



# ОСТЕОИНТЕГРАЦИЯ ГИДРОКСИАПАТИТОВЫХ ГРАНУЛ В ТЕЛАХ ПОЯСНИЧНЫХ ПОЗВОНКОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

В.В. Рерих<sup>1</sup>, А.Р. Аветисян<sup>1</sup>, А.М. Зайдман<sup>1</sup>, А.Д. Ластевский<sup>1</sup>, В.А. Батаев<sup>2</sup>, А.А. Никулина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна

<sup>2</sup>Новосибирский государственный технический университет

**Цель исследования.** Верификация остеointegrации пористых биокерамических гранул на основе гидроксиапатита при гистологическом исследовании, включающем электронную сканирующую микроскопию, дополненную энергодисперсионной спектроскопией.

**Материал и методы.** Эксперимент проведен на 6 беспородных собаках весом от 15 до 18 кг, которым проводилась имплантация гидроксиапатитовых гранул в тела поясничных позвонков. Срок наблюдения — 6 мес., затем проводилось гистологическое исследование препаратов при помощи световой микроскопии, сканирующей электронной микроскопии и энергодисперсионной спектрометрии.

**Результаты.** При гистологическом исследовании зон имплантации гранул в пространстве между ними обнаружена сформированная костная ткань трабекулярного строения, которая плотно прилегала к их поверхности. На границе между костной тканью и гидроксиапатитовыми гранулами соединительно-тканная капсула отсутствовала.

**Заключение.** Морфологические методы исследования с применением световой микроскопии, а также методы сканирующей электронной микроскопии и энергодисперсионной спектрометрии являются базовыми для верификации остеointegrации.

**Ключевые слова:** остеointegrация, гидроксиапатитовые биокерамические гранулы, эксперимент.

Для цитирования: Рерих В.В., Аветисян А.Р., Зайдман А.М., Ластевский А.Д., Батаев В.А., Никулина А.А. Остеointegrация гидроксиапатитовых гранул в телах поясничных позвонков в эксперименте // Хирургия позвоночника. 2013. № 4. С. 43–51.

EXPERIMENTAL OSSEOINTEGRATION  
OF HYDROXYAPATITE GRANULES  
IN THE LUMBAR VERTEBRAL BODIES  
V.V. Rerikh, A.R. Avetisyan, A.M. Zaidman,  
A.D. Lastevsky, V.A. Bataev, A.A. Nikulina

**Objective.** To perform histological verification of osseointegration of porous bioceramic granules using scanning electron microscopy and energy-dispersive spectroscopy.

**Material and Methods.** The experiment was conducted in six mongrel dogs weighing 15 to 18 kg which underwent implantation of hydroxyapatite bioceramic granules in the lumbar vertebral bodies. After 6-month follow-up period specimens were examined histologically using light microscopy, scanning electron microscopy, and energy-dispersive spectrometry.

**Results.** Histological examination of the implantation zones revealed trabecular bone tissue in spaces between the granules fitting closely to their surfaces. There was no connective tissue capsule on the border between the bone tissue and hydroxyapatite granules.

**Conclusion.** Morphological studies using light microscopy and scanning electron microscopy, as well as energy-dispersive spectrometry are basic methods for verification of osseointegration.

**Key Words:** osseointegration, hydroxyapatite bioceramic granules, experiment.

Hir. Pozvonoc. 2013;(4):43–51.

Дефекты костной ткани, образующиеся в результате травмы скелета, онкологических и инфекционных поражений опорно-двигательного аппарата, из-за неоднократных хирургических вмешательств, требуют

замещения различными материалами для восстановления формы сегмента опорно-двигательного аппарата и выполняемой им функции. В этой связи поиск пластических материалов и эффективных путей улучшения

остеогенеза в локусах дефицита костной ткани является принципиальной задачей реконструктивной медицины [5]. Современная тактика включает в себя использование аутологических и аллогенных костных транспланта-

тов, а также альтернативных искусственных заместителей.

В настоящее время предпочитают применять аутотрансплантаты, несмотря на ограниченность количества забираемого трансплантата и возможные осложнения при заборе костной ткани [3, 12, 30, 31]. Аллогенные трансплантаты могут быть причиной развития клеточно-опосредованной иммунной реакции отторжения или носителями патогенных инфекционных агентов [14].

Существующие ограничения в применении этих видов трансплантатов поддерживают интерес к материалам синтетического и биологического происхождения. Первая группа материалов представляет собой имплантаты со сложной внутренней архитектурой, имитирующей трабекулярную структуру губчатой кости, способствующей миграции, адгезии, пролиферации и дифференцировке предшественников остеобластов. Вторая группа заместителей является предметом более амбициозных стратегий, включающих в себя клеточные технологии и заключающихся в инженерии костной ткани в управляемых лабораторных условиях [28].

Среди искусственных материалов синтетического происхождения наиболее перспективными являются биокерамические. Их главное преимущество перед другими материалами (металлами, полимерами) – превосходная биосовместимость. Некоторые из них (биокерамика на основе  $Al_2O_3$  или  $ZrO_2$ ) инертны в физиологической среде, а другие (на основе гидроксиапатита,  $\beta$ -трикальцийфосфата, некоторые виды стеклокерамики) имеют контролируемые взаимодействия с тканями организма [10].

При существующем многообразии замещающих материалов универсальной мерой их применимости в клинической практике является их жесткая и асимптомная фиксация в костной ткани, достигаемая остеointеграцией [1].

В 1950 г. Branemark et al. [7, 8] впервые описали данное явление как способность титановых имплантатов быть

постоянно интегрированными в костную ткань. Albrektsson, Johansson [1] определили остеointеграцию как прямой контакт между костной тканью и имплантатом. В иллюстрированном медицинском словаре Dorland приводится гистологическое определение термина: прямая якорная фиксация имплантата посредством формирования костной ткани вокруг него без развития фиброзной ткани на границе «имплантат – кость» [1]. Предложено и биомеханическое определение остеointеграции, которое является лишь частью процесса и отражает только клинический результат имплантации: это процесс, посредством которого достигается жесткая фиксация пластического материала и удерживается в кости при функциональной нагрузке [32].

