



КОСТНО-ПЛАСТИЧЕСКИЕ БИОМАТЕРИАЛЫ И ИХ ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

И.А.Кирилова¹, В.Т. Подорожная¹, Е.В. Легостаева², Ю.П. Шаркеев², П.В. Уваркин², А.М. Аронов³

¹Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии

²Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск

³Сибирский научно-исследовательский и испытательный центр медицинской техники, Новосибирск

Цель исследования. Сравнительная оценка прочностных свойств и состава костно-пластических материалов после различных видов обработки.

Материал и методы. Исследовали образцы нативной (исходной) и депротеинизированной костной ткани. Прочностные свойства изучали путем одноосного статического растяжения образцов костной ткани с автоматической записью кривых нагружения. Из кривых растяжения были рассчитаны механические характеристики: предел пропорциональности, предел прочности, относительная деформация до разрушения и модуль Юнга. Изучены изменения морфологии поверхности костных материалов, элементного состава, габаритных размеров, сухого веса образцов в зависимости от вида обработки.

Результаты. Все образцы костной ткани имели малую величину деформации, не более 1 %, что характерно для хрупких материалов. Предел пропорциональности для нативной костной ткани равен 27 МПа, для депротеинизированной — 29 МПа. Предел прочности не зависит от вида предварительной химической обработки костной ткани и составляет 80–90 МПа. Наличие коллагена оказывает влияние на модуль Юнга, который для депротеинизированной костной ткани снижается в два раза и равен 110 МПа, а для костной ткани в исходном состоянии — 230 МПа. Рельеф поверхности образцов кости и поверхности излома более развит после депротеинизации.

Заключение. Изучение физико-механических свойств и состава образцов компактной кости позволяет получить представление о влиянии процесса обработки на структуру и свойства костной ткани.

Ключевые слова: костная ткань, депротеинизация, костная соломка, физико-механические свойства.

OSTEOPLASTIC BIOMATERIALS AND THEIR PHYSICAL AND MECHANICAL PROPERTIES

I.A. Kirilova, V.T. Podorozhnaya, E.V. Legostaeva, Yu.P. Sharkeev, P.V. Uvarkin, A.M. Aronov

Objective. To perform comparative study of composition and strength properties of osteoplastic biomaterials subjected to technological processing.

Material and Methods. Specimens of native (initial) and deproteinized bone tissue were analyzed. Strength properties of specimens were studied by single-axis static extension with automatic recording of load curves. Load-extension curves were used to calculate mechanical parameters: proportionality limit, strength limit, relative deformation before destruction, and the Young's module. Dependence between a processing type and changes in the surface morphology, element composition, overall dimensions, and dry weight of specimens was identified.

Results. All bone tissue specimens had small amount of deformation typical for fragile materials — 1 %. Proportionality limit for native bone tissue was 27 MPa, and that for deproteinized tissue — 29 MPa. Strength limit did bone on the type of chemical processing of tissue and had the value of 80–90 MPa. Collagen presence influenced the Young's module which was 110 MPa in deproteinized bone tissue, two-fold decreased from that in initial bone tissue (230 MPa). Topography of specimens and fracture surfaces were more pronounced after deproteinization.

Conclusion. The study of physical and mechanical properties and composition of compact bone specimens gives an understanding of processing type influence on bone tissue structure and properties.

Key Words: bone tissue, deproteinization, bone straw, physical and mechanical properties.

Hir. Pozvonoc. 2010;(1):81–87.

И.А. Кирилова, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник лабораторно-экспериментального отдела; В.Т. Подорожная, канд. мед. наук, зав. лабораторией консервации тканей; Е.В. Легостаева, канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотрудник лаборатории физики наноструктурных биокмполитов; Ю.П. Шаркеев, д-р физ.-мат. наук, проф., зав. той же лабораторией; П.В. Уваркин, вед. технолог той же лабораторией; А.М. Аронов, д-р экон. наук, директор по научно-техническому развитию.

