

ИССЛЕДОВАНИЕ IN VIVO ТРЕХКОМПОНЕНТНОГО РЕЗОРБИРУЕМОГО КАЛЬЦИЙФОСФАТНОГО КОСТНОГО ЦЕМЕНТА НА ОСНОВЕ ТРИКАЛЬЦИЙФОСФАТА

В.Е. Мамонов, А.Г. Чемис, Н.И. Дризе, Н.В. Проскурина, И.И. Кряжков, В.С. Комлев

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России,
ФГБУН «Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова» РАН, Москва, РФ

Представлены результаты экспериментально-морфологического исследования трехкомпонентного резорбируемого кальцийфосфатного костного цемента (КФЦ) на основе трикальцийфосфата для заполнения дефекта в качестве временной опорной резорбируемой матрицы. Исследования проведены на кроликах породы советская шиншилла массой тела 3200–3500 г. Использовали модель критического дефекта спонгиозной кости. На различных сроках наблюдения (6, 9 и 12 мес) отмечалось постепенное замещение биоматериала новообразованной костной тканью от периферии к центру с полной резорбцией цемента спустя 12 мес после операции. Новообразованная в дефекте кость по своим механическим характеристикам была прочнее окружающей трабекулярной кости. Установлено, что материал обладает гемостатическим эффектом, умеренно токсичен. Костный мозг по периферии костного мозга сохранял свою клеточность на всех сроках наблюдения, постепенно заполняя межтрабекулярное пространство новообразованной кости. Полученные данные позволяют рекомендовать широкое применение КФЦ для замещения костных дефектов.

Ключевые слова: кальцийфосфатный костный цемент, трикальцийфосфат, остеопластический материал, костный дефект.

In Vivo Study of Tricomponent Resorbable Calcium Phosphate Bone Cement Based on Tricalcium Phosphate

V.E. Mamonov, A.G. Chemis, N.I. Drize, N.V. Proskurina, I.I. Kryazhkov, V.S. Komlev

National Research Center for Hematology,
Institute of Metallurgy and Material Science named after A.A. Baykov, Moscow, RF

Results of experimental morphologic study of tricomponent resorbable calcium phosphate bone cement (CPhC), based on tricalcium phosphate for the filling of defect as a temporary bearing resorbable matrix are presented. Study was performed on soviet chinchilla rabbits weighting 3200–3500 g. The model of critical spongy bone defect was used. At different observation terms (6, 9 and 12 months) gradual substitution of biomaterial with newly formed bone tissue from periphery to the center was observed with complete cement resorption 12 months after surgery. By mechanic characteristics newly formed bone in the defect was stronger than the surrounding trabecular one. It was stated that material possessed hemostatic effect and moderate toxicity. Peripheral bone marrow maintained its cellularity at all terms, gradually filling intertrabecular space of newly formed bone. Achieved data enable to recommend wide used of CPhC for bone defects substitution.

Key words: calcium phosphate bone cement, tricalcium phosphate, osteoplastic material, bone defect.

Создание материалов, способных заполнять костные дефекты сложной геометрической формы и одновременно восстанавливать механические свойства пораженной костной ткани, является актуальной задачей. Материал в идеале должен полностью заполнять имеющийся костный дефект, затвердевать в условиях воздействия биологических жидкостей в заданный временной промежуток, быть механически прочным и резорбироваться с замещением на собственную костную ткань. Кроме того, он должен быть биосовместимым, т.е. не обладать токсичностью и не вызывать реакции отторжения. На сегодняшний день этим характерис-

тикам в той или иной степени соответствуют костные цементы на основе фосфатов кальция. Данные материалы могут затвердевать при температуре тела без экзотермической реакции и способны к резорбции с замещением костной тканью [1–3].

