

Національна академія медичних наук України
Державна установа «Інститут патології хребта та суглобів імені професора
М.І. Ситенка Національної академії медичних наук України»

ЛУ ЧЖОУ

УДК: 616-018:615.477 (566.26):576.3-57.085.23-092.9

**МОЖЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ МАТЕРІАЛІВ НА ОСНОВІ
ВУГЛЕЦЮ ДЛЯ ЗАПОВНЕННЯ КІСТКОВИХ ПОРОЖНИН
(експериментальне дослідження з клінічною апробацією)**

14.01.21 – травматологія та ортопедія

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Харків – 2017



Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Харківській медичній академії післядипломної освіти МОЗ України.

Науковий керівник: доктор медичних наук професор
заслужений діяч науки і техніки України
КОРЖ Микола Олексійович
Державна установа «Інститут патології хребта та суглобів імені професора М.І. Ситенка Національної академії медичних наук України»,
директор

Офіційні опоненти: доктор медичних наук професор
ГОЛКА Григорій Григорович
Харківський національний медичний університет МОЗ України, завідувач кафедри травматології та ортопедії

доктор медичних наук, доцент
КЛИМОВИЦЬКИЙ Федір Володимирович
Донецький національний медичний університет МОЗ України, завідувач кафедри травматології, ортопедії та ВПХ ФПО

Захист відбудеться « 1 » вересня 2017 р. об 11.30 на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.607.01 Державної установи «Інститут патології хребта та суглобів імені професора М.І. Ситенка Національної академії медичних наук України» (61024, м. Харків, вул. Пушкінська, 80).

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Державної установи «Інститут патології хребта та суглобів імені професора М.І. Ситенка Національної академії медичних наук України» (61024, м. Харків, вул. Пушкінська, 80).

Автореферат розісланий « 27 » липня 2017 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
заслужений діяч науки і техніки України
доктор медичних наук професор



В.О.Радченко

Актуальність теми. Штучні та синтетичні біоматеріали займають міцні позиції в ортопедії і травматології. За даними Євросоюзу, у 2002 р. у світі імплантати були необхідними 4,9 млн. осіб, але вже у 2010 р. їхня кількість зросла до 39,7 млн. (Technology and market, 2014). Використання штучних і синтетичних біоматеріалів є альтернативою автотрансплантації, оскільки під час проведення хірургічного лікування відсутня необхідність отримання автотранспланта, що скорочує тривалість втручання (Корж А.А., 1992; Корж Н.А. и др., 2014).

Останніми роками значно розширився арсенал замісних матеріалів для кістки. Під час реконструктивно-відновлювальних операцій на скелеті для заповнення кісткових порожнин і остеосинтезу застосовують різні біоматеріали – алюмооксидну й кальційфосфатну кераміки, біоскло, кістковий цемент, полімери, які біодеградують (полілактид і полігліколід), сплави магнію, матеріали на основі вуглецю тощо. Досвід вивчення поведінки біоматеріалів в організмі свідчить, що дотепер не вдалося створити адекватний замітник натуральної кістки. Оскільки проблема розроблення й дослідження нових штучних і синтетичних біоматеріалів обумовлена різноманітними високими вимогами, вона не втрачає своєї актуальності, триває пошук біоматеріалів і створення імплантатів, які наближалися б за властивостями до кісткової тканини (Золкин П.И., Островский В.С., 2014; Корж Н.А., 2014).

Формування кістки в зоні імплантації біоматеріалів залежить від багатьох факторів – метаболічних, імунологічних, стану кісткової тканини, а також значною мірою від складу, структурних і механічних характеристик біоматеріалу, в якому розробники намагаються поєднати не лише замісну функцію для втрачених фрагментів кістки, а й здатність до остеointegraції та оптимізації репаративного остеогенеза. Однією з таких розробок є створення та впровадження в практику ортопедії і травматології імплантатів на основі вуглецю, які мають достатній запас механічної міцності та з яких можливо виготовляти ендопротези різної форми й розміру, проводити радіотерапію після екстирпації пухлини або електростимуляцію для підвищення репаративних процесів після перелому. Матеріал не має магнітних властивостей, не спричинює алергічних проявів, він біоінертний та відносно дешевий (Комаров М.П. 2008; Тяжелов А.А., 2008; Steinberg E.L., Rath E., 2012; Nillock R., Howard S., 2014; Zimel M.N., 2015).

Для визначення придатності певного матеріалу, призначеного для пластики тканин організму разом із вимогами, які пред'являють до структури матеріалу, обов'язковою ланкою в дослідженні є експериментально-біологічні підходи. Відомо, що навіть незначна модифікація матеріалу (елементний склад, фазовий стан, топографія і структура поверхні тощо) може значно змінити його властивості (Корж Н.А. и др., 2014).

Медико-біологічні дослідження залишаються актуальними та значущими щодо вивчення поведінки в кістці штучних і синтетичних біоматеріалів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами й темами. Дисертаційна робота виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт Державної установи «Інститут патології хребта та суглобів імені професора

М.І. Ситенка Національної академії медичних наук України» та договору про науково-практичне співробітництво між Харківською медичною академією післядипломної освіти Міністерства охорони здоров'я України та Державною установою «Інститут патології хребта та суглобів імені професора М.І. Ситенка Національної академії медичних наук України» («Розробити нові та удосконалити існуючі методики алокомпозитного ендопротезування при лікуванні хворих з пухлинами довгих кісток»); шифр теми ЦФ.2014.4.НАМНУ, держреєстрація № 0114U003018. У межах теми автором проведені експериментальні дослідження на тваринах, проаналізовані результати метаболічного стану організму і регенерації кістки після імплантації в кісткові дефекти різних форм вуглецевого біоматеріалу «Карбопон-22» на основі віскози).

Мета роботи: оцінити ефективність нових видів вуглецевих біоматеріалів для обґрунтування можливості їх використання в ортопедії і травматології для заповнення кісткових порожнин.

Завдання роботи:

1. Розкрити за даними літератури тенденції розвитку науки з проблеми впливу біоматеріалів на основі вуглецю на перебудову кісткової тканини в умовах заміщення кісткових порожнин.