Мечта человека использовать биологические ткани для восстановления целостности организма родилась в давние времена. Первой процедурой костной пересадки традиционно считается выполненная св. Дамианом и св. Козьмой в III в. пересадка кадаверного аллотрансплантата нижней конечности пациенту с опухолью ноги [20]. Понятно, что эта попытка осталась на страницах описаний как историческое событие, не имевшее какого-либо целебного успеха. Но это говорит о стремлении медицины к подбору «запасных» биологических частей для человека [6]. Прогресс человеческой мысли, развитие различных областей науки, таких, как физика, химия, биология, фармакология, анестезиология, хирургия, позволили в наше время вернуться к проблеме пересадки тканей. Для восстановления структурной целостности опорно-двигательного аппарата используются костно-пластические материалы (КПМ) [3, 6, 8, 9, 20, 21].

В нашем понимании костно-пластический, или остеопластический, материал — это материал, предназначенный для реконструктивно-восстановительных операций на костной ткани в различных областях хирургии: травматологии и ортопедии, челюстно-лицевой хирургии, костной онкологии и т.д. И закономерно, что такой материал готовят из костной ткани донора, которая, в свою очередь, может быть различной по строению: губчатой, кортикальной, губчато-кортикальной [6].

Костная ткань в зависимости от способа предварительной химической обработки может быть трех видов:

- нативная, с сохраненной костной структурой и соотношением органического и минерального компонентов;
- деминерализованная, лишенная минерального компонента органическая матрица кости;
- депротенинизированная, лишенная органического компонента кристаллическая решетка гидроксиапатита биологического происхождения.

Кроме способа воздействия, фрагменты кости отличаются по размерам и форме, которые придают материалу в ходе моделирования. Так, фрагменты кортикальной кости в зависимости от моделирования могут представлять собой фрагменты диафизов малоберцовой (локтевой, большеберцовой и др.) кости; кортикальные фрагменты — пластины из большеберцовой кости различных плоскостных размеров ($10,0 \times 2,0$ см или $3,0 \times 2,0$ см), толщина которых изменяется в зависимости от толщины кортикальной кости донора от 0,2 до 0,5 см; костная соломка — продольные распилы кортикальных фрагментов различной длины (чаще всего 10,0–12,0 см), ширины (0,1 до 0,3 см), толщины (0,2 до 0,5 см).

Материалы с различными свойствами и характеристиками необходимо использовать только в тех условиях, в которых эти характеристики являются самыми востребованными.

Наиболее частой причиной использования КПМ являются опухоли и опухолеподобные заболевания [3, 13]. Однако даже при лечении одной нозологии виды костных материалов и способы их использования различны. И связано это не только с величиной очага поражения, но и с расположением в сегментах скелета, с учетом биомеханической нагрузки, которую испытывает тот или иной сегмент опорно-двигательного аппарата.

М.В. Волков и В.А. Бизер [3] впервые описали методику костной пластики гомокостью при замещении дефектов костей. В качестве КПМ авторы использовали продольно расщепленные фрагменты кортикальной кости (кортикальной соломки или костной соломки) по типу вязанки хвороста. С использованием данной методики пролечено большое количество пациентов детского возраста. Наличие небольшого количества неудовлетворительных результатов в виде рецидивов подтолкнуло нас к разработке нового способа обработки компактной кости.

Литературные данные о влиянии формы и топографии поверхности

КПМ на реакцию тканей [2, 14, 19] навели на мысль сравнить данные показатели у ранее широко используемой нативной костной соломки и материала, полученного новым способом [8]. При условии биосовместимости материала местная реакция на инородное тело зависит от поверхностных свойств материала, формы имплантата, соотношения между площадью поверхности биоматериала и объемом имплантата.