Как следует из определений, под остеointеграцией подразумевается явление, при котором на микроскопическом уровне костная ткань и имплантат контактируют друг с другом, между ними нет разграничивающей соединительно-тканной капсулы.

Таким образом, в процессе верификации остеointеграции принципиальную роль играет возможность идентифицировать прямой контакт костной ткани и поверхности имплантата без разграничивающей соединительно-тканной капсулы между ними.

Остеointеграция происходит благодаря регенерации костной ткани, инициированной остеoиндуктивным воздействием, и остеoкондукции, то есть способности имплантатов быть неким каркасом или основой для формирования и распространения костной ткани на своей пористой поверхности [1, 16, 29]. По данным Bose et al. [6], остеoкондуктивностью обладают пористые материалы с размерами пор от 100 до 600 мкм. Alexander et al. [2] приводят данные о том, что общая пористость материала 90 % и размер пор более 100 мкм благоприятны для проникновения клеток в материал и вставания сосудов.

Репаративная регенерация запускается путем индукции клеток-предшественников или остеoиндукции.

Под этим термином понимают стимулирующее воздействие на недифференцированные клетки-предшественники, приводящее к их дифференцировке в клетки, продуцирующие костную ткань, в остеобласты. Дифференцировка предшественников происходит под действием остеoиндуктивных агентов (факторов роста).

Остеoиндуктивность была определена Urist (Цит. по: Saranna, De Biase, 2006) в 1965 г. Автором было продемонстрировано, что деминерализованный костный матрикс может вызывать формирование костной ткани в мышечном футляре. При дальнейшем изучении процесса остеoиндукции было установлено, что этот процесс регулируется особыми полипептидами, названными костными морфогенетическими белками (bone morphogenetic proteins – BMP), содержащимися в костной ткани. Только спустя 20 лет была установлена их молекулярная структура, на основе которой эти белки были классифицированы с присвоением им идентификационного номера. Точная роль BMP в процессе остеoиндукции изучается и в настоящее время. Исследования выявили существование и других белков, участвующих в индукции и формировании костной ткани. Эти полипептиды и BMP были объединены в группу эндогенных биологически активных веществ под названием «факторы роста» [9, 16, 20]. Под действием BMP и других эндогенных факторов роста костной ткани происходят пролиферация и дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток, что в конечном итоге приводит к формированию популяции активных остеобластов, образующих костную ткань, заполняющую дефект в зоне имплантации.

Минеральный матрикс костной ткани преимущественно представлен кристаллами гидроксиапатита. Они связаны с окружающим коллагеном посредством белков, таких, как остеoкальцин, остеопонтин и остеонектин, которые занимают 3–5 % объема костной ткани и являются активными локусами биоминерализации. Эндо-

генные кристаллы гидроксиапатита в человеческой кости содержат анионы  $\text{CO}_3^{2-}$  и в следовых количествах  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  и  $\text{F}^-$  [24].

Элементарный состав пластических гранул, рассматриваемых в данной статье, наиболее близок к составу минерального матрикса костной ткани. Это обстоятельство поддерживает интерес исследователей к данной группе материалов в поиске заместителей, максимально приближенных к костной ткани элементарным составом, внутренней архитектурой, физико-химическими и биологическими свойствами.

Цель исследования – верификация остеointegrации пористых биокерамических гранул на основе гидроксиапатита при гистологическом исследовании, включающем электронную сканирующую микроскопию, дополненную энергодисперсионной спектроскопией.

## Материал и методы

Эксперимент проводили на 6 беспородных собаках весом от 15 до 18 кг. Выполняли имплантацию синтетических пластических гранул в тела поясничных позвонков лабораторных животных. Применяли пористые биокерамические гранулы (рис. 1) «BoneMedik-S» на основе гидроксиапатита размерами 0,5 на 1,0 мм, про-



Рис. 1

Гидроксиапатитовые гранулы

изведенные из наружной твердой оболочки морского коралла.

Послеоперационное наблюдение длилось в течение 6 мес., затем проводили эвтаназию введением летальной дозы анестетика, после чего осуществляли забор материалов и их подготовку к морфологическому исследованию.

До операции, непосредственно после нее и через 6 мес. проводили рентгенографию поясничного отдела позвоночника лабораторных животных.

Эксперимент одобрен локальным этическим комитетом учреждения.

*Хирургическая техника.* Операции проводили с соблюдением требований асептики и антисептики в стерильных условиях операционной. Перед вмешательством осуществляли премедикацию внутримышечным введением следующих препаратов: 2 % раствора промедола (0,5 мл/кг), реланиума (5 мг), 1 % раствора димедрола (1 мл). Общая анестезия внутримышечным введением кетамина (15 мг/кг).

После подготовки кожных покровов и трехкратной обработки антисептиком выполняли левосторонний косой внебрюшинный доступ. Рассекали кожу, подкожную клетчатку, фасцию. Тупым путем разводили волокна наружной и внутренней косой мышцы, рассекали поперечную фасцию. Брюшной мешок отводили медиально и вверх. Обнажали передние отделы тел поясничных позвонков ( $L_3$ ,  $L_4$ ).

В краниальной части тела позвонка на вентролатеральной поверхности слева сверлом диаметром 5 мм в направлении спереди назад и от периферии к центру формировали цилиндрический дефект костной ткани, слепо заканчивающийся в губчатом веществе тела позвонка глубиной 6 мм. Дефект заполняли гидроксиапатитовыми гранулами (рис. 2).

