

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

АШУКІНА Наталія Олександрівна

УДК 616.71-007.24-089.844:666.5

**РЕГЕНЕРАЦІЯ КІСТКОВО-ХРЯЦОВОЇ
РАНИ ПРИ ВИКОРИСТАННІ
КАЛЬЦІЙ-ФОСФАТНИХ КЕРАМІК**

03.00.11 – цитологія, гістологія,

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2002

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті патології хребта та суглобів імені професора М.І. Ситенка АМН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
ДЕДУХ Нінель Василівна,
Інститут патології хребта та суглобів
імені професора М.І.Ситенка АМН України,
керівник лабораторії морфології сполучної тканини

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук
РОДІОНОВА Наталія Василівна,
Інститут зоології ім. Шмальгаузена НАН України,
завідувач відділу цитології та гістогенезу

доктор біологічних наук
ЗАГОРУЙКО Геннадій Євгенович,
Українська медична стоматологічна академія,
завідувач кафедри гістології, цитології
та ембріології

Провідна установа: Харківський державний медичний університет,
кафедра медичної біології, МОЗ України, м. Харків.

Захист дисертації відбудеться “ ___ ” _____ 2002 року о ___ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.38 при Київському національному університеті імені Тараса Шевченка (м. Київ, пр. академіка Глушкова, 2, біологічний факультет, ауд. ___).

Поштова адреса: 01033, м. Київ, вул. Володимирська, 64,
біологічний факультет.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Київського національного університету імені Тараса Шевченка (01033, м. Київ, вул. Володимирська, 58)

Автореферат розісланий “ ___ “ _____ 2002 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Давидовська Т.Л.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Обмежена здатність суглобового хряща до регенерації, незалежно від того де знаходяться дефекти – у навантаженій чи у ненавантаженій ділянці суглобової поверхні – описана у багатьох експериментальних та клінічних дослідженнях (Виноградова Т.П., 1964; Павлова В.Н. и соавт., 1988; Buckwalter J.A. et al., 1990; O'Driscoll S.W., 1998).

Ушкодження суглобової поверхні, що виникли внаслідок травми або дистрофічних процесів у хрящі, загоюються грануляційною тканиною, пухкою сполучною тканиною або волокнистим хрящем, які мають низькі міцнісні якості (Клишов А.А., 1984; Дедух Н.В. и др., 1997; Buckwalter J.A. et al., 1994).

З ціллю стимуляції процесів регенерації суглобового хряща для заповнення кістково-хрящових дефектів застосовують культивовані хондроцити та мезенхімальні стовбурові клітини, періостальні та перихондральні трансплантати, демінералізований кістковий матрикс (Башинський Г.П., 1996; O'Driscoll S., Salter R., 1984; Itay S. et al., 1987; Wakitani S. et al., 1994), а також синтетичні матеріали, серед яких волокна вуглецю, тефлон та ін. (Messner K., Gillquist J., 1993). Проте неоднозначність клінічних виходів та складність отримання матеріалів, що трансплантуються, призводять до продовження досліджень у даному напрямку.

Як замітники кісткової тканини у пластичній хірургії різних відділів скелету добре зарекомендували себе біоактивні кераміки, створені на основі гідроксилapatиту та трикальційфосфату (Корж А.А. и соавт., Дубок В.А., Ульянович Н.В., 1998; Heis U. et al., 1990; Le Geros R.Z., 1993). Використання цих матеріалів обумовлено такими їх позитивними властивостями як імуноsumісність та біоактивність - висока спорідненість з кістковою тканиною, здатність до біодеградації у біологічному середовищі та до оптимізації процесів остеогенезу (Безруков В.М., Григорьян А.С., 1996; Грунтовский Г.Х., Мальшкіна С.В., 1997; Johnson K.D. et al., 1996; Zyman Z., 1998). Залежно від поставлених задач для пластики кісткових дефектів застосовують гідроксилapatит у вигляді блоків, гранул різних розмірів, порошку. Щільні керамічні зразки використовуються у випадках максимального навантаження на кістку безпосередньо після операції, пористі – сприяють більш вираженому процесу остеорепарації, але мають низькі міцнісні якості. Вже накопичено значний об'єм знань щодо реакції кісткової тканини при керамопластиці (Мальшкіна С.В., 2000; Duguay N. et al., 2000). Проте поза увагою дослідників залишився той факт, що неоднозначні морфологічні зміни у кістковій тка-

нині в умовах імплантації матеріалів з гідроксилапатиту, можуть обумовлюватися їх різними фізико-хімічними характеристиками. Зокрема, на сьогодні немає конкретних даних про перебудову кісткової тканини при використанні гранул гідроксилапатиту з різними розмірами.

Поряд з чистим гідроксилапатитом, набули відомості композити на його основі. Поєднання якостей кераміки з властивостями додаткових речовин (трикальційфосфату, біорозчинних полімерів, біологічно активних речовин) дозволяє моделювати міцнісні та біорозчинні характеристики імплантатів, прискорювати кісткоутворення, пригнічувати процеси запалення та росту пухлинних клітин та ін. (Корж А.А. и соавт., 1995; Maruyama M., 1995; Furukawa T. et al., 2000).

Згідно з експериментальними даними, гідроксилапатитна кераміка відповідає вимогам до матеріалів, які застосовуються при пластиці підхрящових дефектів (Корж А.А. и соавт., 1995; Meenen N.M. et al., 1992). Проте, практично відсутні дані щодо застосування кальцій-фосфатних керамік для лікування внутрішньосуглобових кістково-хрящових ран.