Цель работы — сравнительная оценка прочностных свойств и состава костно-пластических материалов после различных видов обработки.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

- 1) изучение морфологии поверхности и элементного состава КПМ, подвергнутого различной технологической обработке;
- 2) исследование механических свойств нативной и депротенинизированной (деорганифицированной) аллокости (пределов пропорциональности, прочности, относительной деформации образца при растяжении и модуля Юнга);
- 3) изучение влияния процессов депротенинизации на физико-химические свойства костной соломки.

Материал и методы

Материалом для исследования служили образцы нативной и депротенинизированной костной ткани в виде соломки. Образцы нативной костной соломки в процессе предварительной подготовки претерпели обезжиривание и высушивание, а образцы депротенинизированной костной соломки — обезжиривание, депротенинизацию и высушивание [6, 8]. Количество образцов — 6 единиц каждого вида.

Морфология поверхности костных материалов исследована методом растровой электронной микроскопии (РЭМ) с приставкой «EDAX», которая использована для элементного анализа состава костной ткани. Исследуемые образцы костной ткани помещали на специальный углеродный токо-

проводящий скотч для обеспечения хорошего электрического контакта с предметным столиком микроскопа и для фиксации образцов при наклоне столика. Затем на исследуемую поверхность костной ткани наносили тонкую электропроводящую пленку путем распыления графита в условиях вакуумного поста. Элементный состав костных материалов выполнен путем анализа характеристических спектров рентгеновского излучения с учетом ZAF-коррекции.

Измерение габаритных размеров (длины, толщины и ширины) образцов нативной и депротеинизированной костной соломки осуществляли штангенциркулем. Измерение сухого веса образцов производили на электронных лабораторных весах. Полученные результаты измерений обрабатывали с помощью программы «Statistica».

Определение белка в КПМ осуществляли биохимическим биуретовым методом. Пробы разделили на две серии. КПМ предварительно измельчали, готовили одинаковые навески величиной 0,1 г, которые помещали в пробирки Эппендорфа емкостью 1,5 мл. Для экстракции белка использовали 0,6 Н раствор HCl и шейкер с режимом 150 движений в минуту при температуре 4 °С в течение 24 ч. После предварительного центрифугирования в надосадочной жидкости определяли содержание альбумина.

Одноосное статическое растяжение образцов костной ткани проводили на установке с автоматической записью кривых нагружения. Испытания проводили при комнатной температуре со скоростью нагружения 0,5 мм/мин. Из кривых растяжения были рассчитаны следующие механические характеристики: предел пропорциональности ($\sigma_{мп}$) — наибольшее напряжение, при котором выполняется закон Гука; предел прочности (σ_B) — напряжение, соответствующее наибольшему значению нагрузки, предшествующей разрушению образца; относительная деформация (ε) и модуль Юнга (E) [4, 5, 11].

Относительную деформацию рассчитывали по формуле:

$$\varepsilon = \frac{l_k - l_0}{l_0},$$

где l_0 — начальная длина образца; l_k — конечная длина образца после деформации.

Модуль Юнга рассчитывали графическим способом в упругой области на диаграмме по формуле:

$$E = \frac{\Delta P \cdot l_0}{\Delta l_{cp} \cdot S_0},$$

где $\Delta P = P - P_0$; P_0 — начальное усилие (Н); P — нагрузка, равная 70 % от предела пропорциональности $\sigma_{мп}$; $\Delta l = l_k - l_0$ — удлинение образца, вызванное приложенной нагрузкой P ; Δl_{cp} — среднее значение удлинения образца при нагружении, которое определяется на упругом участке; S_0 — площадь поперечного сечения исходного образца, измеренная перед испытанием; l_0 — начальная длина образца; l_k — конечная длина образца после деформации.