2. Дослідити перебудову і регенерацію кісткової тканини навколо імплантованого повстиноподібного і щільного біоматеріалу в різні терміни спостереження.

3. Вивчити можливі токсичні прояви в органах і метаболічні показники організму в умовах імплантації в дефекти кісток вуглецевого біоматеріалу «Карбопон-22».

4. Дослідити за допомогою біомеханічних методів міцність кісткової тканини з імплантованим вуглецевим матеріалом.

5. Провести в клінічних умовах апробацію вуглецевого повстиноподібного біоматеріалу для заповнення кісткових порожнин у пацієнтів під час виконання реконструктивно-відновлювальних хірургічних втручань.

Об'єкт дослідження – перебудова і регенерація кістки в умовах імплантації вуглецевого матеріалу повстиноподібної та щільної структури.

Предмет дослідження – вуглецевий матеріал «Карбопон-22», морфологія регенерату кістки, сироватка крові щурів, культура фібробластів, міцнісні якості стегнової кістки з імплантованим біоматеріалом.

Методи дослідження: клінічний і рентгенологічний – для оцінювання результатів лікування пацієнтів; гістологічний, морфометричний, електронно-мікроскопічний, поляризаційно-оптичний – для вивчення регенерації і перебудови кістки в умовах імплантації вуглецевого матеріалу «Карбопон-22»; культура клітин і цитологічний – для оцінювання впливу вуглецевого матеріалу на життєздатність клітин, фенотип і проліферацію; біохімічний – для аналізу можливого токсичного впливу біоматеріалу; біомеханічний – для вивчення міцності кістки після імплантації біоматеріалу; статистичні – для об'єктивізації отриманих результатів.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше теоретично

обґрунтовано можливість використання як замітника кістки нового вуглецевого біоматеріалу щільної та повстиноподібної структури («Карбопон-22» на основі віскози). Отримано нові наукові знання про особливості регенерації, ультраструктурної організації клітин і макромолекулярної організації органічного матриксу кісткової тканини в умовах імплантації в модельовані кісткові дефекти вуглецевого біоматеріалу «Карбопон-22».

Уперше виявлено, що новий повстиноподібний вуглецевий біоматеріал («Карбопон-22») не порушує репаративний остеогенез, сприяє формуванню повноцінної кісткової тканини з колагеном I типу, не викликає запальної реакції, не чинить токсичної дії на рівні тканин організму.

Уперше доведено, що перебудова повстиноподібного біоматеріалу після його імплантації в кістковий дефект пов'язана з формуванням адгезивної матриці, яка сприяє хемотаксису і прикріпленню клітин до фрагментів біоматеріалу, що забезпечує на ранніх термінах регенерації (3 і 7-а доба) утворення грануляційної і фіброретикулярної тканини остеогенного типу. На пізніші терміни (14 і 45-а доба) між волокнами вуглецевого біоматеріалу формується кісткова тканина з утворенням щільного блоку. Доповнено наукові дані про те, ще резорбція вуглецевого біоматеріалу здійснюється макрофагами.

Уперше виявлено, що в разі використання щільної форми вуглецевого біоматеріалу «Карбопон-22» уздовж його периметра активно перебігає репаративний остеогенез, який пов'язаний із заміщенням зруйнованої материнської кістки новоутвореною кістковою тканиною з колагеном I типу без формування сполучнотканинної капсули.

Практичне значення одержаних результатів. Результати дослідження структурно-метаболических змін у кістковій тканині після імплантації в кісткові дефекти вуглецевого біоматеріалу «Карбопон-22», міцнісних якостей системи «кістка - імплантат» є обґрунтуванням для його використання в травматології та ортопедії як замітника кістки, а також для розробки диференційованого підходу до вибору виду (щільного або повстиноподібного) біоматеріалу «Карбопон-22» в конкретній клінічній ситуації. Повстиноподібний вуглець може бути рекомендований для заповнення «критичних» кісткових дефектів різної конфігурації. Щільний вуглецевий біоматеріал може бути використаний як у навантажуваних, так і в малонавантажених відділах скелета.

Позитивні результати експериментального дослідження щодо застосування вуглецевих біоматеріалів для заміщення кісткових дефектів стали основою для проведення клінічної апробації з використання вуглецевих біоматеріалів щодо заповнення порожнин у пацієнтів після видалення кіст.

Результати дослідження впроваджені в клінічну практику та лекційні курси кафедри травматології та ортопедії ДУ «Запорізька медична академія післядипломної освіти МОЗ України», Закарпатської обласної клінічної лікарні ім. А. Новака, кафедри загальної хірургії з курсами травматології, оперативної хірургії та судової медицини ДВНЗ «Ужгородський національний університет», ТОВ «Клініка МОТОР СІЧ, ДУ «Інститут патології хребта та суглобів імені професора М.І. Ситенка НАМН України».

Особистий внесок дисертанта. Дисертант спільно з керівником

сформулював мету і завдання роботи, самостійно проаналізував наукову літературу з досліджуваної проблеми. Автор брав участь у проведенні експериментальних досліджень на тваринах і аналізі отриманих результатів. Наукові дослідження виконані в Державній установі «Інститут патології хребта та суглобів імені професора М.І. Ситенка НАМН України»: експериментальні – з моделювання дефекту кістки у тварин і аналіз культур фібробластів після їх культивування з вуглецевим біоматеріалом проведені в лабораторії експериментального моделювання за консультативної допомоги к.б.н. Малишкіної С.В.; гістологічні – в лабораторії морфології сполучної тканини за консультативної допомоги д.б.н., професора Дедух Н.В.; біохімічні – у відділі клінічної діагностики та імунології за консультативної допомоги к.б.н. Леонтьєвої Ф.С.; біомеханічні – в лабораторії біомеханіки за консультативної допомоги наукового співробітника Карпінського М.Ю. Участь співавторів відображено в спільних наукових публікаціях.