Отже, проведення досліджень, що спрямовані на вивчення структурних перетворень у кістковій та хрящовій тканинах при пластиці кістково-хрящових дефектів кальцій-фосфатними кераміками та створеними на їх основі композитами, до складу яких вводяться стимулюючі хондро- та остеогенез біологічно активні речовини, може розкрити принципово новий підхід до розв'язання проблеми регенерації кістково-хрящових дефектів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана згідно з планом науково-дослідних робіт Інституту патології хребта та суглобів імені професора М.І.Ситенка АМН України і є складовою частиною науково-дослідних тем: "Вивчити аспекти використання біоактивних керамік (тверді зразки, порошкоподібні суміші, пасти) для пластики дефектів кісток та суглобів" (шифр ОК 95.2, держ. реєстрація № 0196U017260) і "Пластика кістково-хрящових дефектів гідроксилапатитною керамікою різного фазового стану та структурних характеристик (експериментально-клінічне дослідження)" (шифр ОК.99.2, держ. реєстрація № 0199U003414).

Автором особисто здійснено постановку експериментів на тваринах, вилучення матеріалу, його дослідження, обробку і аналіз отриманих даних згідно з планом дисертаційної роботи, узагальнення результатів, формулювання висновків. Автор брала участь у підготовці звітів по науково-дослідній роботі та доповідала отримані результати на науково-практичних конференціях.

Мета і задачі дослідження: на основі вивчення морфологічних особливостей регенерації внутрішньосуглобової кістково-хрящової рани експериментально обґрунтувати ефективність застосування кальцій-фосфатних керамік для оптимізації репаративного хондро- та остеогенезу.

Для виконання мети були поставлені наступні задачі:

1. Визначити напрямки розвитку науки по проблемі використання керамічних матеріалів та композитів на їх основі для пластики внутрішньосуглобових кістково-хрящових дефектів.

2. Вивчити морфогенез репаративного процесу внутрішньосуглобової кістково-хрящової рани.

3. Провести аналіз морфологічних змін у кістковій тканині та суглобовому хрящі в умовах пластики кістково-хрящових ран гранулами гідроксилапатиту різного розміру.

4. Дослідити перебудову суглобового хряща та кісткової тканини після імплантації у внутрішньосуглобові кістково-хрящові дефекти композиту на основі гранул гідроксилапатиту та хондроїтинсульфату.

5. Провести морфологічний аналіз регенерації внутрішньосуглобових кістково-хрящових ран при застосуванні керамічного композиту на основі гідроксилапатиту та трикальційфосфату у вигляді блоків.

6. Дати ультраструктурну характеристику клітин репаративної бластемати та оточуючих рану тканин, а також оцінити стан макромолекул матриксу (колагенових волокон та глікозаміногліканів) суглобового хряща при використанні кераміки на основі гідроксилапатиту для пластики кістково-хрящових дефектів.

Об'єкт дослідження. Регенерація кістково-хрящових ран, перебудова кісткової тканини та суглобового хряща, що оточують ділянку дефекту.

Предмет дослідження. Стегнова кістка білих лабораторних щурів та кроликів, ненасичені та насичені хондроїтинсульфатом гранули гідроксилапатиту, керамічні блоки (80% гідроксилапатиту та 20% трикальційфосфату).

Методи дослідження: гістологічний аналіз – для оцінки структурних змін у внутрішньосуглобових кістково-хрящових ранах (як незаповнених, так і з пластикою керамічними матеріалами), а також у прилеглих до зони дефекту кістковій та хрящовій тканинах; морфометричний аналіз – для кількісної характеристики тканинного складу регенерату; поляризаційно-оптичний аналіз – для вивчення орієнтаційної упорядкованості та ступеню зрілості основних компонентів хрящового матриксу – колагенових волокон та глікозаміногліканів; електронно мікроскопічне дослідження – для вив-

чення ультраструктурної організації клітин та матриксу репаративної бластими, кісткової й хрящової тканин навколо рани.

Наукова новизна одержаних результатів. У результаті виконаної роботи одержані нові дані щодо морфологічних особливостей перебігу репаративного процесу у кістково-хрящовій рані (діаметром 1,5 мм та глибиною 2 мм) у шурів. Доведено, що у незаповнених дефектах відбувається неповна регенерація й через 180 діб вони загоюються переважно волокнистою сполучною тканиною.

Виявлено, що використання гранул гідроксилапатиту сприяє оптимізації репаративних процесів у внутрішньосуглобових кістково-хрящових ранах. У зоні кісткової рани відбувається формування кісткової тканини (повна регенерація). Встановлено, що терміни регенерації кісткової тканини залежать від розмірів керамічних гранул. Дрібні гранули гідроксилапатиту (80-100 мкм) через 90 діб майже повністю оточені новоутвореною кістковою тканиною, а навколо крупних гранул (400–600 мкм) кісткова тканина пластинчастої структури визначалася через 180 діб. Виявлено, що на етапах утворення репаративної бластими функціонально активні клітини розташовувалися і формували кісткові структури безпосередньо на поверхні керамічного матеріалу, що підтверджує високу біосумісність та остеотропність досліджуваних керамік. У зоні ушкодженого суглобового хряща не відбувається повної регенерації: на поверхні гранул гідроксилапатиту у хрящовій рані формується переважно волокнистий хрящ, який не відповідає вимогам функціонування суглобу, що неодмінно веде до деструктивних змін у суглобовому хрящі навколо рани.

Встановлено, що введений до складу керамічного композиту хондроїтинсульфат стимулює остеорепарацію та сприяє збереженню структури материнського суглобового хряща.

Вперше доведена можливість одержання гіалінового хряща у зоні хрящової рани на поверхні керамічного блоку (80% гідроксилапатиту та 20% трикальційфосфату). Формування хряща починалося від крайових відділів дефекту у напрямку центральної ділянки. Через 90 діб після імплантації вся поверхня керамічного матеріалу була вкрита гіаліновим хрящем з хондроцитами у капсулах, характерним розташуванням колагенових волокон та глікозаміногліканів.

Практичне значення одержаних результатів. Проведений морфологічний аналіз регенерації кісткової та хрящової тканин в умовах пластики

кістково-хрящових дефектів керамічними імплантатами на основі гідроксилапатиту дозволив дати експериментально-теоретичне обґрунтування можливості використання біоактивної кераміки для заповнення згаданих дефектів.