Результаты

На рис. 1 приведены типичные РЭМ-изображения поверхности костной ткани до и после депротеинизации. Видно, что поверхность костной ткани неровная, с выступами и углублениями. Местами встречаются участки с шероховатой поверхностью, что характерно для опилов кости (рис. 16). Продольные полосы соответствуют линиям склеивания между остеонами. Небольшие углубления в поверхности кортикального слоя после депротеинизации (деорганификации), вероятно, являются остеоцитарными лакунами. Отверстия в относительно ровной поверхности могут соответствовать месту выхода сосудов.

На внутренней поверхности депротеинизированной костной соломки структура кости ближе к губчатой, о чем свидетельствует трабекулярная

структура поверхности, сочетающая гребнеобразные выступы и углубления (рис. 1г).

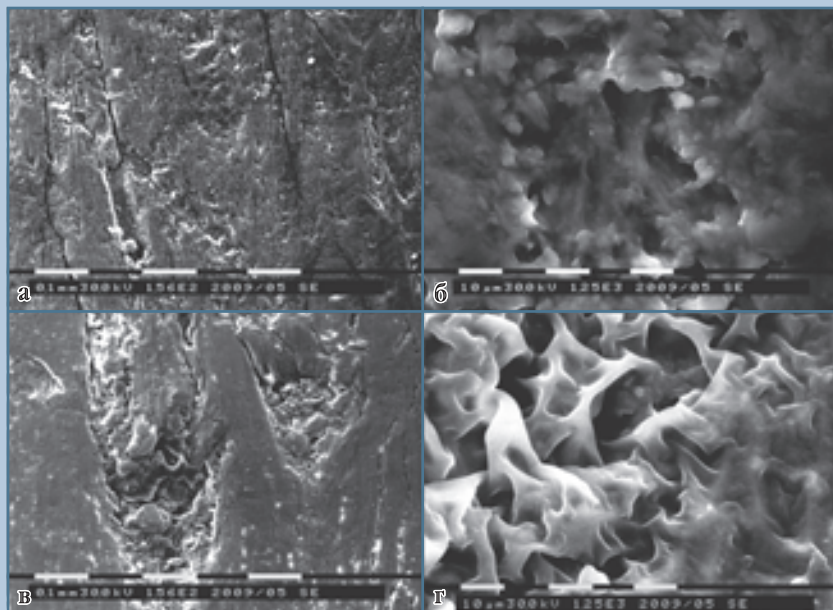
На рис. 2 представлены кривые растяжения костной ткани до и после депротеинизации, а в табл. — основные механические характеристики, полученные из кривых растяжения.

Из полученных данных видно, что образцы костной ткани имеют малую величину степени деформации, не более 1 %, что характерно для хрупких материалов. Область упругой деформации составляет 0,05 %, а предел пропорциональности не превышает 30 МПа (для исходной костной ткани — 27 МПа, а для депротеинизированной костной ткани — 29 МПа). Предел прочности не зависит от вида предварительной химической обработки костной ткани и составляет 80–90 МПа.

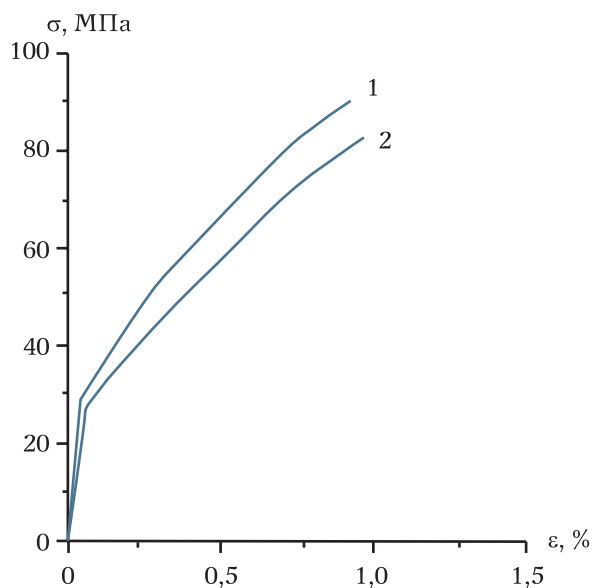
В то же время наличие коллагена влияет на модуль Юнга, который для депротеинизированной костной ткани снижается в два раза и равен 110 МПа; для костной ткани в исходном состоянии он равен 230 МПа.

