раны, внешнего вида видимых слизистых, шерстного покрова, массы тела и общего состояния крыс обеих групп.

Непосредственно после операции общее состояние животных было удовлетворительным и соответствовало тяжести перенесенного оперативного вмешательства. Наблюдалось постепенное восстановление двигательных и поведенческих реакций, а так же реакции на внешние раздражители. В течение первых и вторых суток после оперативного вмешательства наблюдалось некоторое снижение двигательной активности, что было обусловлено наличием послеоперационной раны в области задней лапы. Однако горизонтальная, а затем и вертикальная (стойки, прыжки) двигательная активность практически полностью восстанавливалась к третьим-четвертым суткам после оперативного вмешательства. У всех животных опытной и контрольной групп не отмечалось полного отсутствия двигательной активности, а также отказа от пищи и питья. При исследовании местного статуса на протяжении двух- трёх суток после операции наблюдался умеренно-выраженный отёк тканей оперированной конечности. К четвёртым- пятым суткам после оперативного вмешательства общее состояние животных было практически идентичным таковому до операции. На протяжении всего послеоперационного периода не было отмечено несостоятельности швов, нагноения послеоперационной раны, а так же других признаков воспалительной реакции ни у одного из животных опытной и контрольной групп. Послеоперационная рана заживала в течение 8-10 суток первичным натяжением, без осложнений.

Специфическая биологическая активность препарата «Гель гидроксиапатит» оценивалась при помощи метода световой микроскопии костных препаратов. Животные выводились из эксперимента передозировкой тиопентала на 14-е, 28 и 56 сутки после операции, большая берцовая кость отделялась от мягких тканей и надкостницы, из костно- мозгового канала удалялся фрагмент инъекционной иглы, кость заворачивалась в марлю и маркировалась. Предназначенные для

исследования участки кости крысы фиксировали в 10% нейтральном формалине в течение 48 часов. Декальцинацию проводили 5% азотной кислотой. Затем промывали в проточной воде в течение 24 часов, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации (70, 80, 96, абсолютный спирт). Далее материал проводили через спирт-хлороформ, хлороформ, хлороформ-парафин и заливали в парафин. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 4-5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Изучение микропрепаратов и изготовление микрофотографий проводилось с помощью микроскопа DMLS с программным обеспечением («Leica», Германия)2.

В результате исследования были получены следующие данные.

В микропрепаратах животных контрольной группы, выведенных из опыта на 14-е сутки после перелома наблюдалась картина начальных этапов консолидации костных отломков по типу вторичного заживления. Отломки кости смещены относительно друг друга по поперечной оси. Эндостальная часть костной мозоли представлена тонкопетлистой волокнистой соединительной тканью и относительно небольшими участками гиалиновой хрящевой ткани.

Встречаются изолированные, узелкового вида группы хрящевых клеток.

Хрящевые клетки расположены очагово, в состоянии деструкции, очаговая кистозная трансформация хрящевых клеток. Сосудистая сеть

Примечание: 2 - автор выражает глубокую благодарность сотрудникам группы морфологических исследований ЦНИЛ БелМАПО за содействие в проведении данных исследований

хрящевой ткани мало развита. В толще рыхлой волокнистой соединительной ткани инкапсулированные отломки кости с начинающейся резорбцией некротических участков (рис.1). Наружная часть мозоли (периостальная) выражена слабо, участки малоклеточной ретикулофиброзной ткани чередуются с полями рыхлой волокнистой соединительной ткани. Пучки коллагеновых волокон в периостальной мозоли ориентированы беспорядочно. В губчатой кости - лакунарная и гладкая резорбция костных балок (рис.2). По краям костных балок группы остеобластов с вытянутыми гиперхромными ядрами.