*Морфологическое исследование.* Забор материалов для гистологического исследования осуществляли путем блоковой резекции тел позвонков, содержащих пластические гранулы. Забранные тела позвонков очищали от мягких тканей, подготавлива-

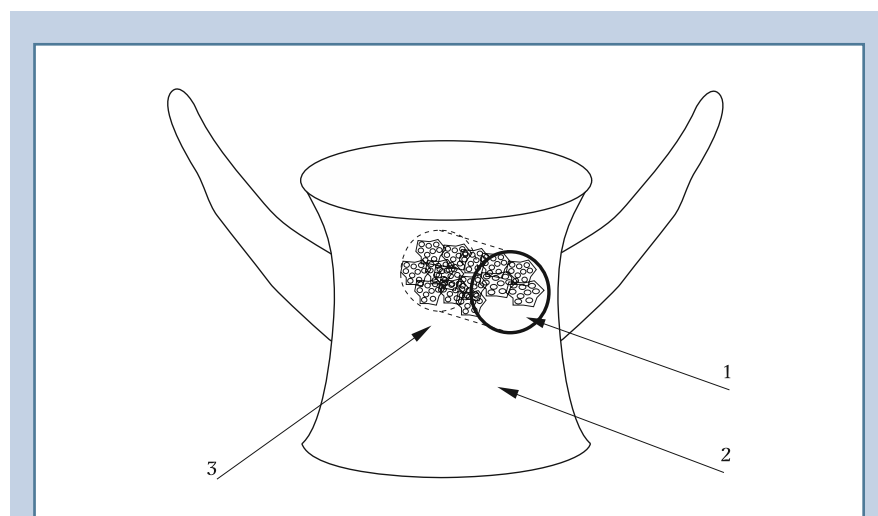


Рис. 2

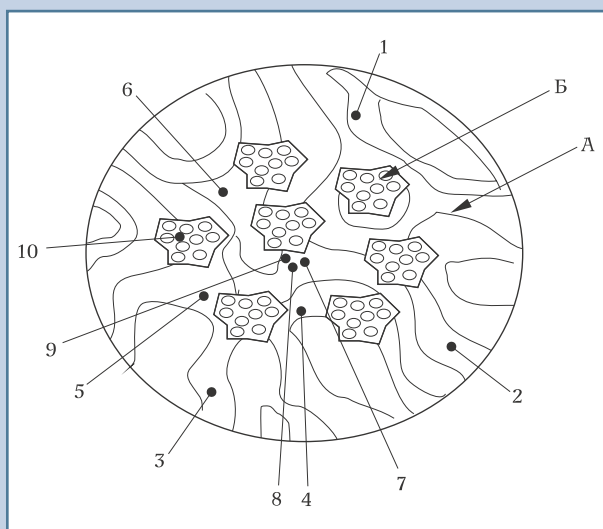
Схема произведенного дефекта в теле поясничного позвонка беспородной собаки: 1 – пористые биокерамические гранулы на основе гидроксиапатита, заполняющие сформированный дефект; 2 – переднебоковая поверхность тела  $L_4$  позвонка; 3 – сформированный дефект в теле позвонка в виде цилиндра на переднебоковой поверхности тела в направлении спереди назад от периферии к центру, слепо заканчивающийся в теле позвонка на глубине 6 мм

ли к световой микроскопии фиксацией, декальцинацией и окрашиванием, к электронной микроскопии – фиксацией и дегидратацией.

Фиксацию проводили путем экспозиции препаратов в забуференном (рН = 7,4) 10 % растворе формалина в течение 3 сут с последующей дофиксацией в течение 1 сут в растворе, одна часть которого состояла из 1,5 % раствора параформа, а вторая часть из 1,5 % раствора глутарового альдегида.

Препараты, подлежащие световой микроскопии, декальцинировали в трилоне «Б» и окрашивали гематоксилином-эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону [21, 23].

Для электронной микроскопии проводили дегидратацию путем экспозиции в растворах спирта с возрастающей концентрацией.



**Рис. 3**

Схема поверхности препарата и локализация точек проведения спектрального химического анализа: А – трабекулярная костная ткань тела позвонка; Б – пористая биокерамическая гранула на основе гидроксиапатита; 1, 2, 3 – точки на поверхности трабекул губчатой костной ткани в максимальном отдалении от имплантированных гранул, соответствуют интактной костной ткани тела позвонка; 4, 5, 6 – три равноудаленные друг от друга точки на поверхности структур, располагающихся по периферии пространства между имплантированными гранулами, соответствуют новообразованной костной ткани в периферической части сформированного дефекта; 7, 8, 9 – такие же точки, но расположенные в центре пространства между имплантированными гранулами, соответствуют новообразованной костной ткани в центральной части сформированного дефекта; 10 – точка на поверхности гидроксиапатитовых гранул

Дегидратированные препараты заливали эпоксидной смолой и направляли на подготовку к электронной микроскопии.

Срезы препарата для исследований изготавливали на станке для малодеформационного резания металлов и керамик «Minitom» при скорости вращения диска 60 об./мин. Плоскость распила пересекала локусы имплантации пластических гранул в костную ткань, таким образом был осуществлен доступ для изучения границы «кость – имплантат». Образцы толщиной 5–10 мм закрепляли на предметных столиках с помощью токопроводящего углеродного скотча, затем в напылительной установке «Q150T ES» наносили слой золота толщиной 10 нм.