На рис. 3 приведены РЭМ-изображения поверхности излома нативной и депротеинизированной костной соломки после испытания на растяжение. Хорошо видно, что в обоих случаях происходит хрупкое разрушение материала, о чем свидетельствуют сколы ступеньками. В целом характер изломов подобен, но в то же время наличие на сколах пластинок с острыми краями указывает на более хрупкий характер разрушения депротеинизированной костной соломки.

На рис. 4 приведены энергодисперсионные рентгеновские спектры нативной и депротеинизированной костных тканей. Основные элементы — кальций, фосфор и кислород. Наличие линии углерода обусловлено тонкой пленкой, нанесенной путем ионного напыления на образцы. При определении легких элементов, таких, как углерод и кислород, существует значительная погрешность, что не позволяет определить точное количество каждого элемента. В связи с этим проведена оценка соотношения кальция и фосфора.

**Рис. 1**

Растровые электронно-микроскопические изображения нативной (а, б) и депротенизированной (в, г) костной соломки

**Рис. 2**

Кривые растяжения нативной (1) и депротенизированной (2) костной соломки

Оказалось, что оно варьирует от 2,0 для образцов нативной костной ткани до 2,8 для депротенизированной костной соломки.

Массы нативной и депротенизированной костной соломки одинаковых размеров статистически достоверно отличаются. Депротенизированная костная соломка в процессе депротенизации теряет 19,4 % своего веса. Депротенизированная и нативная костная соломка одного веса отличаются по длине на 24,12 %. Достаточная точность среднего во всех случаях оказалась меньше 5 %, коэффициент вариации — меньше 10 %; следовательно, вариация мала. При определении альбумина максимальное значение в нативной костной соложке составило 24 мкг/мл, а в депротенизированной — 2 мкг/мл. Полученные данные свидетельствуют о том, что коагуляция и экстракция органического компонента осуществлены в достаточном объеме.

Обсуждение

Биологические твердые ткани являются минерально-органическими композитами со сложной микроструктурой [1, 2, 6, 15, 17, 21]. Кортикальная кость (плотная и компактная) составляет внешнюю часть всех скелетных структур. До 80 % скелета состоит из кортикальной кости. Кость является минерально-органическим композиционным материалом, главные составляющие которого — органический матрикс (20 %), минеральный компонент (70 %), вода (9 %) и клеточные элементы (1 %). Другие органические составляющие (белки, полисахариды, липиды и др.) представлены в малых количествах [1, 2, 10, 15, 17].

Кортикальная кость является композиционным материалом, на наноструктурном уровне представляющим собой взаимопроникающий каркас, состоящий из минералов на основе гидроксипатита и волокон коллагена. Данный каркас формирует слоистую микроструктуру, являющуюся основной для ориентированных цилиндрических образований на макроуровне. Форма и топография поверх-

Таблица

Механические характеристики образцов костной ткани ($M \pm m$)

| Материал | Модуль Юнга, МПа | Предел пропорциональности, МПа | Предел прочности, МПа | Относительная деформация, % |
|---------------------------------------|------------------|--------------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| Нативная костная ткань | 230 ± 15 | 29 ± 2 | 90 ± 4 | $0,91 \pm 0,02$ |
| Депротенинизированная костная соломка | 110 ± 10 | 27 ± 2 | 83 ± 3 | $0,96 \pm 0,02$ |