Апробація результатів дослідження. Основні положення дисертаційної роботи й результати досліджень представлені на Всеукраїнській науково-практичній конференції «Сучасні дослідження в ортопедії і травматології», присвяченої пам'яті академіка О.О. Коржа (Харків, 2016); науково-практичній конференції «Індивідуальна анатомічна мінливість органів, систем, тканин людини та її значення для практичної медицини і стоматології» (Полтава, 2016); науково-практичній конференції «Прикладні аспекти морфології» (Тернопіль, 2016).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 6 наукових праць, із них 5 статей у наукових фахових виданнях, 1 робота в матеріалах наукової конференції.

Структура і обсяг дисертації. Дисертація представлена на 145 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, аналітичного огляду наукової літератури, опису матеріалу і методів дослідження, 7 розділів власних досліджень, висновків, додатків, списку використаних джерел із 94 джерел (із них 43 англомовні публікації). Робота містить 53 рисунки та 11 таблиць.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріал і методи. Експериментальні, морфологічні, біохімічні та біомеханічні дослідження проведені на 157 білих лабораторних щурах після імплантації в метадіафізарні дефекти стегнової кістки щільного і повстиноподібного вуглецевого матеріалу «Кабопон-22» на основі віскози. Частина роботи виконана в культурі фібробластів за умов спільного культивування клітин і зразків вуглецевого матеріалу.

Експерименти на щурах проведено з дотриманням вимог «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986) та Закону України щодо гуманного ставлення до піддослідних тварин (№ 3447–IV, 2006 р.). Протокол експериментів на тваринах затверджений комітетом із біоетики ДУ «ПІХС ім. проф. М. І. Ситенка НАМН» » (протокол № 117 від 22.04.2013).

Щурів, відібраних для експерименту (55 тварин), розподілили на три групи:

1-а (контрольна) – моделювання стандартного дірчастого дефекту (діаметром 3 мм та глибиною 3 мм). Такі дефекти відносять до «критичних», тобто повна регенерація з формуванням кісткової тканини в них не відбувається (Spicer P. P., Kretlow J. D., Young S., 2012) – 15 щурів;

2-а – моделювання стандартного дірчастого дефекту й імплантація в нього повстиноподібного вуглецевого матеріалу – 20 щурів;

3-я – моделювання стандартного дірчастого дефекту й імплантація в нього щільного вуглецевого матеріалу – 20 щурів.

Техніка хірургічного втручання. Для моделювання кісткового дефекту щурам під загальним внутрішньом'язовим знеболенням (аміназин 10 мг/кг, кетамін 50 мг/кг) в умовах асептики розрізали шкіру і параосальні тканини в зоні латерального відділу дистального метафіза стегнової кістки. За допомогою стоматологічного бору (діаметр 3 мм) відтворювали транскортикальну кісткову порожнину на глибину 3 мм, яку щільно заповнювали вуглецевим біоматеріалом. У контрольних тварин дефект не заповнювали.

Тварин виводили з досліду під наркозом шляхом декапітації на 7, 14, 28 і 45-ту добу після операції. Ці терміни відповідають різним стадіям остеорепаративного процесу. Метод виведення тварин із експерименту обумовлений необхідністю забору крові для біохімічного дослідження з метою вивчення метаболічних показників організму після імплантації вуглецевого біоматеріалу в дистальний відділ стегнової кістки.

Для морфологічного і біомеханічного дослідження виділяли стегнову кістку з імпантованим матеріалом.

Експеримент щодо імплантації біоматеріалу в підшкірну жирову клітковину проведений на 12 білих лабораторних щурах-самцях віком 3 міс., масою тіла (190 ± 20) г. Відповідно до ДСТУ ISO 10993-6:2004 на спині щура латерально від хребта нижче лопатки виконували розріз шкіри і в утворену «кишеню» підшкірної жирової клітковини імпантували зразки щільного і волокнистого біоматеріалу (у формі таблетки або кулі – діаметр 5 мм, висота 2 мм). Рану зашивали шовком. Дослідження капсули, яка сформувалася навколо імпантатів, проводили на 30 і 90-ту добу після виведення тварин з експерименту і гістологічної проводки. Підшкірна жирова клітковина добре забезпечується кров'ю, характеризується високою щільністю клітин. Це дає змогу оцінити локальну запальну реакцію і можливу токсичну дію імпантованого біоматеріалу шляхом морфологічного аналізу стану утвореної навколо нього капсули (клітинного складу, кількості та фенотипу клітин, характеристики колагенових волокон, наявності кровоносних судин), а також біосумісність щільного і повстиноподібного вуглецевого біоматеріалу через кількісне оцінювання товщини капсули.

Для визначення токсичної дії та можливої міграції частинок вуглецевого біоматеріалу на 180-ту добу після підшкірної його імплантації вивчено внутрішні органи щурів із імпантованими зразками (серце, печінка, нирки, селезінка, легені, лімфатичні вузли).

Дослідження in vitro. Використовували первинну культуру фібробластів, отриману з підшкірної жирової клітковини лабораторних щурів, в інкубаційному середовищі яких був присутній вуглецевий матеріал. Кількість клітин для посіву становила 2×10^4 в 1 мл 199 середовища. У суспензії клітин, виділених зі стекел шляхом трипсинізації (0,25 % розчином трипсину), оцінювали життєздатність клітин, проліферативну активність і фенотип. Визначення кількості живих клітин у підготовленому для культивування концентраті, а також знятих із стекел відповідно до термінів культивування проводили з 0,1 % розчином кристалвіолету, підраховуючи їхню кількість у камері Горяєва. Загиблі клітини виявляли після фарбування клітинної суспензії 0,1 % розчином трипанового синього. Особливістю цього методу є здатність барвника проникати в клітини через ушкоджену мембрану, фарбуючи їхню цитоплазму. Крім того, на терміни 3 та 5 днів клітини на стеклах поміщали в фіксатор Майн-Грюнвальд і фарбували азуз-еозином за Романовським для оцінювання структурної організації. Кількість мітозів (у проміле – ‰) визначали на основі аналізу 1000 клітин.

Цитологічне дослідження клітин на стеклах проводили з використанням світлового мікроскопа MICROS (Austria) (об. 20, 40; ок. 10), фотографували за допомогою цифрової фотокамери Canon EOS-300D.

