

БИОДЕГРАДИРУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ

© Виктория Андреевна Набока¹, Алексей Александрович Климентьев¹,
Рафаиль Фаилевич Габидуллин²

¹ Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет).
190013, Санкт-Петербург, Московский пр., 26

² Федеральный научный центр реабилитации инвалидов им Г.А. Альбрехта Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации. 195067, Санкт-Петербург, ул. Бестужевская, 50

Контактная информация: Рафаиль Фаилевич Габидуллин — врач-ординатор. E-mail: rafail.gabidullin@gmail.com

Резюме. Биodeградируемый материал для замещения костной ткани был получен из трех основных компонентов: фиброина шелка *Bombyx mori*, фосфатов кальция и казеина. Регенеративные свойства матриц оценили в экспериментах на крысах при имплантации в дефекты костной ткани. По данным рентгеновской томографии использование биodeградируемого материала обеспечивало восстановление целостности кости в более быстрые сроки. Анализ полученных гистограмм из зоны дефектов также показал более выраженные процессы регенерации при заполнении костных дефектов биосовместимым материалом по сравнению с группой контроля.

Ключевые слова: фиброин шелка, гидроксипатит, биodeградируемый материал, регенерация костной ткани.

BIODEGRADABLE MATERIAL FOR SUBSTITUTION OF BONE TISSUE

© Victoria A. Naboka¹, Aleksey A. Klimentyev¹, Rafail F. Gabidullin²

¹ Saint-Petersburg State Institute of Technology. 190013, St. Petersburg, Moskovsky pr., 26

² Federal Scientific Center of Rehabilitation of the Disabled named after G.A. Albrecht of the Ministry of Labour and Social Protection of the Russian Federation. 195067, St. Petersburg, ul. Bestuzhevskaya, 50

Contact information: Rafail F. Gabidullin — resident physician. E-mail: rafail.gabidullin@gmail.com

Abstract. The biodegradable bone replacement material was derived from three main components: silk fibroin *Bombyx mori*, calcium phosphates, and casein. Regenerative properties of the matrices were evaluated in experiments on rats during implantation into bone defects. According to x-ray tomography, the use of biodegradable material provided the restoration of the integrity of the bone in a faster time. Analysis of the histograms obtained from the defect area also showed more pronounced regeneration processes when filling bone defects with biocompatible material compared to the control group.

Key words: silk fibroin, hydroxyapatite, biodegradable material, bone tissue regeneration.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из задач современной регенеративной медицины является разработка материалов для изготовления искусственных органов, тканей и биоинженерных конструкций. Наиболее перспективные материалы для изготовления носителей в тканевой инженерии полимеры биологического происхождения. Такие материалы должны формировать пористый каркас и

быть нетоксичными для культивируемых клеток; должны характеризоваться достаточной механической прочностью и эластичностью, необходимыми для хирургических манипуляций; обладать биосовместимостью с организмом; быть биodeградируемым, что избавляет от дополнительных вмешательств извне для изъятия конструкции на конечном этапе регенерации; материал должен сохранять свои медико-химические свойства при стерилиза-

ции стандартными методами [1]. С каждым годом в мире возрастает количество операций по устранению дефектов костной ткани с применением искусственных биоматериалов. В России доля костнопластических операций такого рода составляет менее 10% из-за недостатка новейших технологий производства биоматериалов. Поэтому разработка новых костнозамещающих материалов, технологии их изготовления и применения в медицинской практике является актуальной задачей [2].