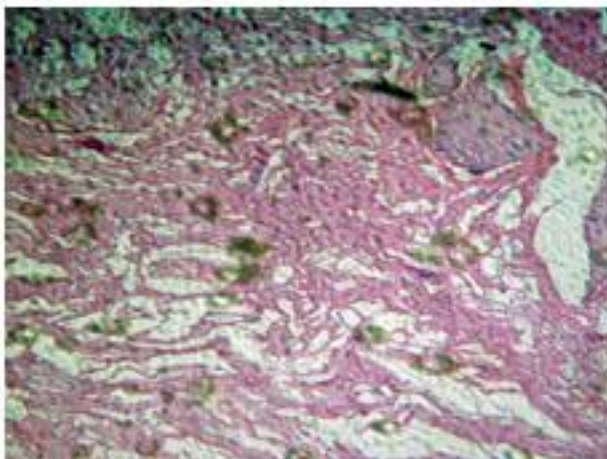


Рис. 1 Окраска гематоксилином и эозином, 100-кратное увеличение. Контрольная группа, 14-е сутки.

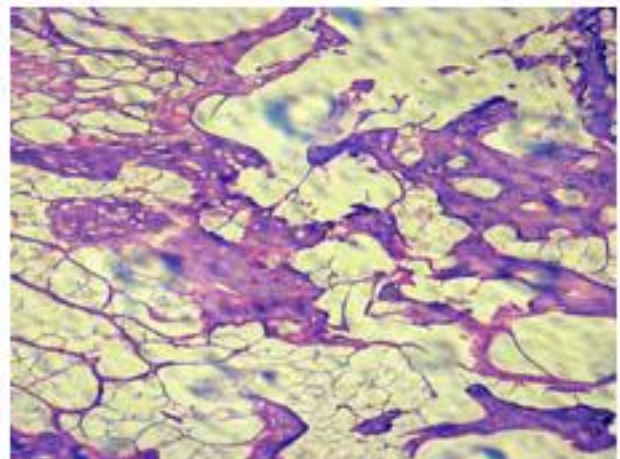


Рис. 2 Окраска гематоксилином и эозином, 200-кратное увеличение. Контрольная группа, 14-е сутки.

В отдельных случаях у края отломков располагались остеокласты. Внутренняя и наружная части костной мозоли умеренно выражены. Пласты хондроцитов в эндостальной части окружают расширенные кровеносные сосуды. Участки оксифилии ретикулофиброзной ткани. Признаков воспаления не отмечено.

В микропрепаратах животных опытной группы, выведенных из опыта на 14-е сутки после перелома также наблюдалась картина консолидации костных отломков по типу вторичного заживления. Отломки кости смещены относительно друг друга по поперечной оси. В формировании костной мозоли принимают участие рыхлая малоклеточная тонкопетлистая соединительная ткань, гиалиновый хрящ, густоклеточная фиброзная ткань, ретикулофиброзная костная ткань (рис.3). Очаги некротического детрита, инкапсулированные фрагменты костных отломков. В толще эндостальной части мозоли обширные поля гиалинового хряща, окружающие расширенные кровеносные сосуды, преимущественно вены (рис.4). Наружные хондроциты небольшие с уплощенными ядрами, образуют группы в отличие от внутренних, расположенных изолированно вокруг сосудов. Очаги хондрификации костных балок (рис.5). Лакунарная резорбция костных балок губчатой кости. Признаки воспаления отсутствуют.

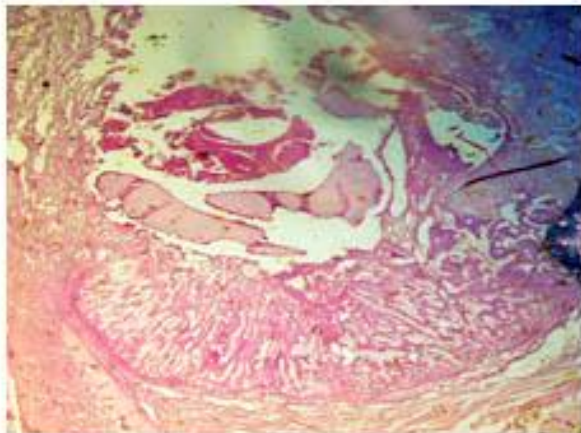


Рис. 3 Окраска гематоксилином и эозином, 35-кратное увеличение. Опытная группа, 14-е сутки.