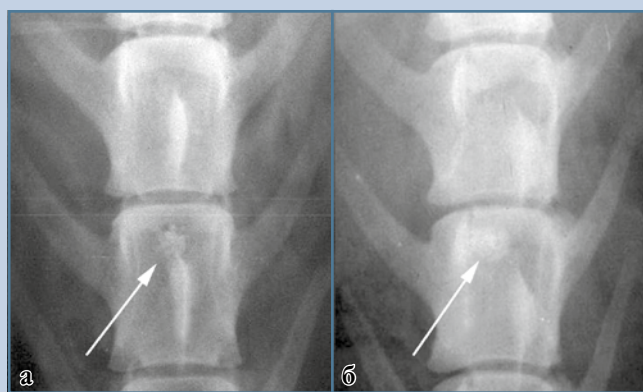
Подготовленный препарат с имплантатами анализировали на сканирующем электронном микроскопе «Carl Zeiss EVO50». Структурные исследования проводили при ускоряющем напряжении 5 кВ в режиме регистрации вторичных электронов.

Химический состав образца оценивали с использованием энергодисперсионного микроанализатора «INCA Energy» при ускоряющем напряжении 20 кВ [15, 22].

Энергодисперсионную спектроскопию проводили в десяти точечных локализациях на поверхности среза препарата (рис. 3). Статистическую обработку полученных цифровых данных осуществляли с применением программного пакета «PC Statistica» методом дисперсионного анализа ANOVA, позволяющего сравнивать значения трех и более групп.

## Результаты

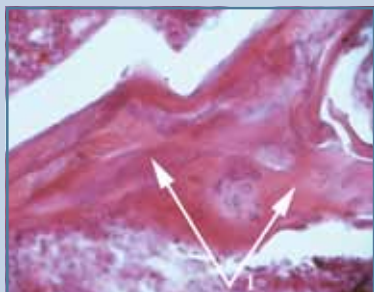
Во время наблюдения за животными в послеоперационном периоде осложнений не отмечено.



**Рис. 4**

Прицельная рентгенограмма L<sub>4</sub> позвонка с имплантированными гидроксиапатитовыми гранулами в день операции (а) и через 6 мес. после операции (б): стрелками показана зона сформированного дефекта

При сравнении рентгенограмм поясничного отдела позвоночника прооперированного животного в прямой проекции, сделанных непосредственно после имплантации гидроксиапатитовых гранул (рис. 4а) и через 6 мес. после операции (рис. 4б), заметно увеличение интенсивности тени в зоне сформированного дефекта,



**Рис. 5**

Световая микрофотография зоны пограничной костной ткани в месте имплантации пластиковых гранул; окраска гематоксилином и эозином, ув. 60: обнаруживается сформированная костная ткань (1) трабекулярного строения со следами перестройки

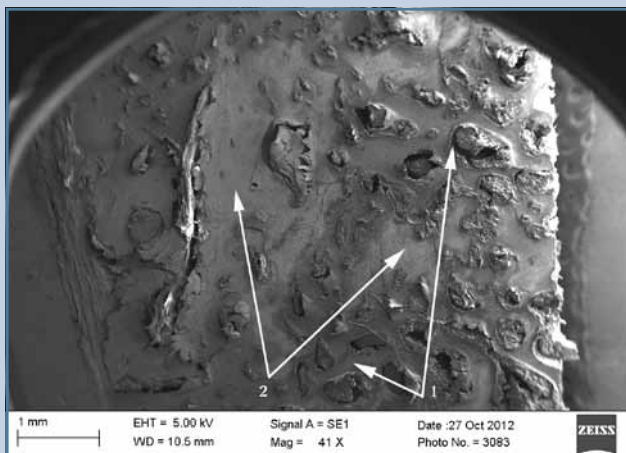
заполненного пластическим материалом, что косвенно свидетельствует о вращении костной ткани в пространство между имплантированными гранулами.

Это подтверждается морфологическим исследованием полученных препаратов при помощи световой и сканирующей электронной микроскопии (рис. 5–7). На микрофотографиях плоскости распила тела позвонка через зону имплантации гидроксиапатитовых гранул, сделанных после выведения животных из эксперимента через 6 мес. после операции, обнаруживается сформированная костная ткань трабекулярного строения со следами перестройки, которая заполняет пространство между гранулами и плотно прилежит к их поверхности. На границе между костной тканью и гидроксиапатитовыми гранулами соединительно-тканная капсула отсутствует (рис. 6, 7).

При химическом анализе путем спектрометрии в заданных точках поверхности препаратов определены весовые соотношения элементов О, С, Са, Р (рис. 8). Статистически обработанные результаты спектрометрии в точках на поверхности

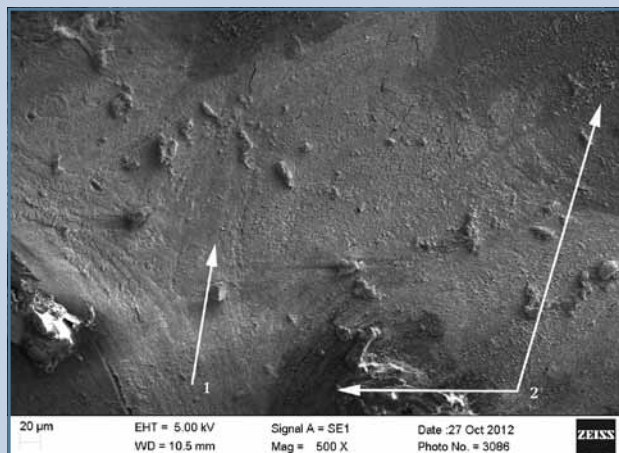
трабекул интактной костной ткани вне зоны дефекта, на периферии и в центре новообразованной костной ткани приведены в табл на с. 49. При спектрометрии на поверхности гранул получены следующие данные: С – 23,39 %; О – 38,83 %; Р – 12,03 % и Са – 24,77 %.

При сравнении весовых процентов определяемых химических элементов, полученных при спектрометрии в различных локализациях на поверхности препаратов, химические составы морфологических образований, контактирующих с поверхностью гранул, и интактной костной ткани тела позвонка, располагающейся вне зоны сформированного во время операции дефекта, статистически достоверно не различались (статистическая значимость различий между средними величинами превосходит 0,05;). Таким образом, в пространство между гидроксиапатитовыми гранулами в сформированном дефекте тела позвонка вращалась зрелая трабекулярная костная ткань.