Розроблено новий композит з хондропротекторними властивостями на основі гранул гідроксилапатиту та хондроїтинсульфату, застосування якого для пластики кістково-хрящових дефектів оптимізує репаративний процес (Деклараційний патент України на винахід 39687А).

Експериментально обґрунтована перевага використання для пластики кістково-хрящових дефектів пористих керамічних блоків на основі 80% гідроксилапатиту з додатком 20% трикальційфосфату.

Результати дослідження впроваджено у навчальний процес і науководослідну роботу на кафедрі травматології та ортопедії Харківської медичної академії післядипломної освіти, кафедрі фізіології Національної фармацевтичної академії України, на кафедрах гістології та морфології і діагностики й клінічної біохімії Харківської державної зооветеринарної академії.

Особистий внесок здобувача. Матеріали виконаних експериментальних досліджень, що подані у дисертаційній роботі, є особистим внеском автора у проблему, яка вивчається. Особисто автором сформульована ціль і завдання досліджень, обґрунтована схема експериментальних робіт та адекватне методичне забезпечення. Автор особисто оперувала тварин, виготовила ультратонкі зрізи, провела морфологічний аналіз експериментального матеріалу, математичну обробку числових показників при морфометричних дослідженнях. Автором проведено узагальнення одержаних даних, обґрунтування наукових висновків та розробка положень для практичного впровадження результатів.

Автор приймала безпосередню участь у впровадженні результатів дослідження у практику.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації були подані на II Європейському конгресі ортопедів (Будапешт, 1998), конференції молодих вчених "Новое в решении актуальных проблем ортопедии и травматологии", де робота була відзначена почесною грамотою "За наукову роботу" (Москва, 2000); X Українській школі "Біологія та патологія опорно-рухового апарату" з міжнародною участю (Харків, 2000), науковій конференції "Морфологические основы гистогенеза и регенерации тканей" (Санкт-Петербург, 2001).

Публікації. Основний зміст дисертаційної роботи відображено у 8 наукових роботах, з них 3 – у провідних наукових фахових виданнях. Одержано Деклараційний патент України на винахід № 39687А.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 118 сторінках друкованого тексту і складається із вступу, аналітичного огляду літератури, 4-х розділів власних досліджень, висновків та списку використаних джерел. Роботу ілюстровано 4 таблицями, 54 рисунками. Список використаних джерел має 53 українсько- та російськомовних посилань та 101 закордонне джерело.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріал і методи дослідження

Для досліджень використовували зразки біоактивної кераміки, виготовленої на основі гідроксилапатиту, науково-виробничим об'єднанням "КЕР-ГАП" інституту проблем матеріалознавства НАН України: гранули гідроксилапатиту – 80–100 мкм (дрібні) та 400–600 мкм (крупні) з пористістю 15–20% та розміром пор 50–100 мкм; пористі (пористість 15–25%, розмір пор 150–250 мкм) імплантати, які містили 80% гідроксилапатиту та 20% трикальційфосфату, у вигляді блоку (діаметром 4,0 мм та висотою 4,0 мм).

На основі пористих гранул гідроксилапатиту та хондроїтинсульфату (препарат COLLYRE Lasguros, лабораторія Alcon S.A., Бельгія) було виготовлено композит. 840 мг гранул гідроксилапатиту заливали розчином хондроїтинсульфату (1 мл) при температурі 37°C у умовах вакууму. Таким чином досягалося проникнення хондроїтинсульфату у пори гідроксилапатиту. У 1 мл розчину міститься 30 мг хондроїтинсульфату.

Вивчення особливостей репаративної регенерації у кістково-хрящових ранах проводили на 140 білих лабораторних щурах лінії Вістар (віком 6 місяців та живою вагою 180±20 г), а також на 15 кроликах 3-х місячного віку (живою вагою 2,5 кг).

Оперативне втручання виконували під загальним тіопенталовим наркозом в умовах асептики. Кістково-хрящову рану моделювали за допомогою зубного бору (діаметром 1,5 мм для щурів та 4 мм для кроликів) на глибину 2 мм та 4 мм (відповідно – щури та кролі) у міжвиростковій ділянці дистального відділу стегнової кістки з відкриттям колінного суглоба шляхом бокового доступу.

Дефект у дослідних серіях заповнювали гранулами гідроксилапатиту,

композитом на їх основі з хондроїтинсульфатом та керамічним блоком (80% гідроксилапатиту та 20% трикальційфосфату) таким чином, щоб імплантований матеріал розташовувався нижче рівня суглобового хряща.

Дослідження репаративної регенерації внутрішньосуглобових кістково-хрящових ран виконано у 5-ти серіях експерименту.

Перша серія (контроль) – кістково-хрящовий дефект у міжвиростковій ділянці дистального відділу стегнової кістки щурів без будь-якої пластики – 35 тварин.

Друга серія – кістково-хрящовий дефект у міжвиростковій ділянці дистального відділу стегнової кістки щурів з пластикою дрібними гранулами гідроксилапатиту (розміром 80–100 мкм) – 35 тварин.

Третя серія – пластика кістково-хрящових ран у міжвиростковій ділянці дистального відділу стегнової кістки крупними гранулами гідроксилапатиту (діаметр 400–600 мкм) – 35 тварин.

Четверта серія – кістково-хрящовий дефект з пластикою композитом сполукою на основі гранул гідроксилапатиту (діаметр 80–100 мкм) з хондроїтинсульфатом – 35 тварин.

П'ята серія – імплантація керамічного блоку (80% гідроксилапатиту та 20% трикальційфосфату) у кістково-хрящові дефекти у міжвиростковій ділянці дистального відділу стегнової кістки (діаметром 4 мм та глибиною 4 мм) – 15 кроликів.

Щурів було виведено з експерименту шляхом передозування ефіру через 7, 14, 30, 90 та 180 діб після операції, а кроликів – шляхом введення повітря у вушну вену на 14, 30 та 90 добу після імплантації.