Костные цементы на основе фосфатов кальция можно условно разделить на два типа по характеристикам конечного продукта: осажденный гидроксиапатит ($\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$), который имеет химический состав, близкий к составу гидроксиапатита ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, $\text{Ca}/\text{P} = 1,67$), и дикальцийфосфат дигидрат (ДКФД, структурный тип брушита) состава $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [2]. В основном

исследования и разработки направлены на создание апатитовых цементов. Примером является кальцийфосфатный цемент (КФЦ), разработанный W. Brown и соавт. [4, 5]. В его состав входят тетракальцийфосфат ($\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$, основной компонент, $\text{Ca/P} = 2,0$) и дикальцийфосфат безводный (CaHPO_4 , кислый, $\text{Ca/P} = 1,0$). Отличительной их характеристикой является относительно высокая механическая прочность (20–83 МПа) [2]. Брушистые КФЦ изначально, в первых формулировках их составов, были основаны на взаимодействии трикальцийфосфата ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, α - или β -ТКФ, близок к нейтральному, $\text{Ca/P} = 1,5$) с монокальцийфосфатом моногидратом ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, кислый, $\text{Ca/P} = 0,5$) с получением ДКФД [6]. Преимуществом брушистых цементов является резорбция в физиологических условиях, недостатком — низкая прочность (до 10 МПа). Данный факт ограничивает использование этих биоматериалов в практической медицине. С целью улучшения механических свойств в состав цемента могут быть введены различные добавки. Известны исследования по дисперсному упрочнению апатитовых и брушистых КФЦ частицами неорганических соединений, таких как кремнезем, рутил, диоксид циркония [7]. В последнем случае значительный эффект достигнут в результате фазовой трансформации диоксида циркония тетрагональной модификации (принцип данного подхода рассмотрен в обзоре [8]).

В настоящей работе проведены результаты биологических исследований *in vitro* и *in vivo* КФЦ на основе трикальцийфосфата с добавлением пористых керамических гранул карбонатгидроксиапатита (КГА) с целью улучшения прочностных характеристик материала.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Кальцийфосфатные цементы представляют собой вяжущие системы, состоящие из порошкообразной и жидкой фаз, при смешении которых происходит химическое взаимодействие, сопровождающееся схватыванием и последующим твердением. Механизмы схватывания и твердения КФЦ основаны на двух типах взаимодействий: кислотно-основные реакции с формированием нейтрального соединения, что имело место в нашем случае, или реакция гидролиза метастабильного ортофосфата в водной среде.

Исходный порошок α -ТКФ для приготовления КФЦ получали термическим разложением ДКФД и карбоната кальция при 1300°C в течение 5 ч. Порошок α -ТКФ измельчали в планетарной мельнице корундовыми мелющими телами в среде этанола с последующей сушкой при 80°C . Керамические гранулы КГА готовили согласно [9]. С помощью стандартных сит отбирали фракцию гранул диаметром около 50–100 мкм. Гранулы КГА в количестве 10 масс. % вводили в исходный порошок ТКФ. В качестве жидкой фазы («затвердевающей жидкости») использовали водный раствор на осно-

ве фосфорной кислоты, который готовили в стерильных условиях. Полученный продукт подвергали стерилизации автоклавированием в течение 3 ч при температуре 180°C .

Значения pH образцов определяли с помощью pH-метра Эконикс эксперт 001 (Россия) со стеклянным комбинированным электродом через 10, 30 и 60 мин после затворения. Рентгенофазовый анализ (РФА) проводили с помощью дифрактометра Ultima 4 («Rigaku», Япония) на монохроматизированном $\text{CuK}\alpha$ -излучении. Идентификацию фаз выполняли с использованием базы рентгенометрических данных PDF-2. Изображения материалов получали с помощью сканирующего электронного микроскопа («Tescan Vega SBU II», Чехия) при ускоряющем напряжении 10–30 кВ. Механические свойства определяли на испытательной машине Instron ElectoPuls E3000 («Instron», Великобритания).