**Рис. 6**

Электронная микрофотография поверхности распила тела позвонка с имплантированными гранулами, ув. 41: через 6 мес. после имплантации в тело поясничного позвонка беспородной собаки отмечается прямой контакт костной ткани (1) и имплантированных гранул (2)



**Рис. 7**

Электронная микрофотография поверхности распила тела позвонка и имплантированными гранулами, ув. 500: через 6 мес. после имплантации в тело поясничного позвонка беспородной собаки: 1 – имплантированная гранула, 2 – губчатая костная ткань тела позвонка

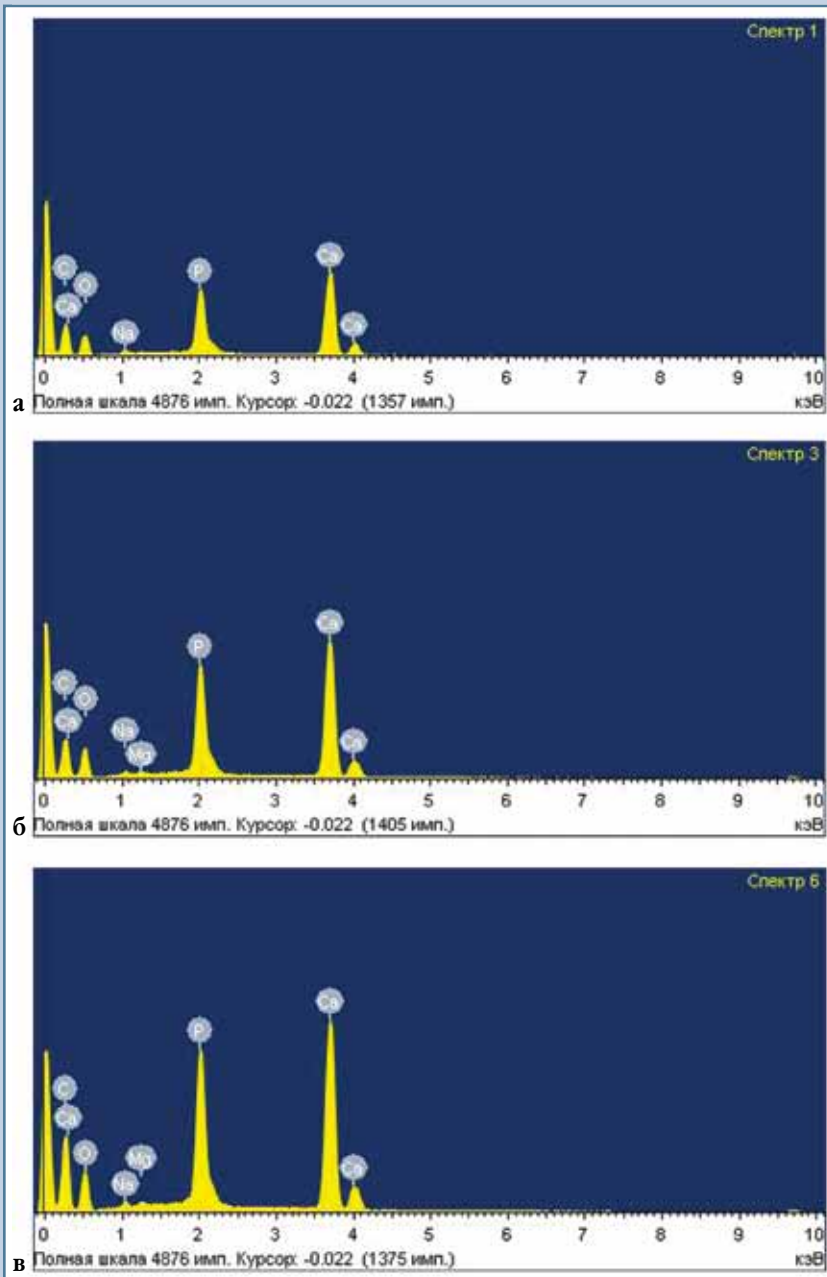


Рис. 8

Результаты спектрометрии в различных локализациях: **а** – поверхность трабекул интактной костной ткани вне зоны дефекта; **б** – периферия новообразованной костной ткани; **в** – центр новообразованной костной ткани

## Обсуждение

**Минеральный матрикс костной ткани.** Как известно, межклеточное вещество костной ткани представлено неорганическим компонентом, комби-

нированным с органическим матриксом, в основном из коллагена (главным образом I типа). Почти две трети веса и 40 % объема костной ткани приходится на минеральные вещества [28]. Минеральный матрикс костной ткани

преимущественно представлен кристаллами гидроксиапатита, а его элементарный состав описывает химическая формула  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  [24]. То есть значительное содержание Ca и P, обнаруживаемое при спектрометрии, отличает костную ткань от других видов соединительной ткани, например от волокнистой соединительной ткани, которая в том числе является основой для защитной рубцовой капсулы, покрывающей инородные тела внутри организма.

Так, при экспериментальном морфологическом исследовании препаратов позвонков крыс лабораторной линии Kyoto-Wistar с имплантированными биокерамическими гранулами посредством электронной микроскопии и энергодисперсионной спектрометрии были дифференцированы трабекулы костной ткани и соединительно-тканые образования. В отличие от костной ткани, где отмечалось высокое содержание O, C, Ca, и P, элементарный состав соединительно-тканной капсулы на поверхности тела позвонка характеризовался значительным содержанием только C и O, а Ca и P присутствовали в следовых количествах [19].