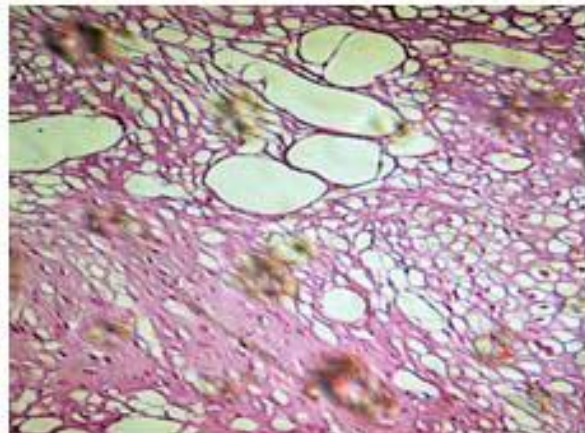


Рис. 4 Окраска гематоксилином и эозином, 200-кратное увеличение. Опытная группа, 14-е сутки.

У части животных опытной группы размеры костной мозоли значительно превышают таковые у крыс контрольной группы, в основном, за счет объемного увеличения хрящевой ткани. Отмечается гладкая и лакунарная резорбция балок губчатой кости, по краям костных балок – единичные или группы остеокластов (рис.6). В толще гиалинового хряща – участки оксификации (оксифилия, формирование тонкостенных сосудов, новообразованные первичные костные балки).

Таким образом, сращение костных отломков у животных обеих групп шло через формирование хрящевой ткани по типу вторичного заживления, но в опытной группе площадь костной мозоли превышала таковую в контрольной и уже отмечались признаки оксификации хряща (формирование тонкостенных сосудов в толще гиалинового хряща, оксифилия и гомогенизация соединительной ткани).

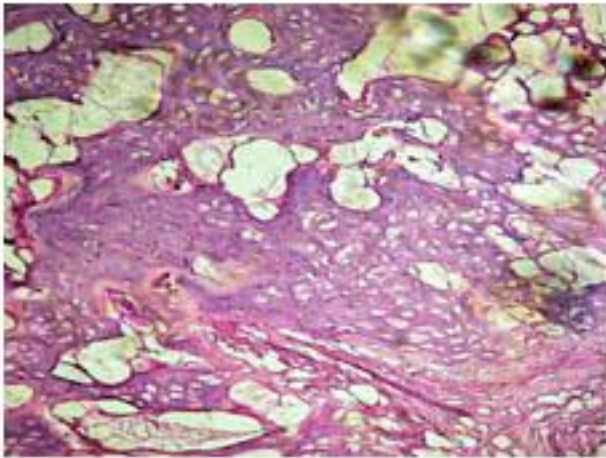


Рис. 5 Окраска гематоксилином и эозином, 200-кратное увеличение. Опытная группа, 14-е сутки.

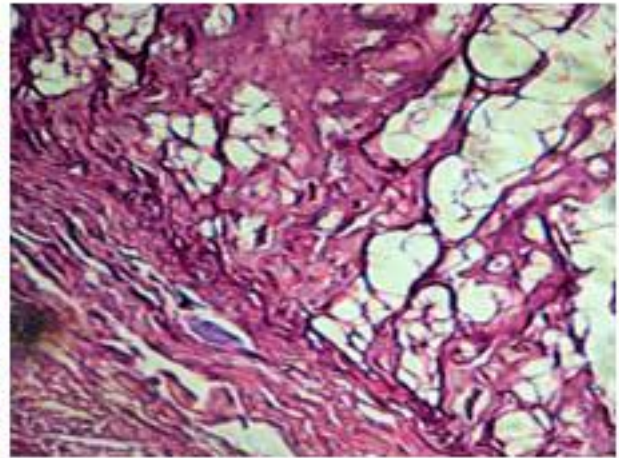


Рис. 6 Окраска гематоксилином и эозином, 400-кратное увеличение. Опытная группа, 14-е сутки.

В микропрепаратах животных контрольной группы, выведенных из опыта на 28-е сутки после перелома, наблюдаемая костная мозоль состоит из эндостальной (более объемной) и периостальной частей (рис.7). Со стороны надкостницы отмечается замещение концевых отделов костных балок рыхлой волокнистой соединительной тканью. Участки хрящевой ткани с относительно небольшим количеством тонкостенных новообразованных сосудов в эндостальной части костной мозоли. Наблюдаются небольшие очаги ретикулофиброзной костной ткани со стороны эндоста и периоста. Участки некроза субкортикальной губчатой кости с фрагментацией костных балок. Гладкая и клеточная резорбция костных балок.