Исследуемый нами материал для замещения костной ткани был изготовлен из трех основных компонентов. В качестве носителя использовался фиброин шелка, получаемый из коконов *Bombyx mori*. Фиброин — основной белок шелка, представляющий собой гетеродимер, состоящий из легкой цепи Fib-L с массой 26 кДа (262 аминокислоты) и тяжелой Fib-H цепи с массой 350 кДа (5263 аминокислоты), ковалентно связанных между собой дисульфидными мостиками, и гликозилированного белка P25 с массой 30 кДа, объединенного с Fib-L и Fib-H гидрофобными связями [3, 4]. Первичную последовательность фиброина составляют глицин (43%), аланин (30%), серин (12%), а также в меньшем количестве тирозин (5%), валин (2%), аспартат, глутамат и цистеин, который выполняет главную интегрирующую роль в объединении субъединиц в одну молекулу [3, 5]. Фиброин формирует α -спирали и β -складки и, следовательно, он может существовать в нескольких структурных формах: 1) рыхлой, глобулярной; 2) обогащенной α -спиралями аморфной форме (silk I); 3) прочной кристаллической β -форме (silk II). Именно насыщенная β -структурами форма белка задает и поддерживает форму создаваемой на его основе биоконструкции, обеспечивает его целостность и стабильность в организме на протяжении долгого периода [6].

Гидроксиапатит (ГА) вызывает повышенное внимание исследователей в связи с его сходством по физико-химическим свойствам с минеральной составляющей костной ткани человека и высокой биологической активностью. Предполагается, что быстрое срастание с костью происходит за счет частичного растворения кальцийфосфата, приводящего к повышению концентрации кальция и фосфора в окружающей среде, что способствует запуску образования вокруг материала новых микрокристаллов гидроксиапатита [7].

Цель исследования — оценить возможность применения для регенерации костной ткани нового биodeградируемого материала на основе гидроксиапатита.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биodeградируемый материал для замещения костной ткани был получен на основе β -формы фиброина и биологического гидроксиапатита, с добавлением фосфата магния, гидрофосфата кальция и гидроокиси кальция, при соотношении компонентов, % мас.: гидроксиапатит — 52–54, фосфат магния — 32–34, гидрофосфат кальция — 10–12, гидроокись кальция — 2–5, а также, в качестве связующего компонента — казеина в аммиачном растворе. В итоге соотношение сухой массы биodeградируемого материала к аммиачному раствору казеина составило 1:1÷1,5.

Сбалансированный в ходе эксперимента состав обеспечивает при малом времени отверждения образование материала, который имеет возможность за счет пластичности удобно заполнить весь дефект в костной ткани, без зазоров между материалом и костью, что имеет важное значение для процессов регенерации. За счет фиброина материал обладает высокими механическими характеристиками, создает прочное соединение отломков кости, гидроксиапатит является аналогом неорганической составляющей натуральной кости, и обладает биосовместимостью, противомываемыми свойствами, биоактивностью, osteoconductive и osteoinductive свойствами, благодаря чему он постепенно замещается натуральной костной тканью, эффективно восстанавливая имеющиеся дефекты, при сокращении общей длительности хирургического вмешательства. Опытным путем было установлено, что химический состав, органические и неорганические включения, соотношение аморфной и кристаллической фаз, структура пор, геометрия и состав частиц имеют ключевое значение для эффективности этих процессов. Размер пор в материале варьировался и составлял величину порядка 100 мкм (рис. 1).

Благодаря интенсивно развитой объемной сетчатой структуре соединительных пор, площадь внутренней поверхности материала составляет более 90 м²/г и внутреннее пространство близко соответствует кости человека. Это обеспечивает большую площадь контакта материала имплантата с костью. При недостаточном количестве казеина материал становится слишком хрупким, не обладает необходимой пластичностью, при избытке — становится слишком жидким и при применении не удерживается в зоне дефекта.