Перед проведением эксперимента на животных исследуемый материал был подвергнут тестированию на цитотоксичность *in vitro*. Для этого по два образца по $15 \cdot 10^3$ человеческих мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) донора костного мозга (все доноры предварительно подписывали Информированное согласие на использование клеток костного мозга в научных целях) помещали в 24-ячеечные платы в среде aMEM с 10% эмбриональной телячьей сывороткой вместе с 4 мм^3 цемента на различных сроках затвердевания. Временные промежутки составили 1, 2, 3, 5 и 10 мин после смешивания порошка с жидким компонентом системы. В качестве сравнения использовали коммерческий полиметилметакрилатовый (ПММА) цемент CMW1 («DePuy», США) и клеточный контроль без исследуемого материала. Результат оценивали через 4 сут посредством подсчета количества живых ММСК в ячейках.

В эксперименте *in vivo* участвовали по 6 кроликов на каждый срок породы «Советская шиншилла» массой 3200–3500 г. Животные содержались в индивидуальных сетчатых клетках и получали стандартный комбикорм из травяной муки и сочные корма во время всего исследования. Эксперименты на животных были одобрены комиссией по биомедицинской этике при Институте медико-биологических проблем РАН.

Нами была использована модель критического дефекта спонгиозной кости. Операцию выполняли в асептических условиях под футлярной анестезией бедра, для чего использовали 20 мл 0,5% раствора новокаина (ОАО «Органика», Россия). Из проекционного разреза длиной 2 см выделяли наружный мышцелок бедра. Сверлом диаметром 5 мм производили рассверливание наружного мышцелка бедренной кости в поперечном направлении на глубину 1–1,2 см до кортикальной пластинки внутреннего мышцелка. Костный дефект полностью заполняли цементом в объеме 0,3–0,5 мл посредством введения шприцем через 2 мин после замешива-

ния. Затвердевание цемента происходило непосредственно в дефекте. Рану послойно ушивали наглухо. Иммобилизацию конечности не выполняли.

Для профилактики инфекционных осложнений всем животным за 3 ч до операции вводили энрофлоксацин в дозе 10 мг/кг подкожно, затем, на протяжении последующих 4 дней, — в той же дозе подкожно 1 раз в сутки.

На сроках 7 дней, 6 нед, 3, 6, 9 и 12 мес после операции выполняли рентгенографию бедренной кости в прямой проекции. Животных выводили из эксперимента через 6, 9 и 12 мес с момента операции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Время твердения КФЦ составляет 3–4 мин. По данным РФА основной фазой КФЦ после твердения является брушит (рис. 1). Кроме кристаллических фаз, для затвердевшего КФЦ характерно присутствие аморфной составляющей в количестве до 40–50 масс. %.

Значения прочности при сжатии по результатам механических испытаний КФЦ составили около 15 ± 3 МПа. Известно, что механические характеристики губчатой костной ткани варьируются в широких пределах в зависимости от индивидуума, вида испытания и т.д. Если речь идет о значениях прочности при сжатии, то среднее значения составляют около 5 МПа. Относительно высокие значения прочности для полученного брушитового КФЦ обусловлены, по-видимому, наличием керамических гранул. Трещина, распространяясь, сталкивается с препятствием (гранулой), огибает гранулу, теряя при этом энергию.

Одной из важнейших характеристик КФЦ является значение pH, при взаимодействии материала с окружающими тканями может происходить его смещение в сторону кислых или щелочных зна-

чений. Брушит по своей природе имеет низкие значения pH. Введение 10 масс. % гранул КГА в состав КФЦ позволяет привести значение pH к нейтральным 7,0–7,4 через 5 мин после затворения. Через 1 ч после затворения значение pH увеличивается до 7,5–7,8.

Данные pH-метрии были подтверждены результатами теста на цитотоксичность (рис. 2). В обоих случаях (КФЦ и ПММА) наблюдался цитотоксический эффект. Через 4 дня после постановки эксперимента количество ММСК в ячейках с исследуемыми образцами было меньше исходного, причем в вариантах с ПММА через 5 мин после замешивания в обеих ячейках живых ММСК не определялось. Для исследуемого КФЦ отмечено в среднем 2-кратное уменьшения числа ММСК в ячейках по сравнению с исходным количеством. Цитотоксический эффект КФЦ был максимально выражен в первые 5 мин после замешивания и уменьшался к 10-й минуте, причем ни в одном случае не было выявлено гибели 100% ММСК.