**Регенерация костной ткани на границе с имплантатом.** Остеоинтеграция обеспечивается процессом репаративной регенерации костной ткани и ее врастанием в поверхностные поры имплантатов, в котором участвуют клетки с различными функциями.

Организм реагирует на чужеродное тело с первых секунд после контакта с ним. На поверхности имплантата осаждаются белки опсоныны в виде альбуминов, фибриногена, иммуноглобулина G и белков системы комплемента. Этот слой превращает имплантат в биологически распознаваемый материал.

Первыми клетками, прикрепляющимися к поверхности имплантата, являются фибробласты. Они начинают синтезировать коллаген, который осаждается на поверхности имплантата. Эти клетки рекрутируются из окружающей имплантат мезенхимальной

Таблица

Весовое содержание химических элементов при спектрометрии в различных локализациях на поверхности препарата, % (M ± σ)

Локализация спектрометрии	C	O	P	Ca
Интактная костная ткань (n = 6)	34,58 ± 1,87	35,30 ± 0,95	10,25 ± 0,53	20,88 ± 1,14
Периферия новообразованной костной ткани в зоне дефекта (n = 6)	36,36 ± 2,23	32,31 ± 1,33	10,30 ± 0,48	21,27 ± 0,79
Центр новообразованной костной ткани в зоне дефекта (n = 6)	33,34 ± 3,49	34,29 ± 3,19	10,38 ± 0,27	20,87 ± 0,53
Статистическая значимость различий (P) при сравнении средних величин (M) с учетом количества наблюдений (n) и стандартного отклонения (σ) в соответствующих столбцах	0,169	0,068	0,877	0,662

ткани под сигнализирующим воздействием молекул, высвобождаемых клетками костной ткани и образовавшейся гематомы. Эти сигналы инициируют каскад формирования и резорбции костной ткани, благодаря чему происходит ее регенерация и ремоделирование.

Предшественники остеобластов располагаются во внутреннем слое надкостницы. Эти клетки могут дифференцироваться в остеобласты, находясь под действием BMP-2, который еще способен стимулировать ангиогенез. Остеобласты синтезируют органический матрикс костной ткани.

Для дифференцировки остеокластов необходимы колонистимулирующий фактор макрофагов и остеопротегерин лиганд, продуцируемые ретикулярными клетками костного мозга и остеобластами. Остеокласты расположены в области резорбции кости в лакунах Хоушипа. Остеокласты прикрепляются к резорбируемой поверхности кости за счет формирования замыкающего кольца из подосом – временных выростов цитоплазмы, содержащих F-актин, винкулин, талин, α-актинин. Через мембрану выростов из остеокластов выделяется большое количество  $H^+$  и  $Cl^-$ , что создает и поддерживает в замкнутом пространстве лакуны кислую среду, оптимальную для растворения солей кальция.

Два типа клеток заинтересованы в механизме клеточной защиты при внедренном имплантате: макрофаги и гигантские клетки. В первые дни после образования дефекта костной ткани грануляционная ткань начинает его заполнять. Макрофаги, выделяя

интерлейкин-1, вызывают лимфоцитарную инфильтрацию окружающих тканей, ангиогенез, продукцию антител и лимфокинов. Позже обнаруживаются макрофаги, утилизирующие эритроциты и некротизированные элементы. Они являются трансформированными моноцитами, которые попадают в место имплантации путем хемотаксических и хемокинетических агентов, таких, как альфафактор некроза опухоли (TNF-α), факторов системы комплемента, лимфокинов, хемокинов, лейкотриенов, бактериальных фрагментов и некоторых других. Они прикрепляются к биоматериалу посредством различных рецепторов. Это прикрепление возможно при наличии белков опсонина, адсорбированных на поверхности имплантата [17].

С одной стороны, макрофаги посредством секреции биологически активных субстанций регулируют процессы заживления, с другой – некоторые из этих клеток могут быть центральным звеном, поддерживающим хронический воспалительный ответ на имплантацию биоматериала.

Макрофаги фагоцитируют и переваривают поврежденные клетки, их оставшиеся элементы, чужеродные субстанции. Не все биоматериалы могут быть ферментированы в макрофагах. Например, ферментативный аппарат в лизосомах макрофагов не способен переварить синтетические полимеры. По данным Nuss, von Rechenberg [17], некоторые авторы относят присутствие макрофагов вокруг имплантата к признакам хронической воспалительной реакции, тогда как другие характеризуют их наличие как атрибут деградации

биоматериала, способного резорбироваться во внутренней среде организма.

Макрофаги также модулируют тканевую реакцию посредством продукции интерлейкинов, факторов роста и других биоактивных агентов. Важно подчеркнуть, что они могут быть предшественниками остеокластов и гигантских клеток.

Механический износ имплантата (образование микрочастиц и продуктов трения) активирует фагоцитоз макрофагами, которые при этом секретируют TNF-α, IL-1β, IL-6 и PGE2, стимулирующие дифференцировку предшественников остеокластов в зрелую форму.

Взаимодействия между макрофагами и лимфоцитами являются взаимодополняющими и взаимопотенцирующими. Адгезия макрофагов на поверхности имплантата является инициирующим сигналом, активирующим лимфоциты, которые начинают высвобождать молекулы, увеличивающие активность макрофагов. Поэтому присутствие лимфоцитов и их активность в месте имплантации могут рассматриваться как индикатор выраженной резорбции биоматериала.

При условии хронического воспаления, преобладании размера частиц вещества над размером макрофагов или неспособности остеокластов резорбировать материал, макрофаги объединяются (сливаются) друг с другом, образуя гигантские клетки. Они могут иметь огромную величину (больше  $1 \text{ мм}^2$ ) и сотни ядер. Подобные клетки обнаруживаются в гранулемах, образованных под действием бактериальных патогенов при тубер-

кулезе или трихинеллезе. Индуцируют слияние макрофагов интерлейкин-4 и -13. Эти клетки также играют центральную роль в процессе лизиса костной ткани вокруг имплантата, модулируя баланс активности остеобластов и остеокластов.