Работа с животными была выполнена в соответствии с протоколами, утвержденными Комитетом по Уходу и Использованию Животных

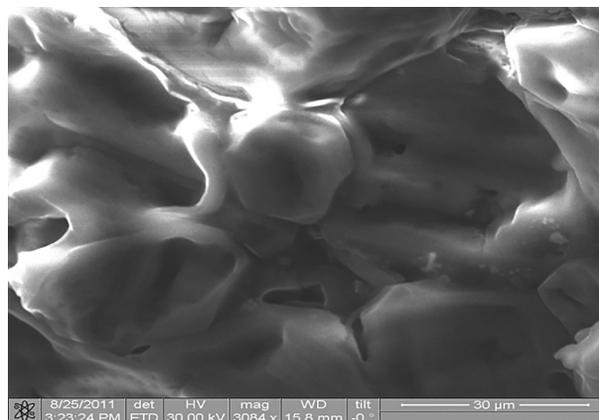
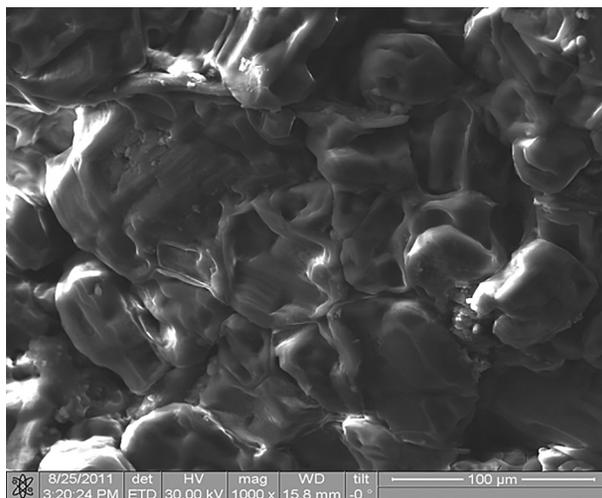


Рис. 1. По результатам электронной микроскопии, поверхность материала формируется из изолированных пор, имеющих сферическую форму различного диаметра с размерами порядка от 1 до 20 мкм. Поры имеют замкнутый характер и развитую пространственную структуру

и руководством Министерства Здравоохранения и Социального Развития Российской Федерации, приказ № 755 от 12.08.1977, а также согласно декларации Всемирной Медицинской Организации Хельсинки (2000 г.). В ходе проведения эксперимента было прооперировано 40 крыс породы “Wistar”, все животные были разделены на группы исследования, что представлено в таблице 1.

Таблица 1

Группы исследования крыс в зависимости от сроков наблюдения и различных типов биополимеров.

Сроки наблюдения Группы наблюдения	1 неделя	2 недели	4 недели	8 недель
	Исследуемый материал	5 крыс	5 крыс	5 крыс
контроль	5 крыс	5 крыс	5 крыс	5 крыс

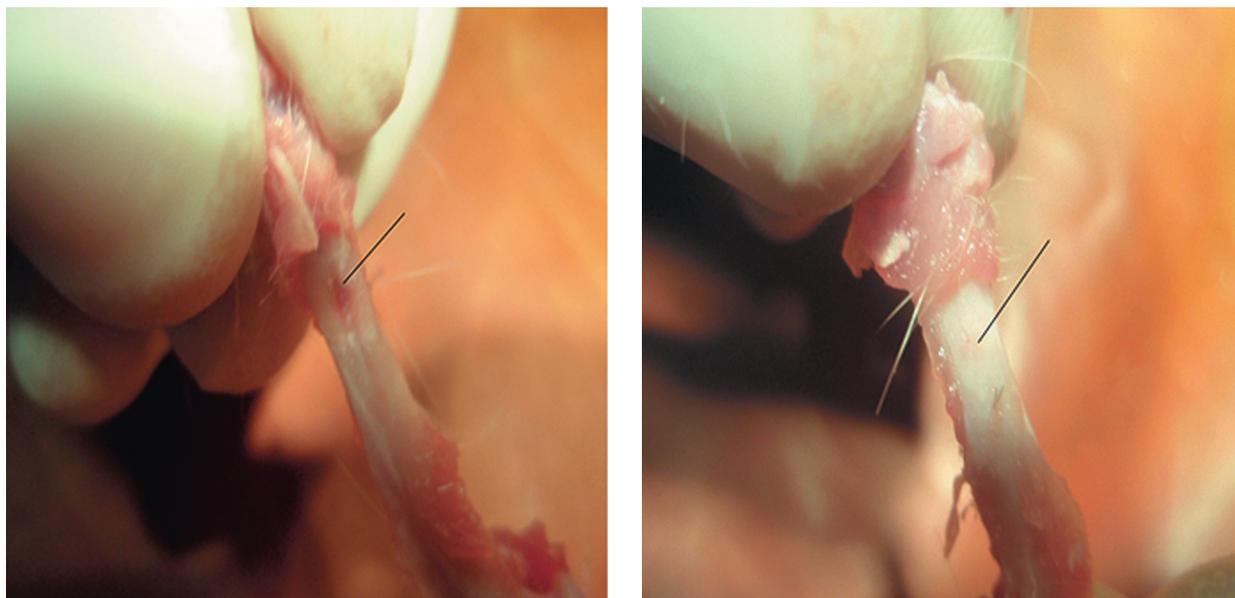
Дефект кости выполнялся следующим образом: в проекции диафиза бедренной кости в передне-заднем направлении выполнялось сквозное отверстие диаметром 2 мм. Дефект заполнялся исследуемым материалом, в контрольной группе дефект оставался незаполненным. Во все сроки наблюдения у животных осуществлялся забор крови из хвостовой вены и по 5 животных из каждой группы выводились ингаляционной передозировкой эфира. Путем экзартикуляции по суставам производилось извлечение бедренных костей с окружающими мягкими тканями, затем мягкие ткани удалялись (рис. 2) и кость помещалась в раствор формалина (10%).