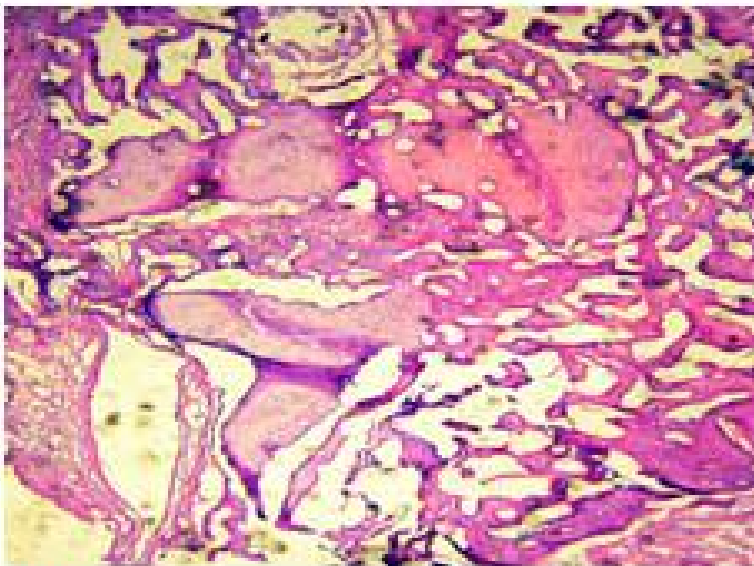


Рис. 7 Окраска гематоксилином и эозином, 50-кратное увеличение. Контрольная группа, 28-е сутки.

Имеет место увеличение количества остеокластов, располагающихся одиночно и группами на границе хрящевой ткани и новообразованной ретикулофиброзной костной ткани. В толще хряща – пучки соединительной ткани, ориентированные беспорядочно. Очаги умеренного воспаления в камбиальном слое периоста. В микропрепаратах животных опытной группы, выведенных из опыта на 28-е сутки после перелома, определяются участки некротического детрита с инкапсулированными и резорбирующимися фрагментами пластинчатой кости среди костных отломков (рис.8). Обширные зоны плотной малоклеточной (фиброзной ткани), содержащей многочисленные группы расширенных тонкостенных сосудов веноулярного типа. Зоны ретикулофиброзой костной ткани преобладают, в отличие от контроля, где наблюдается преобладание гиалиновой хрящевой ткани. Костные балки новообразованной ретикулофиброзной ткани формируются и разрушают гиалиновый хрящ (рис.9). Отмечаются располагающиеся по периферии балок и в толще гиалинового хряща остеобласты полигональной формы с крупными гипохромными ядрами (рис.10). В первичных балках отмечались единичные хондроциты. Признаков воспалительной инфильтрации не выявлено. Коллагеновые волокна во внутренней части мозоли ориентированы параллельно костным отломкам. Размеры костной мозоли меньше, чем у животных контрольной группы. Отмечается гладкая и лакунарная резорбция губчатой кости, замещение (со стороны эндоста) хрящевой ткани участками ретикулофиброзной, оксифильной с формирующимися костными балками тканью. Таким образом, на 28 сутки у крыс опытной группы в костной мозоли уже преобладала ретикулофиброзная костная ткань над хрящевой, в то время как у крыс контрольной группы в составе костной мозоли ещё наблюдалось доминирование хрящевой.

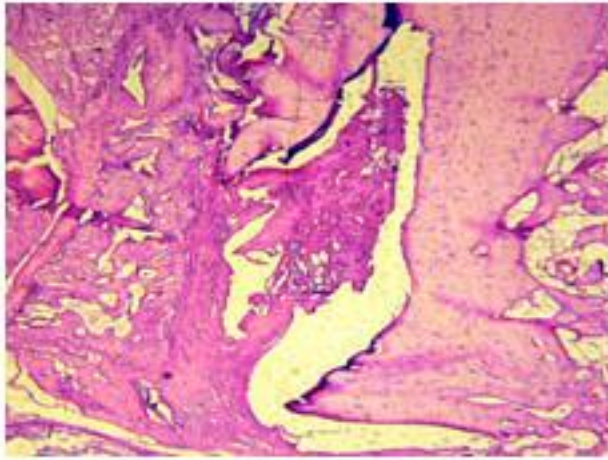


Рис. 8 Окраска гематоксилином и эозином, 50-кратное увеличение. Опытная группа, 28-е сутки.