В эксперименте на кроличьей модели затвердевание КФЦ происходило непосредственно в дефекте без экзотермической реакции. Помимо способности к затвердеванию в присутствии биологических жидкостей, КФЦ проявил высокую гемостатическую активность: кровотечение из костной раны прекращалось сразу после его затвердевания. Гемостатические свойства материала, возможно, обусловлены уменьшением pH во время затвердевания.

На контрольных рентгенограммах констатировали полное заполнение цементом всего объема дефекта. Отмечено постепенное снижение рентгеновской плотности биоматериала от периферии к центру, что может свидетельствовать о биорезорбции цемента. Однако даже после полной резорбции материала плотность замещенной кости в зоне

дефекта была несколько выше рентгеновской плотности окружающей губчатой костной ткани, но ниже плотности кортикальной пластины (рис. 3).

Рентгенологические данные были подтверждены данными аутопсии (рис. 4). У животных, выведенных из эксперимента на различных сроках исследования, отмечалось постепенное замещение биоматериала новообразованной костной тканью от периферии к центру. Полная резорбция цемента происходила спустя 12 мес после операции. Макроскопически определялся хороший контакт окружающей костной ткани с материалом, визуализировались тра-

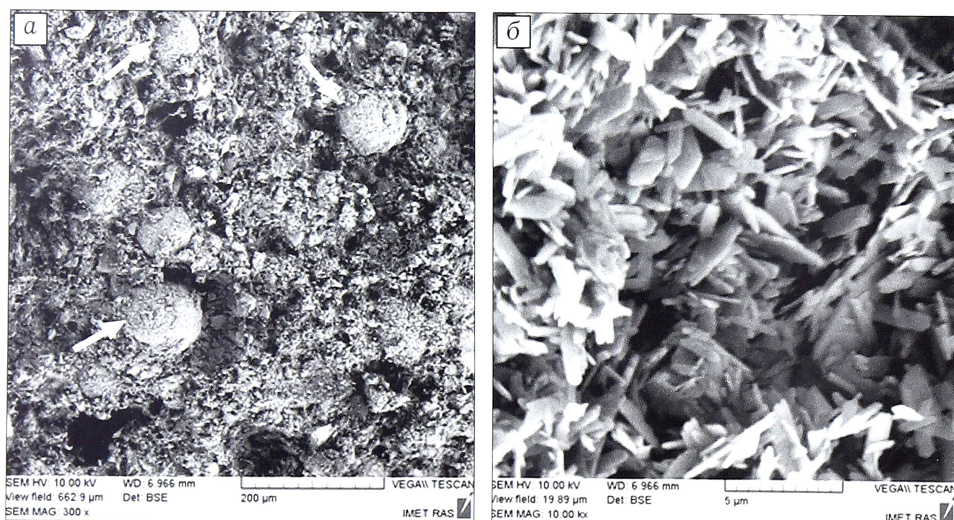


Рис. 1. Кальцийфосфатный цемент после затвердевания (сутки).

а — $\times 300$, б — $\times 10\,000$.

Видны поры размером от нескольких микрон до 10–100 мкм, кристаллы пластинчатой морфологии, которые соответствуют брушиту, и керамические гранулы КГА (указаны стрелками).

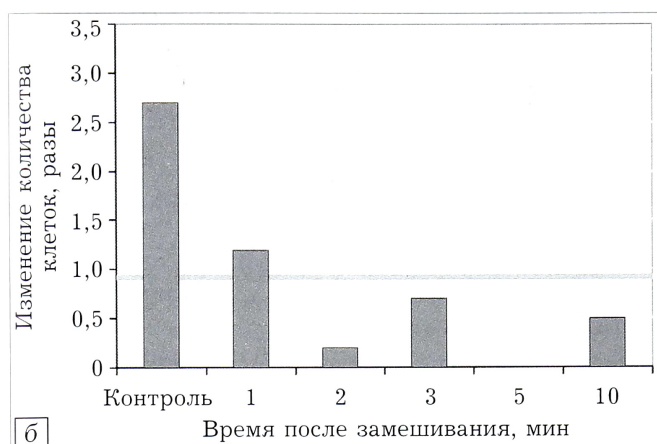


Рис. 2. Изменение количества ММСК, культивируемых в присутствии КФЦ (а) и цемента ПММА (б) на разных сроках затвердевания.