Результаты применения материала оценивали с помощью рентгенографии области интереса в сроки 1, 2, 4, 8 недель после операции, а также по результатам гистограмм. Рентгеновская томография костей проводилась на 64-срезовом мультиспиральном компьютерном томографе (модель Light Speed VCT) компании General Electric (GE)). Для оценки процессов регенерации были выбраны наиболее оптимальные параметры сканирования: 120 кВ, 80 мА, толщина реконструкции 0,6 мм. Все полученные изображения обрабатывались на рабочей станции экспертного класса с многопрофильным просмотром изображений AW VolumShare 4 по 3D («three-dimensional») и VR («virtual reality») протоколам. На полученных изображениях в интерактивном режиме выделяли область, в которой автоматически высчитывалась площадь и плотность области интереса в единицах Хаунсфилда. Индекс костной мозоли (ИКМ) по шкале Хаунсфилда вычисляли по формуле:

$$\text{ИКМ} = \frac{\text{ИР}(\text{НУ})}{\text{КС}(\text{НУ})} \times 100,$$

где ИР — плотность интермедиарной зоны регенерированной ткани в единицах Хаунсфилда, НУ; КС — плотность интактного кортикального слоя прилежащего отдела кости в единицах Хаунсфилда, НУ.

Все измерения были проведены в единицах Хаунсфилда, так как они оценивают степень абсорбции рентгеновского излучения анатомическими структурами организма по отношению к воде, при этом степень абсорбции рентгеновского излучения водой в шкале Хаунс-



а

б

Рис. 2. Кости контрольной группы (а) и группы с применением исследуемого материала (б), 8 нед.

филда принимается равной 0, и тогда воздух и жир имеют отрицательные значения, костная ткань — положительные значения.

В процессе измерений оценивали форму и соотношение костного дефекта и материала для замещения костной ткани, структуру кости, выявляли наличие дистрофических изменений костного и мягкотканого компонентов, характер изменений в окружающих тканях. Качественная оценка остеорегенерации проводилась по следующим критериям:

- снижение четкости границы костного дефекта,
- повышение оптической плотности костной мозоли за счет формирования островков минерализации.

Формула крови была подсчитана на световом микроскопе фирмы “Nicon”, после окрашивания мазков крови по стандартной методике гематоксилин-эозином.