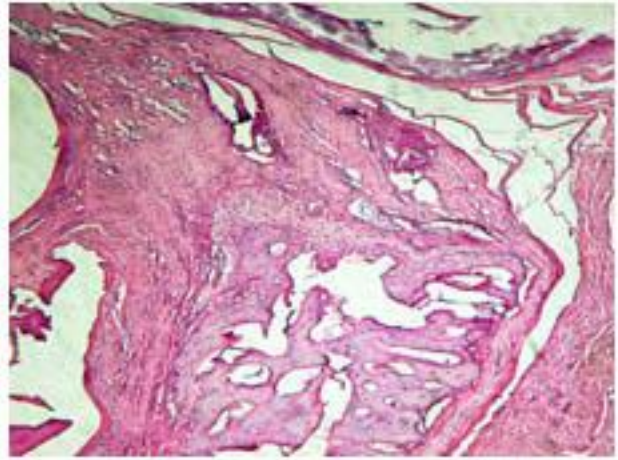


Рис. 9 Окраска гематоксилином и эозином, 100-кратное увеличение. Опытная группа, 28-е сутки.

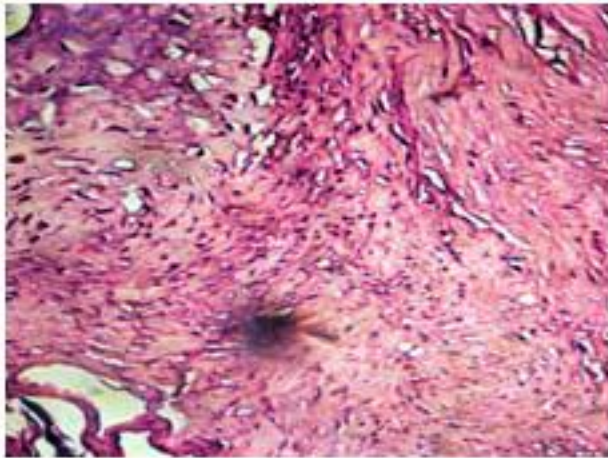


Рис. 10 Окраска гематоксилином и эозином, 400-кратное увеличение. Опытная группа, 28-е сутки.

В микропрепаратах животных контрольной группы, выведенных из опыта на 56-е сутки после перелома наружная часть костной мозоли представлена фиброзной малососудистой тканью, балки губчатой кости с участками без остеоцитов (рис.11). Новообразованная костная ткань содержит большое количество тонкостенных сосудов, остеобласты и остеокласты визуализируются плохо. Прослеживаются небольшие участки хрящевой ткани, между костными балками отмечается формирование жировой ткани. В межотломковой зоне – грубая волокнистая малоклеточная соединительная ткань с очагами хрящевой ткани с признаками обызвествления. Сосуды микроциркуляторного русла в формирующейся костной ткани в основном веноулярного типа, относительно немногочисленные. Отмечается формирование первичных остеонов с неупорядоченным расположением (формирование пластинчатой кости в месте

перелома). В толще соединительной ткани наблюдаются инкапсуляция некротизированных костных фрагментов и отдельных групп хондроцитов.