Для *гістологічного дослідження* використовували дистальну частину стегнової кістки контрольних і дослідних тварин із ділянкою дефекту. Матеріал фіксували в 10 % нейтральному формаліні, декальцинували в 4 % розчині азотної кислоти, відокремлювали дистальну частину стегнової кістки з імплантованого матеріалом. Надалі фрагмент кістки готували для дослідження, керуючись рекомендаціями Д. С. Саркісова і Ю. Л. Перова (1996).

Під час дослідження капсул, сформованих навколо підшкірно імплантованого вуглецевого біоматеріалу, а також внутрішніх органів щурів із гістологічної проводки матеріалу був виключений етап декальцинації.

Для об'єктивізації формування регенерату і перебудови материнської кісткової тканини навколо імплантованого вуглецевого біоматеріалу використано морфометричний аналіз. Визначали відносну площу новоутвореної кісткової тканини в незаповнених дефектах (контроль) і з повстиноподібним вуглецевим матеріалом (дослід) за допомогою квадратно-сітчастої вставки (сітка Автанділова Г.Г. з 286 точками). Для цього підраховували кількість точок – перетинів квадратів (умовні одиниці) сітки Автанділова, які потрапляли на територію досліджуваного об'єкта, а потім вираховували відсоток від площі дефекту (мікроскоп MICROS, об. 4, ок. 10). Середню кількість остеоцитів у материнській кістці підраховували по периметру дефекту в 5 полях зору. Товщину сполучнотканинної капсули, яка сформувалася навколо біоматеріалу після його імплантації в підшкірну жирову клітковину, визначали в 5 ділянках за допомогою окуляр-мікрометра МОВ-1-15×.

Аналіз і фотографування матеріалу проводили під мікроскопом «Axiostar Plus» (Carl Zeiss) із використанням цифрової фотокамери Canon EOS-300D.

Для *ультраструктурного дослідження* кісткової тканини виділяли фрагмент дистального метадіафіза з імплантованим вуглецевим матеріалом.

Вилучений фрагмент розрізали на шматочки розміром близько 1 мм^3 і обробляли за стандартним методом електронної мікроскопії відповідно до рекомендацій Б. Уікли (1975). Напівтонкої (1-2 мкм) і ультратонкої зрізи (0,05-0,09 мкм) виготовляли за допомогою скляних ножів на ультрамікротомі УМПТ-3М. Диференційне забарвлення напівтонких зрізів проводили 1 % розчином метиленового синього і 1 % розчином основного фуксину. Ультратонкі зрізи контрастували цитратом свинцю і ураніацетатом за методом Reynolds (1963). Ультраструктурний аналіз проводили в трансмісійному електронному мікроскопі ЕМВ-100БР (зб. 3 000–35 000).

Вивчали стан колагену в ділянці кістки з імплантованим біоматеріалом після реакцію з сиріусом червоним (Schmitz N., 2010). Колаген I типу в поляризованому світлі давав червону рефракцію, III – зелену. Отримані результати використані для оцінювання зрілості колагену.

Для вирішення завдання *оцінювання метаболічного статусу* щурів (60 тварин) із вуглецевим біоматеріалом, розташованим у дефектах стегнових кісток, визначено комплекс біохімічних показників, які відображають наявність або відсутність в імплантованого матеріалу загальнотоксичного, гепатотоксичного та нефротоксичного ефектів.

Вміст загального білка у сироватці крові визначали біуретовим методом. Протеїнограми сироватки крові досліджували нефелометричним методом із використанням наборів фосфатних буферів НВО «Фелисит-Диагностика» (м. Дніпропетровськ, Україна) з подальшим фотометруванням (Камышников В.С., 2003). Функціональний стан печінки оцінювали за динамікою активності аланінамінотрансферази (АЛАТ) та аспартатамінотрансферази (АсАТ). Активність цих ферментів вивчали кінетичним методом за допомогою діагностичних наборів фірми Lachema (Брно, Чехія).

Для оцінювання стану кісткового регенерату вивчали показники, які характеризують обмін гетерополісахаридів за рівнем хондроїтинсульфатів у сироватці крові в реакції її помутніння з риванолом (Слуцкий Л.И., 1969). Також вивчено кінетику сумарних хондроїтинсульфатів сироватки крові щурів.

Вміст глікопротеїнів у сироватці крові вивчали за методом С. Я. Штейнберг і Я. Н. Доценко в реакції з молібденовокислим амонієм (Карташов М.І. та ін., 2010).

Рівень вмісту гаптоглобіну служить важливим показником вираженості гострого запального процесу. Цей показник визначали за реакцією з риванолом за допомогою діагностичних наборів ПрАТ «Реагент» (м. Дніпропетровськ, Україна) (Камышников В.С., 2003).

Активність ферменту лужної фосфатази, важливого показника регенераторного потенціалу кісткової тканини, досліджували за допомогою стандартних наборів для кінетичного методу визначення її активності з діетаноламіном (фірми «DAS spectroMed», м. Кишинів, Молдова).

Вміст холестерину в сироватці крові вивчали ферментативно-фотометричним методом із холестерин-пероксидазою за допомогою наборів фірми «DAS spectroMed» (м. Кишинів, Молдова).

Для біомеханічних досліджень використано прооперовані та контралатеральні (як контроль) стегнові кістки 30 щурів. Оцінювали міцнісні властивості стегнової кістки на осьове навантаження на спеціальному стенді. Усі досліджувані препарати розподілено на 3 групи, зазначені вище.

Кожна досліджена група препаратів складалася з трьох підгруп: препарати тварин, виведених з експерименту на 14, 45 та 60-у добу.

Під час біохімічних випробувань препарати стегнових кісток щурів закріплювали за діафізарну частину. До кісток прикладали осьове стискальне навантаження до повного руйнування препарата. Зусилля, за якого сталося руйнування препарата, вимірювали за допомогою тензометричного датчика SBA-100L, результати фіксували пристроєм реєстрації CAS типу CI-2001A.