Оценка полученных результатов проводилась с помощью методов вариационной статистики с использованием пакетов стандартных статистических программ Microsoft Excel XP, а также с помощью программы Statistica for Windows Version 6,0 (StatSoft Inc., США). Определялось среднее значение (\bar{X}), стандартное (среднеквадратичное) отклонение (SD), значение вероятности (p). Для анализа имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (критерий Колмогорова-Смирнова). Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся

критерию нормального распределения, применяли непараметрический критерий Манна-Уитни (U-тест). Различия двух сравниваемых величин считали статистически значимым, если вероятность их тождества составляла менее 5% ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В послеоперационном периоде экспериментальных крыс с цементами различных типов, в течение первых двух суток отмечалась выраженная гиподинамическая реакция, крысы были крайне малоактивны, лежали, при попытке перемещения пользовались только передними конечностями, отмечался выраженный отек прооперированной зоны. Затем, в период до пяти суток, указанные явления уменьшались, отмечалось сохранение выраженного отека мягких тканей бедра, прооперированная конечность животным «береглась». В дальнейшем послеоперационном периоде наступало полное восстановление и каких-либо других осложнений и особенностей заживления у данной группы крыс не отмечалось.

При анализе динамики показателей лейкоцитарной формулы периферической крови у крыс были выявлены изменения, приведенные в таблице 2.

Увеличение уровня лейкоцитов, при увеличении содержания сегментоядерных нейтрофилов и моноцитов говорит о возникновении воспалительного процесса, который постепен-

Таблица 2

Среднестатистические значения гематологических показателей крови у крыс до и после операции через 1, 2, 4, 8 недель, $X \pm SD$

Показатели	Сроки	До операции	фиброин				контроль			
			1 неделя	2 недели	4 недели	8 недель	1 неделя	2 недели	4 недели	8 недель
Лейкоциты $10^9/\text{л}$		$4,6 \pm 0,2$	$6,8 \pm 0,7$	$5,3 \pm 0,7$	$4,8 \pm 0,6$	$4,3 \pm 0,7$	$6,7 \pm 1,0$	$5,9 \pm 0,8$	$4,7 \pm 0,5$	$4,5 \pm 0,4$
Лимфоциты $10^9/\text{л}$		$6,38 \pm 0,3$	$3,21 \pm 0,7$	$3,68 \pm 0,9$	$5,15 \pm 0,6$	$6,25 \pm 0,7$	$3,76 \pm 0,5$	$4,1 \pm 0,7$	$5,29 \pm 0,5$	$6,47 \pm 0,4$
с/я нейтрофилы $10^9/\text{л}$		$2,7 \pm 0,4$	$5,57 \pm 0,3$	$4,1 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,1$	$5,3 \pm 0,21$	$4,61 \pm 0,19$	$3,96 \pm 0,12$	$2,7 \pm 0,3$
Эозинофилы $10^9/\text{л}$		$0,21 \pm 0,01$	$3,0 \pm 0,07$	$2,48 \pm 0,02$	$1,1 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,03$	$3,2 \pm 0,05$	$1,74 \pm 0,12$	$1,0 \pm 0,01$	$0,24 \pm 0,06$
Моноциты $10^9/\text{л}$		$0,17 \pm 0,02$	$4,13 \pm 0,02$	$1,06 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,02$	0	$3,15 \pm 0,01$	$1,1 \pm 0,02$	0	0

Таблица 2

Данные рентгеновского исследования образцов бедренной кости с имплантированным материалом в разные сроки наблюдения, $X \pm SD$.