Гигантские клетки участвуют в процессе деградации имплантата. Они резорбируют частицы внедренного материала внутри себя, поглотив их, либо на своей поверхности путем выделения лизосомальных ферментов и активных форм кислорода. Эти клетки, дифференцировав в остеокластоподобные клетки, могут лизировать костную ткань.

Таким образом, гигантские клетки участвуют в нормальном процессе заживления дефекта ткани после имплантации биоинертного или биодegradирующего биоматериала; их присутствие не угнетает формирование костной ткани, оно говорит о низкой резорбируемости имплантированного материала; наличие гигантских клеток при отсутствии других, индуцирующих воспалительный процесс, говорит о хорошей биосовместимости имплантата; гигантские клетки и макрофаги обеспечивают резорбцию и фрагментацию биодegradирующего материала.

Если биоматериал не может быть резорбирован макрофагами и гигантскими клетками, образуется фиброзная капсула, отграничивающая внедренный материал от окружающих тканей и предотвращающая дальнейшее взаимодействие между ними.

Острое воспаление с участием макрофагов и гигантских клеток в ответ на имплантацию является нормальным ответом организма и наблюдается в случаях имплантации как биосовместимых материалов, так и несовместимых. Только наличие постоянных провоспалительных стимулов (продукты окисления имплантатов, продукты их механического износа) поддерживают процессы хронического воспаления с участием лимфоцитов и плазматических клеток. Это приводит к отграничению его от костной ткани соединительно-ткан-

ной капсулой [13, 17]. В проведенном эксперименте костная ткань находится в плотном контакте с имплантированными гранулами: отграничивающая соединительно-тканная капсула не обнаружена, что говорит об остеointegrации имплантатов.

*Методы верификации остеointegrации.* Не всегда в исследованиях термин «остеointegrация» используется в значении морфологического понятия, подкрепленного гистологическими данными. Чаще это бывает в клинических исследованиях, когда забор гистологического материала после имплантации не может быть осуществлен, например в случаях оперативного лечения пациентов [18, 25]. В таких случаях применяют только рентгенологические методы.

Данная группа (рентгенография, КТ) является широко распространенной в исследованиях, это рутинные методы диагностики. Они применимы в том случае, если рентгеноплотность (проницаемость для рентгеновских лучей) имплантатов будет значительно превышать таковую костной ткани, ведь только при этом условии можно разграничить костную ткань и имплантат. Посредством рентгенологических методов совершенно точно можно оценивать регенерацию костной ткани вокруг имплантата. Однако эти методы не позволяют идентифицировать тонкие соединительно-тканые капсулы (толщиной 1–5 мкм), разграничивающие костную ткань и поверхность имплантатов. Поэтому верификация остеointegrации на основе только рентгенологических методов исследования является неприемлемой.

В случае клинических исследований, когда забор имплантата вместе с окружающей костной тканью для гистологического изучения является неприемлемым, рентгенологические методы верификации остеointegrации применимы, если предварительно в серийных наблюдениях на экспериментальной модели лабораторных животных установлена корреляция между рентгенологическими и морфологическими признаками

остеointegrации того же имплантата в тех же локализациях [26].

Достоверным методом верификации остеointegrации является морфологическое исследование с микроскопией границы «кость – имплантат», определяющей прямой контакт костной ткани и поверхности имплантата без разграничивающей соединительно-тканной капсулы, позволяющей провести морфометрический анализ. Световая микроскопия является рутинным методом, применимым для изучения результатов экспериментальных исследований на модели лабораторных животных [4, 11, 27]. Для более детальных исследований может быть применена сканирующая электронная микроскопия, позволяющая визуализировать границу «кость – имплантат», вплоть до нанометрических величин, изучить пространство внутри пор имплантатов. Электронная микроскопия может быть сопряжена с проведением энергодисперсионной спектроскопии для химического анализа морфологических элементов, что сделано в настоящем исследовании. Это может сообщить ценные сведения о качестве сформированной костной ткани.

## Заключение

Гранулы на основе гидроксиапатита способны к остеointegrации, которая обеспечивается якорным врастанием костной ткани в поверхностные поры имплантатов.

В проведенном эксперименте через 6 мес. после имплантации пластического материала в пространство между гидроксиапатитовыми гранулами в сформированном дефекте тела позвонка образовалась зрелая трабекулярная костная ткань. На границе между костной тканью и гидроксиапатитовыми гранулами соединительно-тканная капсула отсутствовала.

Морфологические методы исследования с применением световой микроскопии и метод сканирующей электронной микроскопии и энергодисперсионной спектроскопии являются базовыми для верификации остеointegrации.