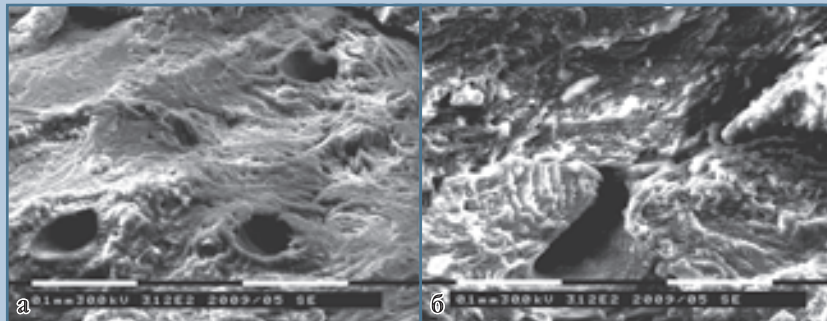


Рис. 3

Растровые электронно-микроскопические изображения поверхности излома нативной (а) и депротенинизированной (б) костной соломки

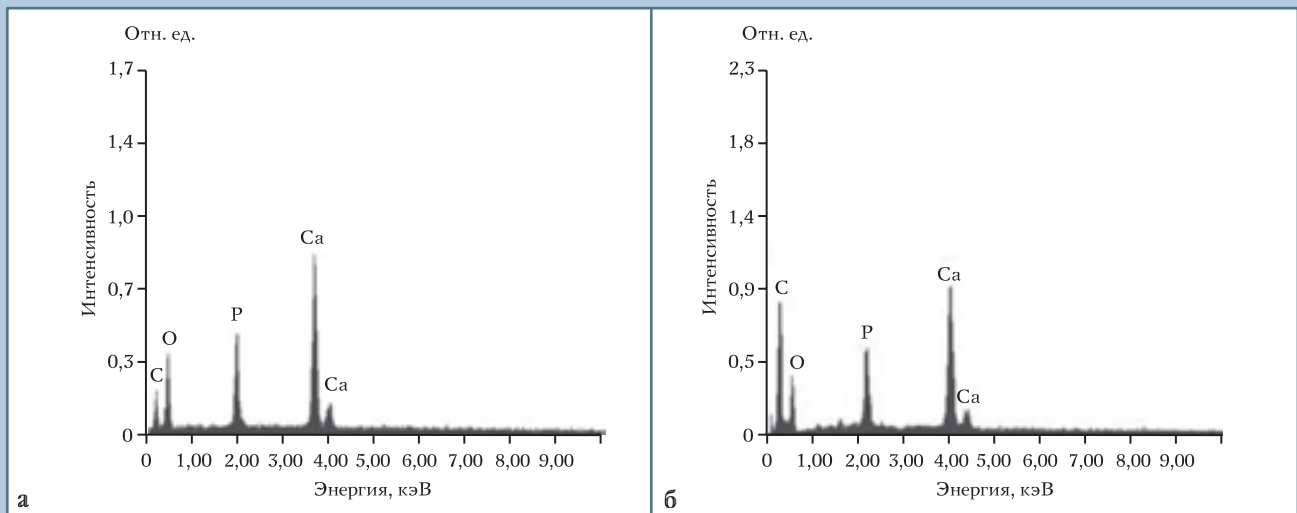


Рис. 4

Энергодисперсионные рентгеновские спектры нативной (а) и депротенинизированной (б) костной соломки

ности КПМ влияют на реакцию тканей и определяют, как протекает реакция на инородное тело [18]. Нативную и депротенинизированную костную соломку готовят из диафизарной части большеберцовой кости путем радиального распиливания кортикальных пластин. Форма и топография нативной и депротенинизированной костной соломки аналогичны и соответствуют структуре костной ткани: компакт-

ной с наружной стороны и губчатой со стороны костно-мозгового канала [17]. Однако рельефность более выражена у депротенинизированной кости, связано это с коагуляцией и экстракцией органического компонента кости. Более рельефно выглядят остеоцитарные лакуны и линии склеивания между остеоными структурами.