бекулы, враставшие в затвердевший костный цемент, отсутствовала соединительнотканная прослойка между биоматериалом и стенками костного дефекта. Кроме того, было отмечено, что нерезорбированный КФЦ в центре сохранял свою прочность вплоть до полного замещения новообразованной костной тканью. В свою очередь новообразованная кость по прочности превосходила таковую окружающих трабекул губчатой костной ткани. Возможно, это связано с присутствием в составе материала гранул КГА с низкой скоростью биорезорбции. Последние, оставаясь замурованными в новообразованной кости, поддерживают остеогенез на своей поверхности и не позволяют произойти полной резорбции костных балок в процессе ремоделирования.

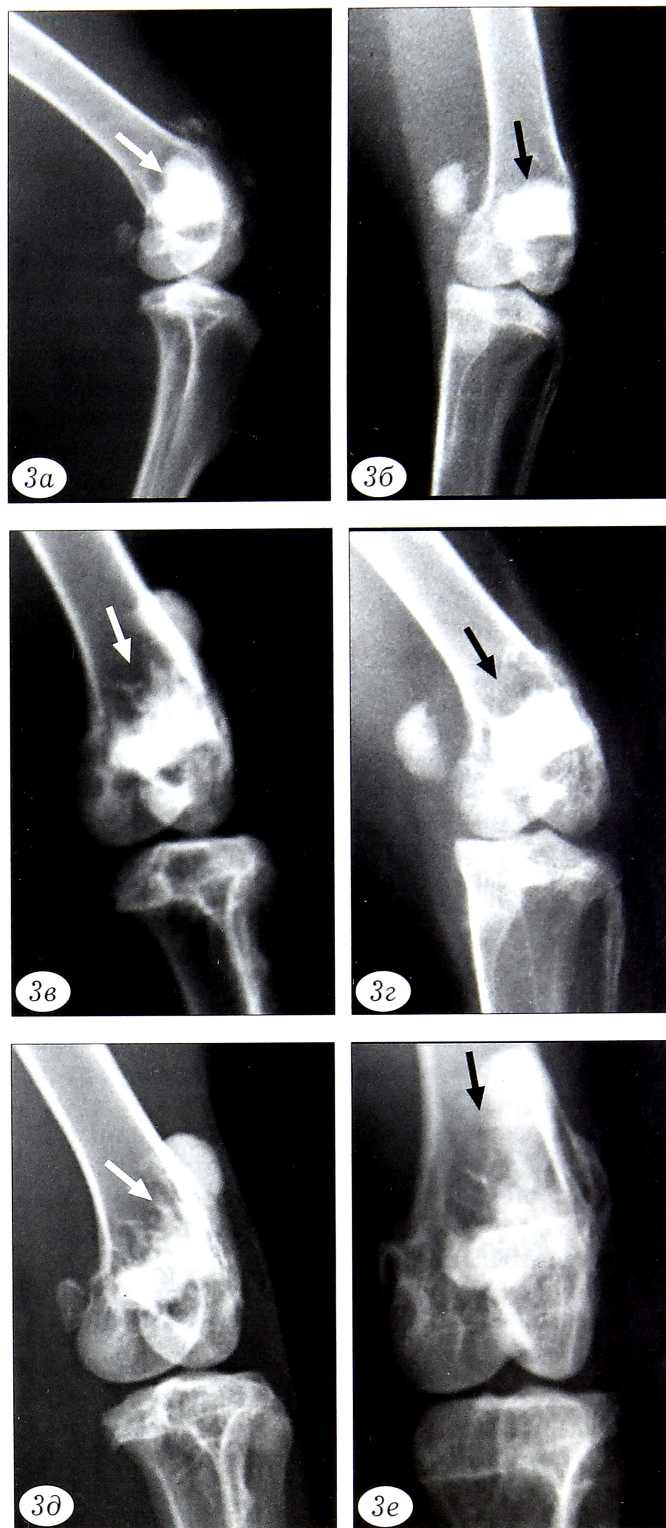
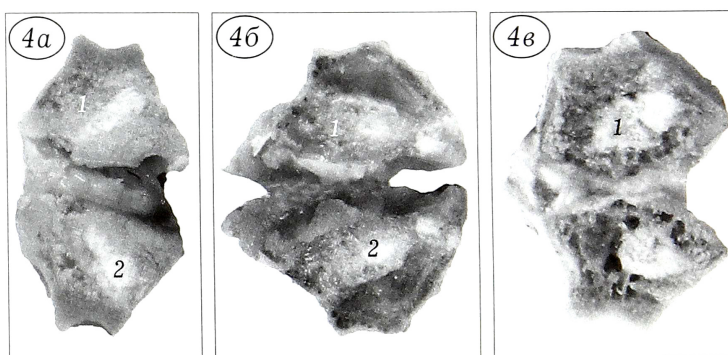