Експерименти на тваринах проводили відповідно "Правил проведення роботи с использованием экспериментальных животных" (за наказом МОЗ СРСР № 724 від 13.11. 1984 р.) та правил "Європейської конвенції захисту хребетних тварин, що використовуються у експериментальних і інших наукових цілях".

Структурні перетворення у тканинах, що оточують рану, та стан сформованого у дефекті регенерату досліджували за допомогою методів морфологічного аналізу з морфометрією площин дефектів та новоутворених тканин разом з імплантованими гранулами гідроксилапатиту.

Для гістологічного дослідження виділяли дистальний метафіз стегнової кістки та фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну, проводили декальцинацію у 4% розчині азотної кислоти, зневоднювали у спиртах зростаючої міцності та заключали у целюдин (Саркісов Д., 1996). При необхі-

дності, перед виготовленням зрізів, зразки кераміки обережно видаляли препарувальною голкою. Виготовлені зрізи, товщиною 10–15 мкм, забарвлювали гематоксиліном та еозином. Позбавлені целоїдину зрізи фарбували толуїдиновим синім при pH 2,5 (Керн М. и соавт., 1985) для характеристики стану глікозаміногліканів у матриці хряща. Для вивчення орієнтаційної упорядкованості та ступеню зрілості колагенових структур у новоутворених тканинах та материнському суглобовому хрящі поблизу, а також на відстані від зони дефекту виконували спеціальну гістохімічну реакцію на колаген з піросиріусом червоним (Constantine V.S., Movy R.W., 1968). Топооптичні дослідження виконували на поляризаційному мікроскопі "Polmu-A".

Території дефекту, керамічного матеріалу й новоутворених тканин за термінами дослідження визначали за методом Г.Г.Автанділова (1990) з використанням квадратно-сітчастої окулярної вставки, яка має 289 крапок (перетинів сторін малих квадратів). Аналізували центральні зрізи дефекту (7 вимірювань на одну тварину). У полі зору мікроскопа БІОЛАМ (ЛІОМО) при збільшенні $\times 56$ підраховували число крапок, що попадали на структуру об'єкта, який вивчали (кераміка, грануляційна, фіброретикулярна та кісткова тканини). Отримане число (умовні одиниці – у.о.) і визначало умовну площу, яку займав об'єкт.

Для електронномікроскопічного дослідження було відібрано ділянки тканин (розміром 2×2 мм), що розташовані безпосередньо у зоні кістково-хрящового дефекту або біля керамічного матеріалу. Матеріал відбирали та фіксували згідно рекомендацій Б.Уикли (1980): у 4% розчині глутаральдегіду, потім декальцинували у розчині трилону Б, дофіксували в 1% розчині осмієвої кислоти, зневоднювали у спиртах зростаючої міцності й ацетоні та заливали у епон-аралдіт. Напівтонкі (1-2 мкм) та ультратонкі зрізи (30–40 нм) виготовляли на ультрамікротомі УМПП-3М. Напівтонкі зрізи забарвлювали метиленовим синім та основним фуксином, а ультратонкі - контрастували за методом Reynolds (1963). Оцінку матеріалу проводили під електронним мікроскопом ЕМВ-100БР.

Отримані числові дані були оброблені методами варіаційної статистики з використанням прикладного пакету STATISTICA 5.11 for Windows.

Результати дослідження і їх обговорення

Проведене дослідження морфологічних особливостей репаративної регенерації змодельованої кістково-хрящової рани (глибиною 2 мм та діаметром 1,5 мм) у міжвиростковій ділянці дистального відділу стегнової кістки щурів (контроль) показало, що не відбувалося відновлення суглобової по-

верхні та повної регенерації у зоні кісткової рани. Площа утворених у дефекті тканин на всі терміни спостереження була набагато меншою за розміри дефекту, співвідношення їх площин по термінах складало: на 7 добу – 0,34, на 14 – 0,36, на 30 – 0,56, на 90 – 0,54 та на 180 – 0,31. Клітини репаративної бластими (серед яких переважали фібробласти) характеризувалися значною біосинтетичною активністю, про що свідчили їх ультраструктурні показники – наявність значної кількості пор у ядерній мембрані та розвинутої гранулярної ендоплазматичної сітки. Проте дефект заповнювався, в основному, волокнистою сполучною тканиною, структурні характеристики якої не відповідають властивостям опорних тканин. Осередки остеоїду та новоутворені кісткові трабекули виявлялися лише у ділянці дна дефекту й займали невеликі території.

Неповна регенерація тканин у кістково-хрящових дефектах призводила до порушення структурно-функціональних співвідношень у суглобі, що супроводжувалося деструктивними змінами у оточуючій субхондральній кістці, які були пов'язані з появою тріщин, потоншенням кісткових трабекул, наявністю остеоцитів у стані некрозу та некробіозу. Структурні зміни у прилеглому до дефекту суглобовому хрящі проявлялися у деструкції хондроцитів поверхневої та проміжної зон. З часом патологічний процес розповсюджувався на усі зони не тільки прилегло, а й суглобового хряща на віддаленні від дефекту. Спостерігалися хондроцити у стані некрозу та некробіозу, розшарування матриксу. У результаті руйнування суглобового хряща визначалося оголення трабекул підлеглої кістки. Репаративні зміни були пов'язані з утворенням на окремих ділянках суглобової поверхні тяжів щільної сполучної тканини.

Одержані результати узгоджуються з літературними даними про різний характер репаративної регенерації кістково-хрящових ран залежно від розмірів дефекту. Так, дефекти діаметром 2 мм у кроликів (Лаврищева Г.И., Оноприенко Г.А., 1996) загоюються з відновленням структури суглобового хряща, тоді як при діаметрі дефектів 4 мм у кроликів та 9 мм у поні (Convery F.R. et al., 1972) вони заповнювалися волокнистим хрящем. Такі дефекти, як і змодельований нами у експерименті у щурів, являються "критичними", тобто у них не відбувається повної регенерації. Для оптимізації процесів регенерації необхідно виконувати пластику кісткового дефекту.