Материал	Сроки наблюдения	Плотность интермедиарной зоны регенерированной ткани в единицах Хаунсфилда	Плотность интактного кортикального слоя в единицах Хаунсфилда	Индекс регенерации
Исследуемый материал	1 неделя	$254,2 \pm 0,6$	$895,3 \pm 15,6$	$28,4 \pm 0,3$
	2 недели	$282,6 \pm 10,2$	$871,5 \pm 16,1$	$32,4 \pm 0,6$
	4 недели	$408,9 \pm 0,9$	$946,3 \pm 19,1$	$43,2 \pm 0,5$
	8 недель	$752,7 \pm 9,8$	$1359 \pm 18,2$	$55,4 \pm 0,7$
контроль	1 неделя	$395,2 \pm 10,2$	$1348 \pm 8,9$	$29,3 \pm 0,8$
	2 недели	$239,5 \pm 10,3$	$753,0 \pm 0,89$	$31,8 \pm 0,7$
	4 недели	$357,8 \pm 0,95$	$996,9 \pm 5,6$	$35,9 \pm 0,6$
	8 недель	$442,5 \pm 11,5$	$993,5 \pm 9,9$	$44,5 \pm 0,6$

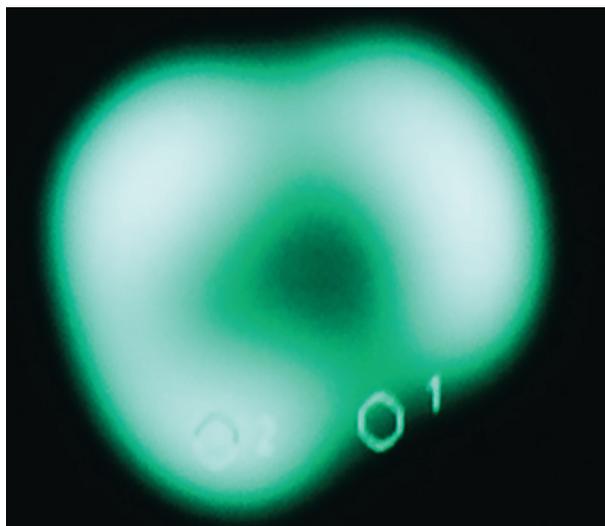
но уменьшается в течение 2 недель. Через 2 недели после введения материала содержание нейтрофилов не отличалось от физиологической нормы. Изменения в лейкоцитарной формуле, отражающие развитие аллергической реакции в течение раннего послеоперационного периода, более выражены в группе с материалом в зоне дефекта, по сравнению с группой контроля, но и эта реакция полностью исчезла через 2 недели после операции.

Данные рентгеновского исследования показали активные процессы репаративной регенерации костной ткани в случае применения материала для заполнения дефекта в сравнении с группой контроля. При денситометрическом анализе мультипланарных томограмм получены абсолютные значения плотности в области дефекта. Результаты исследования представлены в таблице 2 и на рис. 3, 4.

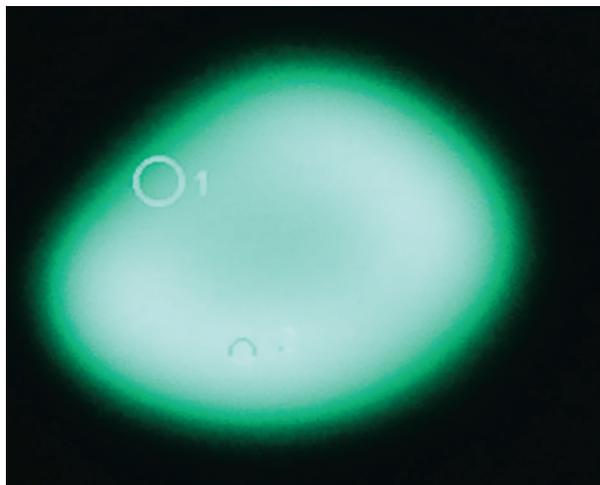
Об образовании костной мозоли можно судить по увеличению плотности искусственно



Рис. 3. Реконструкция кости с получением показателей плотности в области кортикального слоя и в области его дефекта по шкале Хаунсфилда



а



б

Рис. 4. Аксиальные срезы костей из группы контроля (а) и эксперимента (б) выполнялись при напряжении 110 кВ, сила тока 50 мА, толщина скана 3 мм, шаг томографии от 1 мм до 2 мм, алгоритм — extremity)