Рис. 3. Рентгенограммы дистального отдела бедренной кости кролика через 7 дней (а), 6 нед (б), 3 мес (в), 6 мес (г), 9 мес (д) и 12 мес (е) после операции. Стрелками отмечен костный дефект, заполненный КФЦ.

Рис. 4. Поперечный срез дистального отдела бедренной кости кролика в зоне заполнения костного дефекта КФЦ на сроках 6 мес (а), 9 мес (б) и 12 мес (в) после операции.

1 — новообразованная костная ткань на месте резорбции КФЦ, 2 — нерезорбированный КФЦ.



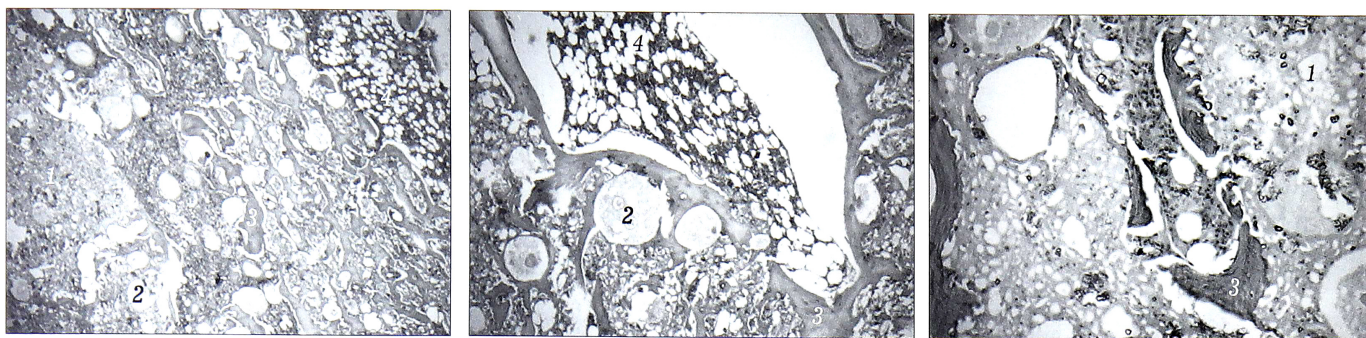


Рис. 5. Гистологические препараты поперечных срезов дистального отдела бедренной кости кролика в области заполнения костного дефекта КФЦ. Окраска гематоксилином и эозином.

а — $\times 50$, б — $\times 100$, в — $\times 200$.

1 — нерезорбированный КФЦ*, 2 — гранула КГА, 3 — новообразованные костные трабекулы, 4 — кроветворный костный мозг в межтрабекулярном пространстве.

*При пробоподготовке экспериментальные костные образцы подвергаются деминерализации, в ходе которой все костные минералы разрушаются и вымываются, а потому и КФЦ не сохраняется. Данные гистологии мы сопоставляли с данными аутопсии, где был виден нерезорбированный цемент (см. рис. 4). Наличие в КФЦ связанных микро- и макропор приводит к заполнению их биологическими жидкостями, содержащими в своем составе белковые субстанции, которые мы и видим в тех областях, которые ранее были заполнены неорганическим костным цементом.