На наступному етапі дослідження з метою оптимізації процесів регенерації для пластики кістково-хрящових ран було використано біоактивну кераміку на основі синтетичного гідроксилапатиту, який є аналогом мінераль-

ного компоненту кістки. При цьому, на відміну від подібних матеріалів біологічного походження, властивості кальцій-фосфатних керамік не залежать від зміни екологічних факторів довкілля. При застосуванні гідроксилапатиту та трикальційфосфату імунні та запальні реакції з боку організму реципієнта, як правило, обумовлені лише ступенем ушкодження тканин при оперативному втручанні, а не впливом складу самого імплантаційного матеріалу (Дубок В.А., Ульянович Н.В., 1998; Neise et al., 1990). Гідроксилапатит та трикальційфосфат мають високу спорідненість до кісткової тканини: їх інтеграція з кісткою відбувається без утворення прошарку фіброзної тканини (Zyman Z et al., 1998; Dedukh N.V. et al., 1998).

Проведений морфологічний аналіз показав, що використання гранул гідроксилапатиту для пластики кістково-хрящових дефектів сприяло формуванню кісткової тканини у зоні дна дефекту. При електронно-мікроскопічному дослідженні встановлено, що на ранніх стадіях (7 доба) загоєння кісткової рани навколо керамічних гранул поблизу материнської кістки спостерігалися, поряд з клітинами кісткового мозку, лімфоїдні клітини, макрофаги та клітини фібробластичного ряду різного ступеню диференціювання. Цитоплазма більшої частини клітин фібробластичного ряду характеризувалася розвинутою ендоплазматичною сіткою, комплексом Гольджі та численними мітохондріями з помірно електронно-щільним матриксом. Ядра таких клітин були невеликих розмірів, ядерний хроматин утворював скупчення під ядерною мембраною. У міжклітинному матриксі визначалися хаотично розташовані тонкі колагенові фібрили без вираженої поперечної смугастості.

У більшій частині зовнішніх пор гранул гідроксилапатиту була відмічена фіброретикулярна тканина остеогенного характеру (за Лаврищевой Г.И., Оноприенко Г.А., 1996). В ній спостерігалися клітини кісткового диферону: малодиференційовані клітини, пре- та остеобласти, остеоцити. Ультраструктурні характеристики остеогенних клітин - розвинута ендоплазматична сітка, комплекс Гольджі, значна кількість рибосом - свідчать про їх високу біосинтетичну активність. Клітини щільно прилягали до керамічних фрагментів, їх синтетичний апарат, а саме каналці ендоплазматичної сітки, розташовувався у безпосередній близькості до зони контакту клітинної мембрани з частками гідроксилапатиту. У результаті просякання клітинних відростків у пори гідроксилапатиту створювалося додаткове укріплення контакту "кераміка-кістка". З часом кількість пре- та остеобластів навколо кераміки значно збільшувалася, формувалася остеогенна тканина, яка потім перетворювалися на кісткову.

Поряд з процесами кісткоутворення мала місце деградація керамічного матеріалу, яка відбувається за допомогою біологічної рідини, що стає можливим у разі наявності пор, розміри котрих відповідають розмірам молекул розчинника (Щепеткин И.А., 1995). Розширення пор в результаті біодеградації кераміки дозволяє клітинам, які приймають участь у подальшій резорбції, проникати у глибину імплантату. Макрофаги та остеокласти, що проникали між дрібними частками кераміки, сприяли клітинно-опосередкованій біодеградації керамічного матеріалу. Цитоплазма функціонально активних остеокластів мала складчасті вирости щіткової облямівки, які були спрямовані у бік кераміки, і вмщувала численні вакуолі. Наявність у деяких з них електроннощільних глибок обумовлювалася участю клітин в утилізації гідроксилапатиту. За даними С.В.Малишкіної (1996), перетворені клітинними структурами фрагменти керамічного матеріалу використовуються у подальшому як будівельний матеріал для новоутворення кістки.

Встановлено, що розміри керамічних гранул не впливають на спрямованість перебігу репаративного остеогенезу. Навколо гранул гідроксилапатиту в залежності від терміну спостереження виявляються грануляційна, фіброретикулярна тканина остеогенного характеру, сполучна тканина, остеоїд та кісткова тканина пластинчастої структури. Проте формування кісткової тканини по території дефекту відбувалося у різні терміни й залежало від розміру гранул гідроксилапатиту. Відомо, що одержання органотипового кісткового регенерату у найкоротші терміни потребує щільного заповнення кісткового дефекту імплантаційним матеріалом (Грунтовский Г.Х., Малышкина С.В., 1997; Uchida A. et al, 1990). Застосування великих гранул кераміки (400-600 мкм) не забезпечувало їх щільної упаковки у рані: між самими гранулами й між гранулами та кісткою залишаються вільні простори, заповнення яких кістковою тканиною потребує додаткового часу. В результаті у центральних ділянках дефекту з пластикою крупними гранулами до 90 доби спостерігалася сполучна тканина, а до 180 - фіброретикулярна з високою щільністю остеогенних клітин. Структурні та біомеханічні характеристики цих тканин відрізняються від показників субхондральної кістки. При навантаженні суглоба це обумовлює мікрорухомість, а потім й "просідання" гранул у дефекті, що призводить до формування у зоні хрящової рани волокнистого хряща замість очікуваного гіалінового.

Використання гранул гідроксилапатиту менших розмірів (80-100 мкм) забезпечувало більш щільну їх упаковку у рані та формування значно менших проміжків між ними, що обумовлювало інтенсивні темпи кісткоутво-

рення – на 90 добу лише на незначних територіях центральної частини дефекту спостерігалася фіброретикулярна тканина остеогенного характеру (за Лавришевой Г.И., Оноприенко Г.А., 1996), а на 180 добу всі гранули були оточені пластинчастою кісткою.

Досягти повної регенерації суглобового хряща при пластиці внутрішньо-суглобових кістково-хрящових ран гранулами гідроксилапатиту не вдалося. На поверхні дрібних гранул кераміки на 180 добу формувався, в основному, волокнистий хрящ. У хрящових ранах з застосуванням крупних гранул переважала сполучна тканина різного ступеню зрілості.