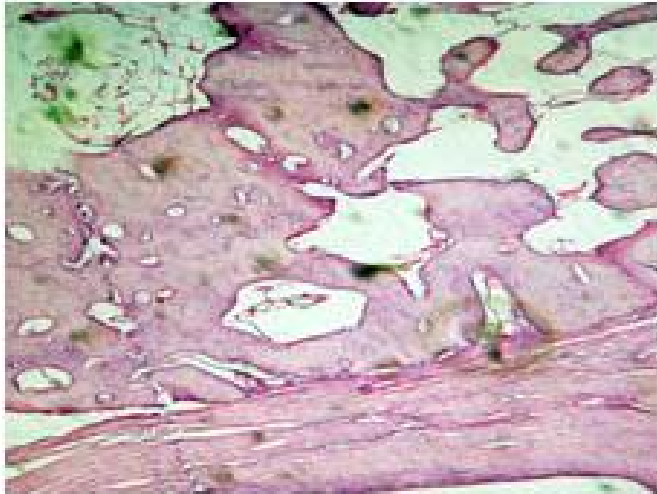


Рис. 11 Окраска гематоксилином и эозином, 100-кратное увеличение. Контрольная группа, 56-е сутки.

Определяются обширные очаги широкопетлистой ретикулофиброзной костной ткани в зоне перелома. Участки инкапсуляции некротизированных костных фрагментов. Формирование первичных мелких остеонов с многочисленными остеócитами и узкими гаверсовыми каналами.

В микропрепаратах животных опытной группы, выведенных из опыта на 56-е сутки после перелома, эндостальная часть костной мозоли состоит из новообразованной костной ткани. Ретикулофиброзная костная ткань, соединяющая отломки, в состоянии репаративной регенерации (рис.12), с обилием остеокластов в толще соединительной ткани, активно пролиферирующих остеобластов по периферии костных балок (рис.13), в то время как в новообразованной костной ткани крыс контрольной группы остеобласты и остеокласты визуализируются плохо. Сосудистая сеть хорошо развита. Вокруг кровеносных сосудов отмечается формирование первичных остеонов. Между костными балками – разрастание жировой ткани, формирование новых кровеносных сосудов. Определяется процесс формирования структур, сходных по архитектонике с остеонами, расположенных неупорядоченно. Формирование мелких гаверсовых каналов.

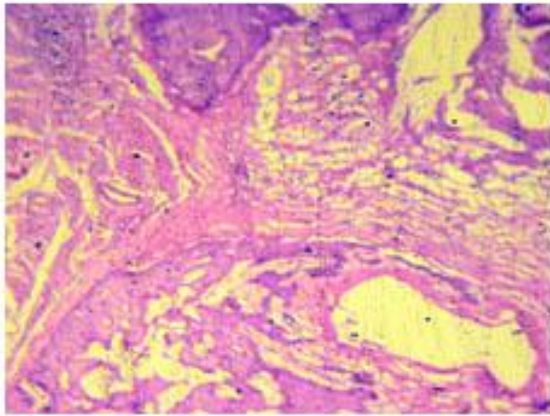


Рис. 12 Окраска гематоксилином и эозином, 50-кратное увеличение. Опытная группа, 56-е сутки.

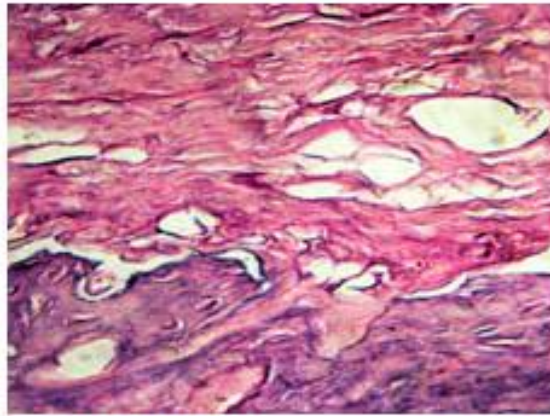


Рис. 13 Окраска гематоксилином и эозином, 400-кратное увеличение. Опытная группа, 56-е сутки.

В межотломковой зоне – ретикулофиброзная костная ткань, обилие остеокластов, пролиферирующих остеобластов, в отличие от контроля, где между отломками ещё наблюдается малоклеточная соединительная ткань с большим количеством очагов хрящевой ткани, а резорбция некротического детрита не завершена.

В нашем исследовании у животных опытной и контрольной групп сращение кости шло по типу вторичного заживления костной раны через стадию формирования хондроидной ткани с последующим замещением её костной тканью, однако, на всех этапах у крыс опытной группы наблюдались качественные и количественные признаки опережающих темпов формирования костной мозоли (размер мозоли, обилие клеточных элементов, скорость замены хрящевой ткани ретикулофиброзной костной, степень элиминации детрита и выраженность сосудистой сети и др.) над таковой в контроле.