Результаты гистологического исследования также свидетельствовали о наличии плотного контакта губчатой кости стенок дефекта с биоматериалом и постепенном прорастании новообразованной кости внутрь костного цемента от периферии к центру (рис. 5). По мере замещения КФЦ керамические гранулы оказывались замурованными в новообразованной кости. Костный мозг по периферии костного дефекта сохранял свою клеточность на всех сроках наблюдения даже в зоне непосредственного контакта с затвердевшим КФЦ, постепенно заполняя межтрабекулярное пространство в новообразованной кости. Умеренно выраженный цитотоксический эффект, вероятно, тоже связан с изменениями pH.

Можно сказать, что кинетика резорбции КФЦ определяется скоростью резорбции основной его составляющей части (брушит), которая в нашем эксперименте составила 2,5–3 мм в год (радиус костного дефекта). В то время как не рассосавшиеся гранулы КГА позволили предупредить резорбцию новообразованных костных балок в процессе ремоделирования и сохранить механическую прочность в зоне дефекта.

ВЫВОДЫ

1. Разработанный КФЦ характеризуется относительно высокими прочностными характеристиками (прочность при сжатии около 15 ± 3 МПа) и способностью к затвердеванию в зоне дефекта в присутствии биологических жидкостей (около 3–4 мин).
2. Материал обладает гемостатическим эффектом, что важно при остановке кровотечений из костной раны, особенно при наличии дефектов плазменного гемостаза.
3. Кальцийфосфатный цемент умеренно цитотоксичен в процессе затвердевания.
4. После затвердевания в зоне дефекта цемент не теряет своих прочностных характеристик на

протяжении всего периода резорбции, а за счет присутствия керамических гранул КГА способен поддерживать высокие прочностные характеристики новообразованной кости в течение продолжительного периода.

5. Полная резорбция КФЦ с замещением на костную ткань происходит за 12 мес, что, учитывая размер дефекта на кроличьей модели, составляет 3 мм в год.

6. Принимая во внимание физико-химические и биологические свойства КФЦ, можно рекомендовать его широкое применение для замещения костных дефектов, в том числе и посредством инъекционного введения.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 13-04-12025.

ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]

1. Bohner M. Design of ceramic-based cements and putties for bone graft substitutions. Eur. Cell Mater. 2010; 20: 1–12.
2. Dorozhkin S.V. Calcium orthophosphate cements and concretes. Materials. 2009; 2: 221–91.
3. Баринов С.М., Комлев В.С. Биокерамика на основе фосфатов кальция. М: Наука; 2005 [Barinov S.M., Komlev V.S. Calcium phosphates based bioceramics. Moscow: Nauka; 2005 (in Russian)].
4. Brown W.E., Chow L.C. A new calcium phosphate, water setting cement. In: Brown W.E. ed. Cements research progress. Ohio: ACerS; 1987; 352–79.
5. Chow L.C., Takagi S. A natural bone cement – A laboratory novelty led to the development of revolutionary new biomaterials. J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol. 2001; 106: 1029–33.
6. Lemaitre J., Mirtchi A.A., Mortier A. Calcium phosphate cements for medical use: state of the art and perspectives of development. Silic. Ind. 1987; 9–10: 141–6.
7. Dorozhkin S.V. Self-setting calcium orthophosphate formulations: cements, concretes, pastes and putties. J. Funct. Biomater. 2011; 2: 1–80.
8. Barinov S.M., Komlev V.S. Calcium phosphate bone cements. Inorganic Mater. 2011; 47: 1470–85.

9. Комлев В.С., Фадеева И.В., Гурин А.Н., Ковалева Е.С., Смирнов В.В., Гурин Н.А., Баринов С.М. Влияние содержания карбонат-групп в карбонатгидроксиапатитовой керамике на ее поведение in vivo. Неорганические материалы. 2009; 45: 373–8 [Komlev V.S., Fade-

eva I.V., Gurin A.N., Kovalyova E.S., Smirnov V.V., Gurin N.A., Barinov S.M. Effect of the concentration of carbonate groups in a carbonate hydroxyapatite ceramic on its in vivo behavior. Neorganicheskie materialy. 2009; 45: 373–8 (in Russian)].