Клінічні дослідження. Проведено апробацію повстиноподібного біоматеріалу в пацієнтів із кістою п'яркової кістки. Для аналізу результатів лікування використано клінічні, рентгенологічні методи і комп'ютерну томографію.

Статистичний аналіз. Цифрові показники морфологічного і біохімічного досліджень опрацьовано методами варіаційної статистики із застосуванням t-критерію Ст'юдента Використано прикладной пакет STATISTICA 5.11 for Windows. Для порівняльного аналізу прооперованої та контралатеральної стегнової кісток тварин після проведення біомеханічного дослідження застосовано T-тест для парних порівнянь, порівняння між групами здійснювали за допомогою дисперсійного аналізу і апостеріорним тестом Дункана (SPSS, 2005).

Результати дослідження

Дослідження вуглецевого біоматеріалу в культурі фібробластів. Для попереднього скринінгу біоматеріалів застосовують експрес-метод, який проводиться в культурі клітин (метод біоіндикації), що дає можливість у короткий термін зробити висновок про наявність чи відсутність їх цитотоксичної дії на біологічні тканини. Виявлено, що фібробласти, культивовані з вуглецевим біоматеріалом «Карбопон-22», зберігали фенотип, визначено низький відсоток деструктивно змінених і загиблих клітин, тобто клітини в культурі перебували в стадії стабільного зростання. Підрахувавши кількість мітозів на 1000 клітин (проміле) встановили в контрольних культурах 16 ‰, а в дослідній – 15 ‰, тобто достовірних відмінностей не виявлено, що вказує на відсутність цитотоксичної дії вуглецевого біоматеріалу.

Відповідно до стандарту дослідження біоматеріалів наступним етапом роботи стало вивчення можливої запально-алергічної дії «Карбопон-22» після імплантації в підшкірну жирову клітковину. Результати морфологічних досліджень капсул, які утворилися навколо вуглецевих зразків, свідчать про відсутність запально-алергічної реакції компонентів підшкірної жирової клітковини (клітин і волокнистої стромы) на зазначені біоматеріали, їхню нетоксичність і біосумісність. У результаті морфометричного дослідження не встановлено достовірних відмінностей товщини стінок капсул у разі використання щільних та повстиноподібних зразків вуглецевого матеріалу через 90 діб – $(0,82 \pm 0,06)$ та $(0,72 \pm 0,05)$ мм відповідно. Запальної реакції і

деструктивних порушень у капсулах і прилеглий сполучній тканині не зафіксовано.

Результати патоморфологічного дослідження, отримані в процесі *вивчення внутрішніх органів щурів* (печінки, нирок, лімфатичних вузлів, серця, селезінки) через 90 діб після підшкірної імплантації біоматеріалу на основі вуглецю, свідчать про відсутність ознак токсичної дії. Не зафіксовано в них також мікрочастинок вуглецю.

Метаболічні показники організму у тварин із дефектом стегнової кістки, зміщеним вуглецевим біоматеріалами. Досліджено в сироватці крові показники білкового, вуглеводно-білкового і азотистого обмінів, які відображають перебіг гострого запального процесу і регенераторний потенціал кісткової тканини щурів, в яких експериментально утворений дефект кістки заповнювали вуглецевим біоматеріалом двох видів. У тварин не виявлено ознак загальнотоксичної, гепатотоксичної та нефротоксичної дії. Значення окремих показників перебігу гострого запалення (вміст глікопротеїнів, гаптоглобіну) у щурів із введеними щільними і повстиноподібними зразками вуглецевого біоматеріалу нормалізувалися в коротші терміни, ніж у тварин із незаповненим дефектом кістки.

Структурна організація і міцність кістки після імплантації біоматеріалу «Карбопон-22». Відтворений у контрольних тварин транскортикальний дефект «критичного» розміру в дистальному відділі стегнової кістки до 45-ї доби не заповнювався кістковим регенератом. Кісткові трабекули розташовувалися тільки в крайових відділах дефекту – на межі з материнською кісткою, а в центральній ділянці визначали фіброретикулярну тканину. У прилеглий до дефекту материнській кістці виявлені деструктивні порушення – осередки без клітин, розшарування матриксу, тріщини.

В умовах імплантації в кістковий дефект «критичного» розміру вуглецевого біоматеріалу повстиноподібної структури зафіксовано збільшення в 3,4 раза площ, займаних новоутвореною кістковою тканиною, порівняно з контрольними тваринами. У процесі вивчення динаміки регенерації в період із 14 до 45-ї доби площа кісткової тканини збільшилася в 1,7 раза (рис. 1, а). Кількість остеоцитів на материнських кісткових трабекулах була підвищеною в 1,4 раза на 14-ту добу порівняно з контролем (рис. 1, б). Аналізуючи кількість остеоцитів на 14 і 45-ту добу у тварин з імплантацією повстиноподібного вуглецевого матеріалу, виявили її підвищення в 5,9 раза.

Формування кісткової тканини в дефекті зафіксовано на ранні терміни, що може бути пов'язано з остеокондуктивними особливостями вуглецевого матеріалу, яким заповнили дефект. На стадії запалення вуглецевий матеріал виступає своєрідною матрицею, яка фіксує клітини, що беруть участь у регенерації й очищенні кісткової рани. Підвищення пулу клітин призводить до раннього переходу від стадії запалення до стадії проліферації, диференціації клітин і формування тканиноспецифічних структур. Водночас у дефектах «критичного» розміру тварин контрольної групи на 3-7-му добу в зоні дефекту розташований кров'яний згусток у стані перебудови, грануляційна та фіброзна тканини.