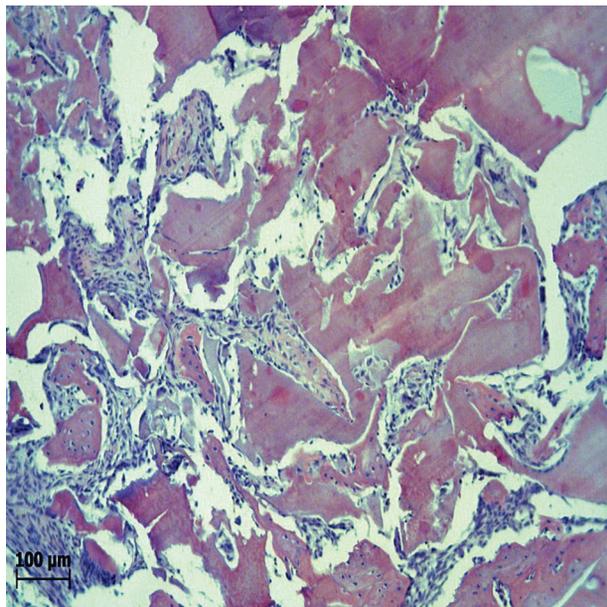


Рис. 5. Гистогрamma место дефекта с заполнением материалом, 8 нед.

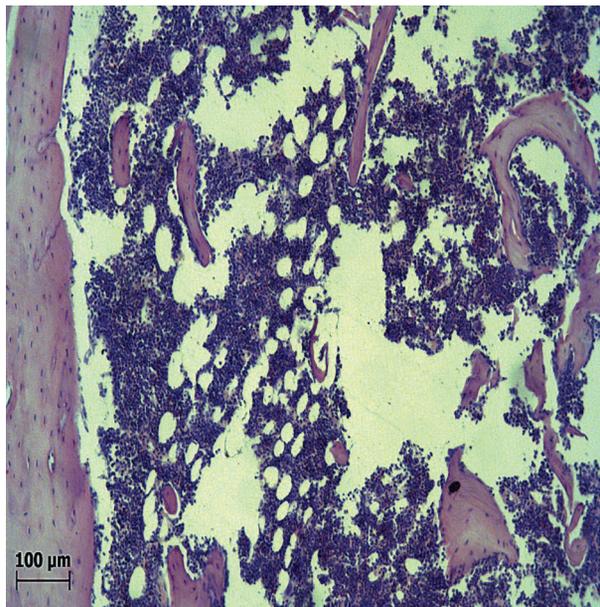


Рис. 6. Гистогрamma место дефекта контроль, 8 нед.

сформированного отверстия в кости, что связано с процессом кальцификации и регенерацией костной ткани. Данные процессы более выражены у животных опытной группы. Начиная со второй недели, более высокий индекс регенерации костной ткани у крыс наблюдался при заполнении дефекта исследуемым материалом по сравнению с группой контроля.

Также процессы активной регенерации подтверждаются с помощью гистогрaмм. В опытной группе материал определяется в зоне дефекта в виде однородных розовых масс. Вокруг него имеется слабая клеточная реакция,

представленная преимущественно фибробластами, играющими важную роль в заживлении ран, основной функцией которых является синтез компонентов межклеточного вещества: белков (коллагена и эластина). Вокруг материала также можно отметить выраженный остеогенез с формированием малоклеточной костной ткани. Местами остеогенез был представлен широкими балками (рис. 5.) В группе контроля отмечался кортикальный слой кости обычного строения на большем протяжении. Отчетливо очагов остеогенеза не определялось (рис. 6).