Механические характеристики образцов нативной и депротенинизированной

костной соломки сопоставимы с литературными данными, полученными для различных костных тканей [7, 12, 16, 19]. Указанные характеристики варьируют в широком диапазоне: предел прочности $\sigma_B = 50-200$ МПа, в нашем исследовании — $80-90$ МПа; относительная деформация $\epsilon = 1-2\%$ ($0,05\%$), модуль Юнга $E = 200$ МПа — 20 ГПа, в нашем исследовании — 230 и 110 МПа. Полученные данные харак-

теризуют кость как структуру твердую и жесткую, о чем свидетельствует величина упругой деформации 0,05 %. Причем предел пропорциональности для нативной костной соломки равен 27 МПа, для депротенизированной — 29 МПа; предел прочности для всех видов соломки 80–90 МПа.

Одновременно кость является структурой хрупкой. Степень деформации не превышает 1 %. Кроме того, о хрупкости кости свидетельствует и морфология линии излома различных видов костной соломки. Все эти параметры незначительно отличаются у нативной костной соломки и депротенизированной, поскольку не зависят от присутствия коллагена в костной ткани. В то же время наличие коллагена влияет на модуль Юнга, который для депротенизированной костной соломки снижается в два раза и равен 110 МПа, а для нативной — 230 МПа. Такие количественные изменения можно объяснить тем, что в процессе депротенизации (деорганификации) происходят коагуляция и экстракция органического компонента кости, отвечающего за упругоэластические свойства костной ткани, то есть депротенизация увеличивает хрупкость КПП.

Полученные данные по механическим свойствам костной ткани после различных видов обработки (обезжиривание и высушивание для нативной костной соломки или обезжиривание, депротенизация и высушивание для депротенизированной костной соломки) несколько отличаются от приведенных в литературе. Это связано с тем, что исследователи [7, 12, 16, 19], во-первых, испытывают разные участки кости и, во-вторых,

механические испытания образцов осуществляют в разных условиях. Кроме того, мы испытывали не цельный фрагмент диафиза трубчатой кости, а радиальный распил в виде кортикальной соломки, что заведомо снижает прочностные свойства костной ткани, в первую очередь — предел упругости. Мы исследовали прочностные свойства фрагментов костной ткани именно в том варианте, в каком КПП используются для органосохраняющих операций на различных сегментах скелета человека [3, 13].

Соотношение кальция и фосфора варьирует от 2,0 для изучаемых образцов нативной костной ткани до 2,8 — для депротенизированной, что несколько необычно для нормальной костной ткани. По литературным данным [1, 2, 7, 10, 19], стереохимическое соотношение кальция и фосфора в кристаллическом апатите варьирует от 1,37 до 1,67. Отклонение, полученное при анализе нативной и депротенизированной костной соломки, можно объяснить предварительным способом обработки костной ткани на подготовительном этапе в виде химического обезжиривания. Кроме того, в технологическом процессе депротенизации присутствует этап ферментативной обработки, в процессе которой происходят коагуляция и экстрагирование белков, доля которых составляет до 25 % массы костной ткани [1, 10, 15]. Поскольку минеральный компонент костной ткани представлен закристаллизованным или частично закристаллизованным гидроксипатитом $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{OH})_2$ и аморфным фосфатом кальция $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, легко поддающимся растворению, то происходит частичная

потеря микроэлементов и изменение соотношения кальция и фосфора. Часть белков прочно соединена с минеральным компонентом, поэтому в процессе депротенизации происходит большая, чем в предыдущем случае, потеря микроэлементов и изменение соотношения кальция и фосфора [15].

Подтверждением эффективности ферментативной обработки кости может служить изменение массы костной соломки в процессе депротенизации на 19,4 % веса и биохимическое определение белка в миллилитре надосадочной жидкости. В процессе депротенизации количество альбумина снижается в кости в 10 раз.