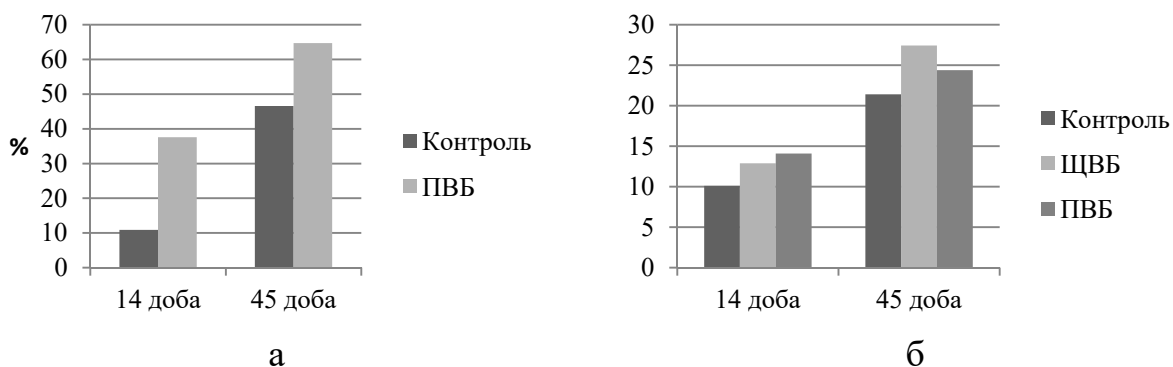


Рис. 1. Діаграми: а) відносна площа новоутвореної кісткової тканини в середині дефекту; б) кількість остеоцитів у материнських кісткових трабекулах на різні терміни. ПВБ – повстиноподібний вуглецевий біоматеріал; ЩВБ-щільний вуглецевий біоматеріал.

Особливістю повстиноподібного вуглецевого біоматеріалу є також те, що на пізні терміни репаративного остеогенезу його фрагменти або замуrowані в новоутвореній кістковій тканині без ознак деструкції прилеглої кістки, або частково утилізовані за участі макрофагів.

Використання повстиноподібного вуглецевого біоматеріалу не порушує репаративного остеогенезу, сприяє формуванню повноцінного регенерату у відтворених «критичних» дефектах кісток.

У процесі виконання роботи також оцінений біоматеріал на основі вуглецю щільної структури. Встановлено, що в разі заповнення модельованого в кістці дефекту щільні зразки вуглецевого біоматеріалу на досліджувані терміни не призводили до розвитку запальної реакції та прогресування деструктивних порушень у прилеглій кістці. Починаючи з ранніх термінів (7-ма доба) виявлено формування кісткової тканини на ділянках, що заміщають осередки деструкції материнської кістки, утворені під час моделювання дефекту. У процесі порівняння кількості остеоцитів у материнській кістці у тварин з імплантацією щільного вуглецю зафіксовано її підвищення у 2,1 раза на 14-ту добу і в 1,3 раза – на 45-ту порівняно з контролем.

Отримані результати свідчать, що разом з іншими біоматеріалами (корундовою і кальцій-фосфатною кераміками, кістковим цементом, полімерами на основі полілактиду і полігліколіду), які знайшли широке застосування в ортопедії для заміщення кісткових порожнин, синтетичний біоматеріал на основі вуглецю може бути використаний для пластики кісткових дефектів «критичного» розміру, без заміщення яких повноцінної регенерації не відбувається.

Біомеханічні дослідження міцності стегнової кістки щурів на осьове навантаження. Дослідження препаратів кісток щурів із дефектом, заповненим щільним або повстиноподібним біоматеріалом вуглецевим «Карбопон-22» довели, що біоматеріали витримують стискальне навантаження та можуть бути використані для заміщення дефектів і порожнин кістки.

Позитивні результати експериментального дослідження щодо

застосування вуглецевих матеріалів для заміщення дефектів кісток дали можливість провести клінічну апробацію повстиноподібного вуглецевого матеріалу «Карбопон-22». У результаті використання вуглецевого біоматеріалу для заміщення порожнин п'яткової кістки пацієнтів після видалення кист виявлено оптимізацію репаративного остеогенезу, що відкриває перспективи для подальшого застосування цього матеріалу в ортопедії і травматології.

ВИСНОВКИ

1. Проблема реконструкції кістки – одна з актуальних в ортопедії і травматології. Незважаючи на те, що основними матеріалами для заміщення дефектів кісток залишаються авто- і алотрансплантати, рівень розвитку біотехнологій передвіщає значний прогрес у галузі травматології і ортопедії завдяки створенню нових матеріалів, які мають високу сумісність із кістковою тканиною. Вимоги, які пред'являють до штучних синтетичних біоматеріалів, використовуваним для заміщення дефектів кісток, досить жорсткі. Матеріал повинен володіти механічною міцністю, близький до показників кісткової тканини модуль пружності, бути біосумісним, володіти остеокондуктивністю, біоактивністю або біодеградувати з синхронним заміщенням кістковою тканиною. Серед матеріалів для заміщення кісткової тканини, що мають ці якості, виділяють різновиди вуглецевого біоматеріалу.

2. Фібробласти в умовах культивування з вуглецевим біоматеріалом «Карбопон-22», зберігали фенотип на всіх термінах спостереження. Кількість деструктивно змінених клітин у дослідних і контрольних культурах була аналогічною. На підставі аналізу приросту клітин у культурах, характеру їх розташування на склі, підрахунку загальної кількості клітин з урахуванням деструктивно змінених і загиблих, а також кількості мітозів зроблено висновок, що досліджуваний вуглецевий біоматеріал є біосумісним і не чинить цитотоксичної дії на клітини.

3. Капсули, які утворилися навколо імплантованих підшкірно вуглецевих біоматеріалів на досліджувані терміни (30 і 90-та доби), були тонкими і містили клітини, характерні для сполучної тканини, що свідчить про біосумісність вуглецевого матеріалу. Ознак токсичної дії на органи і тканини організму не виявлено, не зафіксовано міграції частинок вуглецевого біоматеріалу в досліджені органи (нирки, печінка, селезінка, лімфатичні вузли, серце, легені).

4. Вуглецевий матеріал, введений у кістковий дефект «критичного» розміру, не спричинює хронічного запального процесу, не чинить токсичної дії на клітини прилеглої кісткової тканини і не порушує регенерацію. Остеорепаративний процес навколо щільного імплантату з вуглецевого біоматеріалу характеризувався формуванням кісткової тканини зі зрілими кістковими трабекулами з колагеном I типу, площа якої збільшувалася з терміном спостереження. У разі заповнення дефектів повстиноподібним вуглецевим біоматеріалом «Карбопон-22» утворювалася губчаста кісткова тканина, кісткові трабекули якої представлені також колагеном I типу. На пізні терміни репаративного остеогенезу фрагменти повстиноподібного вуглецевого

біоматеріалу в ділянці дефекту були замуrowані в новоутвореній кістковій тканині без ознак її деструкції. Особливістю повстиноподібного та щільного вуглецевого біоматеріалу є остеотропність і здатність до остеointegraції.