У зв'язку з вищевикладеним, для подальших експериментів на щурах було застосовано гранули гідроксилапатиту розміром 80–150 мкм, які насичували хондроїтинсульфатом.

Вивчення особливостей впливу гранул гідроксилапатиту, насичених хондроїтинсульфатом (композит), на перебіг репаративного остео- та хондрогенезу дозволило виявити оптимізацію процесів репарації у кістково-хрящових дефектах в умовах їх пластики розробленим композитом. На 30 добу більшість насичених хондроїтинсульфатом гранул гідроксилапатиту була оточена новоутвореною кістковою тканиною, а на їх поверхні, у зоні хрящової рани, утворювався волокнистий хрящ з ділянками гіалінової хрящової тканини. Введений до складу композиту хондроїтинсульфат також сприяв збереженню структури суглобового хряща навколо рани та по всій території виростків. Проте, відмічено незначне просідання композиту у дефекті.

Одержані дані свідчать про неможливість створення рівної нерухомої поверхні у разі використання будь-яких гранул гідроксилапатиту для пластики кістково-хрящових дефектів, що не дає змогу отримати органотиповий регенерат у зоні ушкодженого суглобового хряща. Гранули гідроксилапатиту можуть служити предметом вибору та використовуватися з іншими пластичними матеріалами.

У наступній частині роботи було досліджено стан процесів репаративної регенерації у кістково-хрящових ранах за умов пластики пористими керамічними блоками (80% гідроксилапатиту та 20% трикальційфосфату).

Порівняльний морфологічний аналіз загоєння кістково-хрящових дефектів, які були заповнені керамічними блоками та гранулами кераміки, встановив, що використання керамічного блоку сприяло формуванню кістково-керамічного комплексу у більш ранні терміни (14–30 доба), ніж при застосування дрібних (90 доба) і, особливо, крупних (180 доба) гранул гідроксилапатиту, що сприяло збереженню структурно-функціональних характеристик у

зоні імплантації. У результаті біодеградації складової частини композиту – трикальційфосфату, який має більшу швидкість резорбції, ніж гідроксилапатит (Hardouin P. et al., 1991; Ikenaga M. et al., 1998), площа імплантату з часом зменшувалася. Через 90 діб відмічено зменшення розмірів керамічного блоку у 1,23 рази: якщо на момент оперативного втручання площа розтину імплантів була стандартною і складала 16 мм², то тепер вона дорівнювала 12,95±0,29 мм². Це приводило до збільшення території новоутвореної кісткової тканини, яка заміщувала кераміку, як на периферії імплантату, так і у його внутрішніх порях і, відповідно, підвищувало щільність контакту "кераміка-кістка". Просідання імплантату у дефекті не було виявлено. Забезпечувалися необхідні умови для оптимізації регенерації хряща – нерухомість країв рани (Виноградова Т.П., 1964) та укріплення дна дефекту (Messner K., 1993) за рахунок створення кістково-керамічного комплексу.

Формування хряща починалося від крайових відділів дефекту у напрямку центральної ділянки. Спочатку (30 діб) на поверхні кераміки утворювався хрящ, що за структурними характеристиками відповідав волокнистому хрящу. При вивченні хрящового матриксу після реакції з пікросиріусом червоним виявлялося, що у новоутвореному хрящі починає формуватися поверхнева зона, колагенові волокна в якій орієнтувалися паралельно суглобовій поверхні, а хондроцити розташовуються у капсулах, про що свідчить інтенсивна рефракція при дослідженні у поляризованому світлі. Подвійне променезаломлення глікозаміногліканів при реакції з толуїдиновим синім (pH=2,5) на цьому етапі не спостерігалася, але визначалося метахроматичне забарвлення матриксу, що свідчить про синтез клітинами сульфатованих форм глікозаміногліканів.

Через 90 діб після імплантації вся поверхня керамічного матеріалу була вкрита гіаліновим хрящем. При електронно-мікроскопічному дослідженні у ньому відмічалася фенотипична гетероморфність хрящових клітин. Хондроцити поверхневих відділів розташовувалися довгою віссю паралельно до суглобової поверхні та характеризувалися низькою біосинтетичною активністю. У більш глибоких шарах новоутвореного суглобового хряща виявлялися функціонально активні клітини з розвинутою ендоплазматичною сіткою та комплексом Гольджі. Внутрішньоклітинні процеси клітин були спрямовані на синтез колагену та протеогліканів.

При реакції з толуїдиновим синім спостерігалася інтенсивна рефракція у товщі новоутвореного хряща, що свідчило про наявність в його матриксі орієнтаційно упорядкованих сульфатованих форм глікозаміногліканів та про

специфічність синтезу хондроцитів. Колагенові волокна при забарвленні пікросиріусом червоним мали характерне для зон суглобового хряща розташування: тангенційно до суглобової поверхні у поверхневій зоні та у вигляді аркадних структур у товщі хряща.

Одержані дані щодо стану основних макромолекул матриксу на етапах репаративного хондрогенезу узгоджуються з результатами досліджень організації матриксу суглобового хряща білих щурів, плодів людини, курячих ембріонів (Дедух Н.В., 1988; Foldes I., 1980) на етапах онтогенезу. Встановлено, що на стадіях утворення хряща при відновленні ушкодженої суглобової поверхні повторюються основні закономірності формування матриксу на етапах хондрогенезу різних видів тварин. Вони пов'язані з поступовою появою макромолекул, які мають подвійне променезаломлення, подальшим наростанням їх орієнтаційної упорядкованості та характерним розподілом у товщі суглобового хряща.