Таким образом, при оценке аналогичных параметров после применения биодеградируемого материала с целью замещения дефекта в костной ткани на тех же сроках после проведения оперативного вмешательства были выявлены признаки формирования новой костной ткани в зоне дефекта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биодеградируемый материал для замещения костной ткани, имеющий в своем составе три основных компонента: фиброин шелка, гидроксиапатит и казеин, является перспективным материалом для изготовления пластичных, пористых биоинженерных конструкций, способствующих восстановлению костной ткани. Использование подобных материалов для замещения костной ткани приводит к более быстрому восстановлению ткани в зоне дефекта.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают благодарность Т.В. Дружининой за организацию, помощь в проведении экспериментов и рекомендации по оформлению статьи.

Данная работа выполнена в рамках НИР на базе ООО «Биохит».

ЛИТЕРАТУРА

1. Агапова О.И., Дружинина Т.В., Трофимов К.В., Севастьянов В.И., Агапов И.И. Биодеградируемые пористые матрицы для регенерации костной ткани. Перспективные материалы. 2015; 8: 17–26.
2. Дружинина Т.В., Бочкарев В.В., Виденин В.Н., Климентьев А.А., Попов В.П. Замещение костной ткани у животных с использованием биодеградируемого материала на основе гидроксиапатита. Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. 2015; 1(52): 32–38.
3. Агапова О.И., Агапов И.И. Биодеградируемые изделия на основе фиброина шелка для тканевой инженерии и регенеративной медицины. М.: Техносфера; 2018.
4. Wadbua P., Promdonkoy B., Maensiri S., Siri S. Different properties of electrospun fibrous scaffolds of separated heavy-chain and light-chain fibroins of *Bombyx mori*. International journal of biological macromolecules. 2010; 46: 493–501.

5. Tanaka K., Inoue S., Mizuno S. Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H-L complex of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 1999; 29: 269–76.
6. Ho W. Single-molecule chemistry. The Journal of Chemical Physics. 2002; 117: 11033.
7. Vepari C., Kaplan D.L. Silk as a Biomaterial. Progress in polymer science. 2007; 32: 991–1007.
8. Карлов А.В., Шахов В.П. Системы внешней фиксации и регуляторные механизмы оптимальной биомеханики. Томск: STT; 2001.

REFERENCES

1. Agapova O.I., Druzhinina T.V., Trofimov K.V., Sevastyjanov V.I., Agapov I.I. Biodegradiruemye poristye matriksy dlja regeneracii kostnoj tkani. Perspektivnyye material. [Biodegradable porous matrices for bone tissue regeneration]. 2015; 8: 17–26. (in Russian).
2. Druzhinina T.V., Bochkarev V.V., Videnin V.N., Klimentyev A.A., Popov V.P. Zameshhenie kostnoj tkani u zhivotnyh s ispol'zovaniem biodegradiruemogo materiala na osnove gidroksiapatita. [Substitution of bone tissue in animals using biodegradable material based on hydroxyapatite]. Voprosy rekonstruktivnoj i plasticheskoj hirurgii. 2015; 1(52): 32–38. (in Russian).
3. Agapova O.I., Agapov I.I. Biodegradiruemye izdelija na osnove fibroina shelka dlja tkanevoj inzhenerii i regenerativnoj mediciny. [Biodegradable silk fibroin-based products for tissue engineering and regenerative medicine]. M.: Tekhnosfera; 2018. (in Russian).
4. Wadbua P., Promdonkoy B., Maensiri S., Siri S. Different properties of electrospun fibrous scaffolds of separated heavy-chain and light-chain fibroins of *Bombyx mori*. International journal of biological macromolecules. 2010; 46: 493–501.
5. Tanaka K., Inoue S., Mizuno S. Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H-L complex of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 1999; 29: 269–76.
6. Ho W. Single-molecule chemistry. The Journal of Chemical Physics. 2002; 117: 11033.
7. Vepari C., Kaplan DL. Silk as a Biomaterial. Progress in polymer science. 2007; 32: 991–1007.
8. Karlov A.V., Shahov V.P. Sistemy vneshnej fiksacii i reguljatornye mehanizmy optimal'noj biomehaniki. [External fixation systems and regulatory mechanisms of optimal biomechanics]. Tomsk: STT; 2001. (in Russian).