ВЫВОДЫ.

1. Морфологическое исследование микропрепаратов контрольной и опытной групп позволило установить, что у всех животных соединение костных отломков шло по типу вторичного заживления – через формирование хрящевой ткани.
2. На 14 сутки эксперимента костная мозоль у животных опытной группы несколько превышала размеры таковой у животных контрольной группы за счет разрастания у крыс опытной группы гиалиновой хрящевой ткани. У крыс опытной группы отмечались признаки оссификации (формирование тонкостенных сосудов в толще гиалинового хряща, оксифилия и гомогенизация соединительной ткани).
3. На 28 сутки в опытной группе наблюдалось преобладание ретикулофиброзной костной ткани над хрящевой (характерной для более ранних этапов вторичного заживления кости), в отличие от контроля, где преобладал репаративный хондрогенез.
4. На 56 сутки у всех животных отмечалось формирование зон пластинчатой кости нормальной гистологической структуры, однако у животных опытной группы степень зрелости костной ткани преобладала над таковой у животных в

контрольной группе, а процессы резорбции некротического детрита уже были завершены.

5. Таким образом, введение в зону перелома препарата «Гель гидроксиапатит» способствует более ранней и полной регенерации костной ткани.

Литература

1. Результаты лечения псевдартрозов большеберцовой кости при погружном и внеочаговом остеосинтезе / Ю. И. Ежов [и др.] // Хирургия. 1999. № 9. С. 58–60.
2. Белоенко, Е. Д. Причины формирования несросшихся переломов и ложных суставов костей голени / Е. Д. Белоенко, А. Л. Линов // Медицинские новости. 2000. № 3. С. 68–70.
3. Эпидемиология псевдоартрозов в Нижегородском регионе / С. Е. Шафит [и др.] // Здоровоохранение Российской Федерации. 1999. № 2. С. 61–63.
4. Причины формирования несросшихся переломов и ложных суставов костей голени / Е. Д. Белоенко // Медицинские новости. 2000. № 3. С. 68–70.
5. Восстановительное лечение больных с нарушением процессов консолидации костей голени / М. Ф. Егоров, О. Г. Тетерин, Ю. А. Галишников // Медико-социальная экспертиза и реабилитация. 2000. № 4. С. 38–41.
6. Кочубинская, А. А. Влияние различных форм нанокристаллического гидроксиапатита высокой степени чистоты на процессы репаративной остеорегенерации в костных дефектах челюстей: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.21 / А. А. Кочубинская.
7. Биоактивные материалы на основе полученного различными методами гидрокси-апатита / А. И. Кулак [и др.] // Изв. бел. инженер. акад. 1997. № 1. С. 31–34.
8. Крутько, В. К. Синтез и физико-химические свойства нанокристаллического гидроксиапатита и композиционных материалов на его основе: автореф. ... дис. канд. хим. наук: 02.00.04 / В. К. Крутько; Ин-т общей и неорганической химии НАН Беларуси. Минск, 2006. 22 с.
9. Биосовместимость нового остеотропного препарата на основе биоактивного гидроксиапатита / И. А. Пищинский [и др.] // Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы: материалы Международ. конф. 2003. С. 206–208.
10. Остеогель – новый препарат для лечения костных ран: материалы Седьмого съезда фармацевтов Республики Беларусь «Фармация XXI века» / П. Т. Петров [и др.] // Витебск, 2004. С. 289–291.
11. Иванова, Е. В. Сравнительная оценка биологических свойств гидроксиапатита ультравысокой дисперсности остим-100 / Е. В. Иванова // Клинич. стоматология. 2000. № 2. С. 36–38.
12. Лазерные остеоперфорации в лечении несрастающихся переломов и ложных суставов костей конечностей / И. А. Привалов, А. В. Лапа, И. И. Шумилин // Лазерная медицина. 2007. № 1. С. 32–35.
13. Ферментная стимуляция остеогенеза при лечении несросшихся переломов и ложных суставов костей конечностей / В. И. Зоря [и др.] // Вестник травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова. 2007. № 2. С. 80–85.