Відновлення гіалінового хряща було обумовлено, з одного боку, із забезпеченням певних умов для оптимізації регенерації хряща – нерухомості країв хрящової рани (Виноградова Т.П., 1964), раннього функціонування оперованого суглобу (Гращенкова Т.Н., 1993; Salter R.B., 1980), укріплення дна дефекту (Messner K., 1993) за рахунок формування кістково-керамічного комплексу. З іншого боку, неможливо не враховувати роль суглобового хряща, що залишився неушкодженим й оточував дефект. Механізм його впливу на перебіг процесів відновлення суглобової поверхні полягає в тому, що макромолекули матриксу створюють відповідне мікрооточення, яке необхідне хондроцитам для їх нормального функціонування (Павлова В.Н. та ін., 1988).

ВИСНОВКИ

1. Використання кальцій-фосфатних керамік є новим перспективним напрямком у оптимізації регенерації кістково-хрящових дефектів.
2. Репаративні процеси у внутрішньосуглобових кістково-хрящових ранах, розмірами 1,5×2,0 мм, у щурів перебігають повільно і через 180 діб вони заповнюються на 1/3 об'єму сполучною тканиною. Суглобовий хрящ, що оточує зону дефекту, має виражені деструктивні порушення.
3. Пластика кістково-хрящових ран гранулами гідроксилапатиту сприяє оптимізації регенерації кісткової тканини у області дна дефекту, але не призводить до повної регенерації суглобового хряща.

4. На етапах репаративного процесу (7 та 14 доба) навколо гранул гідроксилапатиту у ділянці кісткового дефекту пролонговано в часі спостерігаються клітини диферону остеобластів: малодиференційовані клітини, пре- та остеобласти, остецити. Проте терміни остеогенного диференціювання клітин, формування матриксу та дозрівання кісткової тканини залежать від розмірів гранул. Утворення пластинчастої кісткової тканини навколо дрібних гранул спостерігається на 90, а навколо крупних – на 180 добу після операції.

5. Пластика дефектів насиченими хондроїтинсульфатом гранулами гідроксилапатиту сприяє остеорепарації та запобігає дегенерації суглобового хряща навколо рани.

6. Використання керамічного блоку (80% гідроксилапатиту та 20% трикальційфосфату) для пластики кістково-хрящових ран приводить до утворення міцного кістково-керамічного комплексу у зоні кісткової рани. На поверхні блоку, у ділянці хрящової рани, спостерігається формування гіалінового хряща.

8. У поверхневих відділах новоутвореного хряща хондроцити розташовані довгою віссю паралельно до суглобової поверхні. У більш глибоких шарах новоутвореного суглобового хряща виявляються функціонально активні клітини з розвинутою ендоплазматичною сіткою та комплексом Гольджі, які відповідають за біосинтез колагену та протеогліканів.

7. Формування хрящового матриксу у зоні ушкодженої хрящової поверхні над керамічним блоком пов'язане з появою макромолекул (колаген та глікозаміноглікани), які мають подвійне променезаломлення, подальшим наростанням їх орієнтаційної упорядкованості та з характерним розподілом їх у товщі новоутвореного хряща.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Korzh A.A., Dedukh N.V., Malyshkina S.V., Shevchenko S.D., Ashukina N.A. Bioactive ceramics on the basis of hydroxyapatite: a new material for bone tissue plastics // School Fundamental Medicine Journal. – 1995. – № 1. – P.60-63.

2. Ашукіна Н.О., Малишкіна С.В. Морфологія повношарового дефекту суглобового хряща в умовах пластики гідроксилапатитною керамікою // Вісник морфології. – 2000. – № 1. – С.23-26.

3. Ашукіна Н.О. Використання гранул гідроксилапатиту для пластики кістково-хрящових дефектів // Вісник Білоцерківського аграрного університету. – 2001. – Вип.17. – С. 137–142.

4. Малишкіна С.В., Ашукіна Н.О. Морфологічна характеристика кістково-хрящових дефектів в умовах пластики керамічним композитом на основі гідроксилапатиту та трикальційфосфату // Медицина сегодня и завтра. – 2001. – №3. – С.14–17.

5. Деклараційний патент на винахід 39687А, МКВ 7А61F2/28 А61L27/00 С04В38/00. Композит для заповнення кісткових та кістково-хрящових дефектів / Корж М.О., Малишкіна С.В., Дедух Н.В., Ашукіна Н.О. – №2000127383; Заявл. 21.12.01; Опубл.15.06.2001. – Бюл.№ 5, Ч. II. – С. 1.29-1.30.

6. Dedukh N.V., Malyshkina S.V., Ashukina N.A. Hydroxyapatite: a material for bone tissue plastics // 2nd Central European Orthopaedic Congress. – Hungary, 1998. – CD. – P. 2–5.

7. Ашукіна Н.А. Гидроксилапатит – материал для пластики полнослойных дефектов суставного хряща // Материалы конференции молодых ученых "Новое в решении актуальных проблем ортопедии и травматологии". – Москва: ГУН ЦИТО, 2000. – С. 140–141.

8. Ашукіна Н.А. Регенерация суставного хряща при заполнении его дефектов гранулами гидроксилапатита разного размера// Ортопедия, травматология и протезирование. – 2000. – №2. – С.94.

9. Ашукіна Н.А. Использование цилиндрических композитов на основе гидроксилапатита и трикальцийфосфата для пластики костно-хрящевых дефектов // Материалы научной конференции "Морфологические основы гистогенеза и регенерации тканей". – Санкт-Петербург, 2001. – С. 15–16.

АНОТАЦІЯ

Ашукіна Н.О. Регенерация кістково-хрящової рани при використанні кальцій-фосфатних керамік. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.09. – гістологія, цитологія, ембріологія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2002.

У дисертації представлені дані експериментального дослідження (140 щурів та 15 кроликів) регенерації кістково-хрящових ран в умовах їх пластики біоактивними кераміками на основі гідроксилапатиту.

Встановлено, що пластика кістково-хрящових дефектів гранулами гідроксилапатиту сприяє оптимізації регенерації кісткової тканини в області дна дефекту, але не призводить до пової регенерації суглобового хряща.

У зоні хрящової рани переважно спостерігався волокнистий хрящ.