5. На підставі вивчення біохімічних показників сироватки крові, які характеризують стан білкового, вуглеводно-білкового і азотистого обміну та відображають перебіг гострого запального процесу і регенераторний потенціал кісткової тканини щурів, у яких експериментально утворений дефект кістки був заповнений вуглецевим матеріалом двох видів, показано відсутність ознак загальнотоксичної, гепатотоксичної та нефротоксичної дії. Значення окремих показників перебігу гострого запалення (вміст глікопротеїнів, гаптоглобіну) у тварин із вуглецевими імплантатами нормалізувалися в коротші терміни, ніж у контрольних щурів із незаповненими дефектами кістки. Рання нормалізація рівнів хондроїтинсульфату, активності лужної фосфатази вказує на оптимізувальний вплив вуглецевого імплантата на функціональну активність остеобластів і регенераторний потенціал кісткової тканини.

6. Міцнісні якості стегнової кістки на осьове навантаження в умовах імплантації в метадіафізарній дефект досліджених вуглецевих біоматеріалів були вищими порівняно зі стегною кісткою тварин із незаповненими дефектами. На 45-ту добу максимальне стискальне навантаження витримували препарати зі щільним вуглецевим біоматеріалом, а мінімальне – з незаповненими дефектами. Для зразків із дефектами кістки, заповненими повстиноподібним вуглецевим матеріалом на 60-ту добу міцність на осьове навантаження була аналогічною контралатеральній кінцівці.

7. Клінічна апробація вуглецевого біоматеріалу для заміщення дефектів кісткових порожнин після резекції кіст показала його біосумісність і здатність до перебудови з формуванням у порожнині кісткової тканини.

ПЕРЕЛІК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Малышкина С. В. Структурная перестройка костной ткани в условиях заполнения костных полостей синтетическим углеродным биоматериалом / С. В. Малышкина, Лу Чжоу, Н. В. Дедух // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2014. – № 3 (596). – С. 30-37.

Особисто автором проведено експеримент на тваринах, взято участь в аналізі результатів, сформульовано висновки.

2. Дедух Н. В. Репаративная регенерация костного дефекта, заполненного «войлокоподобным» углеродным биоматериалом / Н. В. Дедух, Лу Чжоу, С. В. Малышкина // Український морфологічний альманах. – 2014. – Т. 12, № 1. – С. 36-41.

Особисто автором відібрано матеріал для дослідження, взято участь в аналізі результатів.

3. Леонтьева Ф. С. Влияние на метаболический статус крыс углеродсодержащего биоматериала, имплантированного в дефект бедренной кости / Ф. С. Леонтьева, Б. Н. Шевцов, Лу Чжоу // Вісник проблем біології та медицини. – 2016. – Вип. 2, Т. 3 (130). – С. 155-158.

Автор провів набір матеріалу для дослідження, брав участь в аналізі результатів та статистичній обробці показників.

4. Дедух Н. В. Биоиндикация материала на основе углерода в исследованиях *in vitro* и *in vivo* / Н. В. Дедух, Лу Чжоу, И. В. Вишнякова // Вісник проблем біології та медицини. – 2016. – Вип. 3, Т. 1 (131).– С. 82-86.

Автор брав участь у проведенні хірургічних втручань на щурах та аналізі отриманих результатів, статистичній обробці цифрових показників.

5. Дедух Н. В. Регенерация и механическая прочность кости в условиях имплантации углеродного материала / Н. В. Дедух, М. Ю. Карпинский, Лу Чжоу, С. В. Малышкина // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2016. – № 3 (604). – С.41-47.

Автор брав участь у морфологічному та біомеханічному аналізі результатів, проводив статистичну обробку цифрових показників.

6. Лу Чжоу Морфологічні та біомеханічні дослідження синтетичного матеріалу на основі вуглецю / Лу Чжоу: матер. конф. [«Прикладні аспекти морфології»] (Тернопіль, 20-21 жовтня 2016 р.) – 2016. – С. 99-101.

АНОТАЦІЯ

Лу Чжоу. Можливості використання матеріалів на основі вуглецю для заповнення кісткових порожнин (експериментальне дослідження з клінічною апробацією). – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.12 – травматологія та ортопедія. – Державна установа «Інститут патології хребта та суглобів імені професора М.І. Ситенка Національної академії медичних наук України», Харків, 2017.

Дисертаційне дослідження спрямовано на визначення ефективності для ортопедії та травматології нового вуглецевого біоматеріалу «Карбопон-22» для заповнення кісткових порожнин на основі дослідження його впливу на організм та регенерацію кістки.

На підставі дослідження повстиноподібного вуглецевого біоматеріалу в культурі фібробластів, вивчення внутрішніх органів і метаболічних показників організму білих лабораторних щурів зроблено висновок про відсутність його цитотоксичної дії на клітини, не зафіксована міграція во внутрішні органи і не виявлено негативного впливу на метаболічні показники організму. Вивчення біохімічних показників сироватки крові показало відсутність ознаки загальнотоксичної, гепатотоксичної та нефротоксичної дії у тварин. Встановлено, що щільний і повстиноподібний вуглецевий біоматеріал, імплантований у дефекти «критичного» розміру, не викликає запальної реакції в параоссальних тканинах і не порушує репаративний остеогенез. У кістковому дефекті, заповненому повстиноподібним біоматеріалом на ранні терміни спостереження (14-та доба) формується губчаста кісткова тканина, а на пізніші терміни (45-та доба) зафіксовано формування щільного блоку «біоматеріал-кістка». У разі використання щільної форми вуглецевого біоматеріалу «Карбопон-22» по його периметру активно перебігає репаративний остеогенез, який пов'язаний із заміщенням зруйнованої материнської кістки внаслідок введення імплантата новоутвореною кістковою тканиною. Клінічна апробація вуглецевого біоматеріалу для заміщення дефектів кістки показала його біосумісність та здатність до перебудови з формуваннями кісткової тканини.