## Литература

1. **Albrektsson T, Johansson C.** Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001;10(Suppl 2):S96–S101.
2. **Alexander D, Hoffmann J, Munz A, et al.** Analysis of OPLA scaffolds for bone engineering constructs using human jaw periosteal cells. *J Mater Sci Mater Med.* 2008;19:965–974.
3. **Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS.** Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine.* 1995;20:1055–1060.
4. **Becker S, Maissen O, Ponomarev I, et al.** Osteo-promotion by a beta tricalcium phosphate/bone marrow hybrid implant for use in spine surgery. *Spine.* 2006;31:11–17.
5. **Ben Nissan B.** Biomimetics and bioceramics. In: Reis RL, Weiner S (eds). *Learning from Nature How to Design New Implantable Biomaterials: From Biomineralization Fundamentals to Biomimetic Materials and Processing Routes.* Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2004:89–103.
6. **Bose S, Darsell J, Hosick HL, et al.** Processing and characterization of porous alumina scaffolds. *J Mater Sci: Mater Med.* 2002;13:23–28.
7. **Branemark PI, Hansson BO, Adell R, et al.** Osseo-integrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl.* 1977;16:1–132.
8. **Branemark R, Branemark PI, Rydevik B, et al.** Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation: a review. *J Rehabil Res Dev.* 2001;38:175–181.
9. **Capanna R, De Biase P.** Osteoinduction: Basic Principles and Developments. In: Leung KS, Tagland G, Schnetter R, et al. (eds). *Practice of Intramedullary Locked Nails.* Springer Berlin Heidelberg, 2006:32–42.
10. **Carter CB.** Ceramics in biology and medicine. In: Carter CB, Norton MG (eds). *Ceramic Materials: Science and Engineering.* N. Y., 2007:635–651. DOI: 10.1007/978-0-387-46271-4.
11. **Daculsi G, Uzel AP, Weiss P, et al.** Developments in injectable multiphasic biomaterials. The performance of microporous biphasic calcium phosphate granules and hydrogels. *J Mater Sci Mater Med.* 2009;21:855–861.
12. **Damien CJ, Parsons JR.** Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater.* 1991;2:187–208.
13. **Eroschenko VP.** DiFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations, 11th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
14. **Green D, Walsh D, Mann S, et al.** The potential of biomimesis in bone tissue engineering: lessons from the design and synthesis of invertebrate skeletons. *Bone.* 2002;30:810–815.
15. **Lindgren C, Hallman M, Sennerby L, et al.** Back-scattered electron imaging and elemental analysis of retrieved bone tissue following sinus augmentation with deproteinized bovine bone or biphasic calcium phosphate. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21:924–930. DOI: 10.1111/j.1600-0501.2010.01933.x.
16. **Nakamura T.** Biomaterial osteoinduction. *J Orthop Sci.* 2007;12:111–112.
17. **Nuss KM, von Rechenberg B.** Biocompatibility issues with modern implants in bone – A review for clinical orthopedics. *Open Orthop J.* 2008;2:66–78.
18. **Paderni S, Terzi S, Amendola L.** Major bone defect treatment with an osteoconductive bone substitute. *Chir Organi Mov.* 2009;93:89–96.
19. **Rerikh V, Avetisyan A, Aronov A, et al.** In vivo implantation of new porous ceramic granules. Proceedings of 2nd International Conference on Competitive Materials and Technology Processes in Miskolc-Lillaf red, Hungary, October 8–12, 2012. Miskolc, 2012:32.
20. **Sandhu HS.** Bone morphogenetic proteins and spinal surgery. *Spine.* 2003;28(15 Suppl):S64–S73.
21. **Shetty DC, Urs AB, Ahuja P, et al.** Mineralized components and their interpretation in the histogenesis of peripheral ossifying fibroma. *Indian J Dent Res.* 2011;22:56–61.
22. **Slater N, Dasmah A, Sennerby L, et al.** Back-scattered electron imaging and elemental micro-analysis of retrieved bone tissue following maxillary sinus floor augmentation with calcium sulphate. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19:814–822. DOI: 10.1111/j.1600-0501.2008.01550.x.
23. **Smucker JD, Bobst JA, Petersen EB.** B2A peptide on ceramic granules enhance posterolateral spinal fusion in rabbits compared with autograft. *Spine.* 2008;33:1324–1329.
24. **Supova M.** Problem of hydroxyapatite dispersion in polymer matrices: a review. *J Mater Sci Mater Med.* 2009;20:1201–1213.
25. **Thalgott JS, Klezl Z, Timlin M, et al.** Anterior lumbar interbody fusion with processed sea coral (coralline hydroxyapatite) as part of a circumferential fusion. *Spine.* 2002;27:E518–E525.
26. **Thalgott JS.** Point of View. *Spine.* 2002;27:E526.
27. **Uchida A, Araki N, Shinto Y, et al.** The use of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumour surgery. *J Bone Joint Surg Br.* 1990;72:298–302.
28. **Vago R.** Beyond the skeleton. Cnidarian biomaterials as bioactive extracellular microenvironments for tissue engineering. *Organogenesis.* 2008;4:18–22.
29. **Van Haastert RM, Grote JJ, Van Blitterswijk CA, et al.** Osteoinduction within PEO/PBT copolymer implants in cranial defects using demineralized bone matrix. *J Mater Sci Mater Med.* 1994;5:764–769.
30. **Wigfield CC, Nelson RJ.** Nonautologous interbody fusion materials in cervical spine surgery: how strong is the evidence to justify their use? *Spine.* 2001;26:687–694.
31. **Younger EM, Chapman MW.** Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma.* 1989;3:192–195.
32. **Zarb G, Albrektsson T.** Osseointegration – a requirement for the periodontal ligament? Editorial. *Int J Periodont Res Dent.* 1991;11:88–91.

## Адрес для переписки:

Аветисян Артасеш Робертович  
630091, Новосибирск, ул. Фрунзе, 17,  
НИИТО,  
avetis.med@gmail.com

Статья поступила в редакцию 20.06.2013

Виктор Викторович Рерих, д-р мед. наук; Артасеш Робертович Аветисян, аспирант; Алла Михайловна Зайдман, д-р мед. наук, проф.; Алексей Дмитриевич Ластевский, науч. сотрудник, Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна; Владимир Андреевич Батаев, д-р техн. наук, проф.; Аэлита Александровна Никулина, канд. техн. наук, Новосибирский государственный технический университет. Viktor Viktorovich Rerikh, MD, DMSc; Artasbes Robertovich Avetisyan, fellow; Alla Mikhailovna Zaidman, MD, DMSc, Prof.; Aleksey Dmitrievich Lastevsky, researcher, Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n.a. Ya.L. Tsiyuan; Vladimir Andreyevich Bataev, DTechSc, Prof.; Aelita Aleksandrovna Nikulina, PhD in TechSc, Novosibirsk State Technical University.