Темпи кісткоутворення залежать від розмірів керамічних гранул: дрібні гранули гідроксилапатиту (80–100 мкм) через 90 діб майже повністю оточені новоутвореною кістковою тканиною, а навколо крупних гранул (400–600 мкм) на цей термін все ще спостерігалися значні території фіброретикулярної тканини.

Розроблено композит на основі гідроксилапатиту та хондроїтисульфату. Хондроїтисульфат у складі композиту стимулював остеорепарацію та сприяв збереженню структури материнського суглобового хряща.

Вперше доведена можливість одержання гіалінового хряща у зоні хрящової рани на поверхні керамічного блоку (80% гідроксилапатиту та 20% трикальційфосфату). Використання імплантату у вигляді блоку забезпечувало нерухомість країв рани, а формування міцного кістково-керамічного комплексу у ранні терміни – укріплення дна дефекту. Через 3 місяці після імплантації вся поверхня керамічного блоку була вкрита гіаліновим хрящем з хондроцитами у капсулах та характерним розташуванням колагенових волокон.

Ключові слова: регенерація, гідроксилапатит, кістково-хрящова рана.

АНОТАЦІЯ

Ашукина Н.А. Регенерация костно-хрящевой раны при использовании кальций-фосфатных керамик. – Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09. – гистология, цитология, эмбриология. - Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, 2002.

В диссертации представлены данные экспериментальных исследований по регенерации костно-хрящевых ран в условиях их пластики биоактивными керамиками на основе гидроксилапатита.

В экспериментах на крысах (140 животных) установлено, что пластика костно-хрящевых дефектов (диаметром 1,5 мм и глубиной 2 мм) гранулами гидроксилапатита способствует оптимизации регенерации костной ткани в области дна дефекта, но не приводит к полной регенерации суставного хряща. В зоне поврежденной суставной поверхности образуется преимущественно волокнистый хрящ. Аналогичные дефекты без пластики заполнялись на 1/3, в основном, волокнистой соединительной тканью.

С помощью методов электронной микроскопии установлено, что клетки на этапах формирования репаративной бластемы в области дна дефекта не воспринимают гидроксилapatит в качестве чужеродного материала. Канальцы эндоплазматической сети располагались в непосредственной близости к зоне контакта клеточной мембраны с частицами гидроксилapatита; цитоплазматические отростки клеток бластного характера (фибробластов, остеобластов, хондробластов) проникали в поры керамики, за счет чего повышалась плотность костно-керамического комплекса. Также вплотную к поверхности гидроксилapatита и вблизи него располагались клеточные элементы, принимавшие участие в процессе биодеградации керамики, – макрофаги и остеокласты.

Сроки костеобразования, особенно в центральных отделах дефектов, находились в зависимости от размеров гранул гидроксилapatита. Так, при использовании мелких гранул (80–100 мкм) через 90 суток практически вся территория костной раны была заполнена новообразованной костной тканью, а в центральных участках вокруг крупных гранул (400–600 мкм) все еще отмечались значительные территории фиброретикулярной ткани остеогенного характера.

Разработан композит для пластики костных и костно-хрящевых дефектов на основе гранул гидроксилapatита и хондроитинсульфата. Показано, что хондроитинсульфат, введенный в состав композита, стимулирует остеорепарацию и способствует сохранению структуры материнского суставного хряща.

Впервые доказана возможность получения гиаланового хряща в зоне хрящевой раны на поверхности керамического блока (80% гидроксилapatита и 20% трикальцийфосфата) в экспериментах на кроликах (15 животных).

Использование имплантата цилиндрической формы, соответствующей размерам дефекта (диаметром 4 мм и высотой 4 мм), обеспечивало неподвижность краев раны, а формирование прочного костно-керамического комплекса на ранние сроки – укрепление дна дефекта. В результате биодеградации трикальцийфосфата площадь имплантата со временем уменьшалась, что приводило к увеличению территорий, занимаемых новообразованной костной тканью. Через 3 месяца вся поверхность керамического блока была покрыта гиалиновым хрящом с высокой плотностью располагавшихся в капсулах хондроцитов. Специфические реакции на макромолекулы матрикса показали наличие сульфатированных форм гликозаминогликанов и упорядоченно расположенных коллагеновых волокон – тангенциально к суставной поверхности в наружных отделах и в виде аркадных структур в толще хряща.

Ключевые слова: регенерация, гидроксилapatит, костно-хрящевая рана.

SUMMARY

Ashukina N.O. Regeneration of osteochondral wound using calcium phosphate ceramics. – Manuscript.

Thesis for acquisition of scientific degree of the candidate of Biological Sciences under the speciality 14.03.09 – histology, cytology, embryology. – Kiyv Taras Shevchenko National University, Kiyv, 2002.

The data of experimental research of osteochondral wound regeneration using plastics by bioactive ceramics based on hydroxyapatite in 140 rats and 15 rabbits are represented in this dissertation.

It was found that plastics of osteochondral defects with hydroxyapatite granules favored the optimization of osseous tissue regeneration in the area of defect floor but did not result in full regeneration of articular cartilage. Fibrous cartilage was mainly observed in the area of cartilage wound.

Rate of bone formation depends on ceramic granule size: small hydroxyapatite granules (80–100 mkm) were almost completely surrounded by newly formed bone in 90 days, while considerable areas of fibrous-reticular tissue could be observed around big granules (400–600 mkm) after the same period.

Composite material was developed on the basis of hydroxyapatite and chondroitine sulphate. Chondroitine sulphate as a constituent of the composite stimulated osteorepair and favored the preservation of host articular cartilage.

For the first time the possibility to obtain hyaline cartilage in the area of cartilage wound on the surface of ceramic block (80% of hydroxyapatite and 20% of tricalciumphosphate) was proved. The use of block graft provided for immobility of wound edges and the formation of solid bone-ceramic complex stimulated the reinforcement of defect floor on the early stages. In 3 months after the implantation the whole surface of ceramic block was covered with hyaline cartilage with chondrocytes in capsules and characteristic order of collagen fibres.

Key words: regeneration, hydroxyapatite, osteochondral wound.