Ключові слова: вуглецевий біоматеріал, культура фібробластів, внутрішні органи тварин, підшкірна жирова клітковина, регенерація кістки, киста кістки, пацієнти.

АННОТАЦИЯ

Лу Чжоу. Возможности использование материалов на основе углерода для заполнения костных полостей (экспериментальное исследование с клинической апробацией) – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.21 – травматология и ортопедия. – Государственное учреждение «Институт патологии позвоночника и суставов имени профессора М.И. Ситенко Национальной академии медицинских наук Украины», Харьков, 2017.

Диссертационная работа направлена на определение эффективности для ортопедии и травматологии нового углеродного биоматериала «Карбопон-22» для заполнения костных полостей на основе исследования его влияния на организм и регенерацию кости.

Проведены экспериментальные исследования на 156 белых лабораторных крысах. На основе изучения войлокоподобного углеродного биоматериала в культуре фибробластов, оценки состояния внутренних органов и метаболических показателей организма крыс сделан вывод об отсутствии его цитотоксического действия на клетки, не зафиксирована его миграция во внутренние органы и не выявлено негативного влияния на метаболические показатели организма.

Изучение биохимических показателей сыворотки крови, характеризующих состояние белкового, углеводно-белкового и азотистого обменов, отражающих течение острого воспалительного процесса и регенераторный потенциал костной ткани крыс, у которых экспериментально образованный дефект кости был заполнен плотным и войлокоподобным углеродным биоматериалом двух видов, было показано отсутствие у животных признаков общетоксического, гепатотоксического и нефротоксического действия.

Результаты исследования капсул, образовавшихся вокруг углеродных биоматериалов, имплантированных в подкожную жировую клетчатку, показали, что капсулы были тонкими и содержали клетки, характерные для соединительной ткани. На основе полученных результатов сделано заключение, что биоматериал не вызывает воспалительно-аллергическую реакцию, не токсичен и биосовместим.

Установлено, что плотный и войлокоподобный углеродный биоматериал, имплантированный в дефекты «критического» размера, не вызывает воспалительной реакции в параоссальных тканях и не нарушает репаративный остеогенез.

В костных дефектах после замещения их углеродным биоматериалом войлокоподобной структуры зафиксировано увеличение на 14-е сутки в 3,4 раза площади костной ткани и в 1,7 раза на 45-е сутки наблюдения по сравнению с контрольными животными, у которых дефект не заполняли. Количество

остеоцитов в материнских костных трабекулах было повышено в 1,4 раза на 14-е сутки по сравнению с контролем. Перестройка войлокоподобного биоматериала в костном дефекте на ранние сроки наблюдения связана с формированием адгезивной матрицы, способствующей хемотаксису и прикреплению клеток к фрагментам биоматериала в области дефекта, что обеспечивает образование грануляционной и фиброретикулярной ткани остеогенного типа. На более поздние сроки исследования зафиксировано формирование костной ткани между волокнами углеродного биоматериала, что привело к образованию плотного блока «биоматериал-кость». При использовании плотной формы углеродного биоматериала «Карбопон-22» по его периметру активно протекал репаративный остеогенез, который связан с замещением новообразованной костной тканью очагов разрушения материнской кости, образовавшихся при воспроизведении полости для последующего введения имплантата.

Оценены прочностные качества бедренной кости с имплантированными биоматериалами плотной и войлокоподобной структуры «Карбопон-22».

Положительные результаты экспериментального исследования по применению углеродных материалов для замещения дефектов костей позволили провести клиническую апробацию войлокоподобного углеродного материала «Карбопон-22». В результате использования этого биоматериала для заполнения полости у пациентов после удаления кисты пяточной кости выявлены его хорошие прочностные свойства и доказана оптимизация репаративного остеогенеза с формированием костной ткани, что свидетельствует о возможности применения исследуемого биоматериала для пластики дефектов костей. Клиническая апробация углеродного биоматериала для замещения дефектов кости показала его биосовместимость и способность к перестройке с формированием костной ткани

Ключевые слова: углеродный биоматериал, культура фибробластов, внутренние органы животных, подкожная жировая клетчатка, регенерация кости, киста кости, пациенты.

SUMMARY

Lu Zhou. Possibilities of carbon based materials for filling bone cavities (experimental research with clinical approbation). – The manuscript.

Thesis for the scientific degree of the candidate of medical sciences in specialty 14.01.21 – Traumatology and Orthopaedics. – SI «Sytenko Institute of Spine and Joints Pathology National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv, 2017.

The dissertation research is aimed at determining the effectiveness of orthopedics and traumatology new carbon biomaterial «Karbopon-22» for filling bone cavities based study of its effects on the body and the regeneration of bone.

Based on research felted carbon biomaterial in culture of fibroblasts, the study of internal organs and metabolic indices of body of white laboratory rats was concluded about its lack of cytotoxic effects on cells. The particles of biomaterials don't migration in internal organs and were not found negative effects on metabolic parameters of body.

The study of biochemical parameters of blood serum showed that the animals hadn't signs total toxicity, hepatotoxic and nephrotoxic actions. Found that dense and felted carbon biomaterials implanted in defect «critical» size wasn't caused an inflammatory reaction in the tissue and not impaired reparative osteogenesis. In the early stages of observation (14 days) in the bone defect filled felted carbon biomaterials was formed spongy bone, and was fixed forming dense block «biomaterial-bone» at a later date (45 days). In the case using of a dense form of carbon biomaterial «Karbopon-22» was found on its perimeter actively formed bone tissue, which is associated with the replacement of destroyed areas of maternal bone after implantation of biomaterial. Clinical testing of carbon biomaterial for bone defect replacement showed biocompatibility and ability to the restructuring with replacement and by formation of bone tissue

Key words: carbon biomaterials, fibroblast culture, internal organs of animals, subcutaneous fat, bone regeneration, cyst of bone, patients.