Выводы

1. Морфологии поверхности образца и поверхности излома нативной и депротенизированной костной соломки идентичны, рельефность поверхности более выражена после депротенизации.
2. В процессе депротенизации кости соотношение кальция к фосфору изменяется от 2,0 до 2,8, потеря веса составляет 19,4 % за счет коагуляции и экстракции органического компонента.
3. Кость является структурой твердой и жесткой, о чем свидетельствует величина упругой деформации 0,05 %, предел пропорциональности менее 30 МПа, а также предел прочности 80–90 МПа.
4. Депротенизация увеличивает хрупкость костно-пластического материала, что подтверждается снижением модуля Юнга в два раза.

Литература

1. Аврунин А.С., Корнилов Н.В., Суханов А.В. и др. Формирование остеопоротических сдвигов в структуре костной ткани. СПб., 1998.
2. Баринин С.М., Комлев В.С. Биокерамика на основе фосфатов кальция. М., 2005.
3. Волков М.В., Бизер В.А. Гомотрансплантация костной ткани у детей. М., 1969.
4. Жуковец И.И. Механические испытания материалов. М., 1980.
5. Золотаревский С.М. Механические свойства металлов. М., 1983.
6. Имамалиев А.С. Биологическая оценка трансплантируемых тканей. М., 1975.
7. Карлов А.В., Шахов В.П. Системы внешней фиксации и регуляторные механизмы оптимальной биомеханики. Томск, 2001.
8. Кирилова И.А., Подорожная В.Т. Способ приготовления костного трансплантата. Патент РФ на изобретение № 2223104 // Изобретения полезные модели. 2004. № 4 (III ч.). С. 464.

9. **Кирилова И.А., Фомичев Н.Г., Подорожная В.Т. и др.** Новые виды материалов для костной пластики в свете современных представлений о костных трансплантатах // Хирургия позвоночника. 2007. № 2. С. 66–70.
10. **Корнилов Н.В., Аврунин А.С.** Адаптационные процессы в органах скелета. СПб., 2001.
11. **Костин П.П.** Физико-механические испытания металлов, сплавов и неметаллических материалов. М., 1990.
12. **Параскевич В.Л.** Дентальная имплантология: Основы теории и практики. Минск, 2002.
13. **Садовой М.А., Мацук С.А., Сагдеев Д.О. и др.** Хирургическое лечение костных опухолей у детей // Травматол. и ортопед. 2007. № 2. Т. 1. С. 134–137.
14. **Севастьянов В.И., Васин С.Л., Перова Н.В.** Методы исследования биоматериалов и медицинских изделий // Биосовместимость / Под ред. В.И. Севастьянова. М., 1999. С. 47–87.
15. **Слуцкий Л.И., Севастьянова Н.А.** Органический матрикс кости: новые биохимические данные // Ортопед, травматол. 1986. № 8. С. 82–87.
16. **Хлусов И.А., Пичугин В.Ф., Рябцева М.А.** Основы биомеханики биосовместимых материалов и биологических тканей. Томск, 2007.
17. **Хэм А., Кормак Д.** Костная ткань // Гистология. 1983. Т. 3. С. 19–131.
18. **Шехтер А.Б., Розанова И.Б.** Тканевая реакция на имплантат // Биосовместимость / Под ред. В.И. Севастьянова. М., 1999. С. 174–211.
19. **Эппле М.** Биоматериалы и биоминерализация. Томск, 2007.
20. **Finkemeier C.G.** Bone-grafting and bone-graft substitutes // J. Bone Joint Surg. Am. 2002. Vol. 84. P. 454–464.
21. **Martin R.V.** Bone as a ceramic composite material // Mater. Sci. Forum. 1999. Vol. 293. P. 5–16.

Адрес для переписки:

Кирилова Ирина Анатольевна
630091, Новосибирск, ул. Фрунзе, 17,
НИИТО,
IKirilova@niito.ru

Статья поступила в редакцию 28.08.2009