Сведения об авторах: Мамонов В.Е. — канд. мед. наук, зав. научно-клиническим отделением гематологической ортопедии ГНЦ; Чемис А.Г. — канд. мед. наук, ст. науч. сотр. того же отделения ГНЦ; Дризе Н.И. — доктор биол. наук, зав. лабораторией физиологии кроветворения ГНЦ; Проскурина Н.В. — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. той же лаборатории; Кряжков И.И. — мл. науч. сотр. лаборатории керамических композиционных материалов ИМЕТ РАН; Комлев В.С. — доктор техн. наук, вед. науч. сотр. той же лаборатории.

Для контактов: Мамонов Василий Евгеньевич. Москва, Новый Зыковский пр., д. 4. Тел.: +7 (903) 165–74–44. E-mail: vasily-mamonov@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2014

СТРУКТУРНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ПРОКСИМАЛЬНОГО ОТДЕЛА БЕДРЕННОЙ КОСТИ В ОЦЕНКЕ ЕЕ ПРОЧНОСТИ

С.С. Родионова, А.Н. Торгашин, Э.И. Солод, Н.С. Морозова, А.К. Морозов, С.В. Лапкина

ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова»
Минздрава России, Москва, РФ

Проведена сравнительная оценка использования программного обеспечения HSA software, прилагаемого к денситометру Hologic, в двух группах больных остеопорозом (средний возраст 60,4 года) с и без перелома проксимального отдела бедренной кости. В трех зонах проксимального отдела бедренной кости (узкая часть шейки, межвертельная область, область диафиза бедренной кости) оценивали площадь поперечного сечения, момент инерции поперечного сечения, осевой момент сопротивления сечения, толщину кортикальной кости и коэффициент изгиба. Результаты линейного дискриминантного анализа показали, что совокупность 9 из 15 геометрических параметров, оцениваемых данной программой, позволяет со 100% вероятностью отличить пациентов с переломом от пациентов без переломов, что дает основание рекомендовать метод для внедрения в широкую клиническую практику для своевременного выявления больных с высоким риском перелома проксимального отдела бедренной кости.

Ключевые слова: перелом бедренной кости, толщина кортикального слоя, системный остеопороз, прогнозирование, порог нестабильности.

Structural Parameters of Proximal Femur in Evaluation of Its Strength

S.S. Rodionova, A.N. Torgashin, E.I. Solod, N.S. Morozova, A.K. Morozov, S.V. Lapkina

Central Institute of Traumatology and Orthopaedics named after N.N. Priorov, Moscow, Russia

Comparative assessment of software HAS for Hologic densitometer was performed in two groups of osteoporotic patients (mean age 60.4 years) with and without proximal femur fractures. The area of cross-section, cross-section moment of inertia, axial moment of section resistance, cortical bone thickness and coefficient of bending were assessed in three zones of the femur (narrow part of the neck, intertrochanteric and diaphyseal zones). Results of linear discriminant analysis showed that totality of 9 out of 15 geometric parameters assessed by that program enabled with 100% probability to differentiate patients with and without fractures and gave the background to introduce that method into clinical practice for timely detection of patients with high risk of proximal femur fracture.

Key words: femur fracture, cortical layer thickness, systemic osteoporosis, prognostication, instability threshold.

Поиск метода неинвазивной оценки прочности проксимального отдела бедренной кости для раннего выявления пациентов с риском перелома этой локализации при системном остеопорозе по-прежнему актуален. Свидетельством значимости проблемы служат данные о сохранении высокой частоты переломов шейки бедра при низкоэнергетической

травме и больших экономических затрат на их лечение [1].

Возлагаемые надежды на использование для прогнозирования перелома показателя массы кости (минеральной плотности кости — МПК) с помощью рентгеновской денситометрии не оправдались: переломы часто возникают при относи-