

УДК 615.464-033.5:616.718.4-089.844-092.9]:599.323.452(045)

DOI: <http://dx.doi.org/10.15674/0030-59872019364-72>

Структурно-метаболическі особливості стегнової кістки щурів за умов імплантації склокристалічного матеріалу

В. М. Шимон¹, Н. О. Ашукіна², Ф. С. Леонтьєва², С. П. Алфелді¹,
А. А. Шерегій¹, О. В. Саввова³, О. А. Нікольченко²

¹ ДВНЗ «Ужгородський національний університет». Україна

² ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України», Харків

³ Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут». Україна

In vivo research is an important link in the development of osteoplastic materials. Aim: to study the structural features and markers of bone metabolism after an implantation into the distal metaphysis of the rat femur of glass crystalline calcium phosphate material (GCM). Methods: hole defects in the distal metaphysis of the femur were performed in 28 white laboratory male rats (age 4 months, weight 200–260 g). GCM cylindrical samples with a diameter of 1 mm and a height of 3 mm were placed in defects. A comparison group for biochemical studies was 5 intact rats. Animals were sacrificed 7, 14, 28, and 90 days after surgery. The histological studies of the bone structure around the implant and assessment of osseointegration were performed. In the blood serum the activity of alkaline phosphatase, the content of chondroitin sulfates, urea, the activity of alanine aminotransferase were determined. Results: 7 days after surgery the relative content of bone tissue around implants was $(28.59 \pm 1.33) \%$, after 14 days it increased by 2.71 times ($p < 0.001$). After 30 days bone tissue was located around the entire perimeter of the implant. Bioresorption of the material continued throughout the observation period. A significant increase in the activity of the alkaline phosphatase in blood serum compared with the rate of intact rats was shown from the 7th to the 30th day of observation. The maximum increase of chondroitin sulfates was recorded on the 7th day. The content of urea in the blood serum and the activity of alanine aminotransferase did not statistically significantly differ in terms of the experiment or from indices of intact animals. Conclusions: the studied material is biocompatible, has osteoinductive and osteoconductive qualities. After implanting it into the bone, bone repair is not impaired, and lamellar bone tissue is formed for the final study period (90 days). A characteristic feature of the material is its gradual resorption until the 90th day of observation. Key words: bone repair, plastic defects, bioglass, rat femur, osseointegration.

Исследования *in vivo* — важное звено в процессе разработки остеопластических материалов. Цель: изучить структурные особенности и маркеры метаболизма костной ткани в условиях имплантации в дистальный метафиз бедренной кости крыс стеклокристаллического кальций-фосфатного материала (СКМ). Методы: у 28 белых лабораторных крыс-самцов (возраст 4 мес., масса 200–260 г) выполнены дырчатые дефекты в дистальном метафизе бедренной кости. В них размещены цилиндрические образцы СКМ диаметром 1 мм, высотой 3 мм. Группой сравнения для биохимических исследований послужили 5 интактных крыс. Животных выводили из эксперимента через 7, 14, 28 и 90 суток после операции. Гистологически изучали структуры кости вокруг имплантата с оценкой остеоинтеграции. В сыворотке крови определяли активность щелочной фосфатазы, содержание хондроитинсульфатов (ХС), мочевины, активность аланиновой аминотрансферазы (АлАТ). Результаты: на 7-е сутки после операции относительное содержание костной ткани вокруг СКМ составляло $(28,59 \pm 1,33) \%$, через 14 сут увеличивалось в 2,71 раза ($p < 0,001$). Через 30 сут костная ткань располагалась по всему периметру имплантата. Биорезорбция материала продолжалась в течение всего срока наблюдения. Значимое повышение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови по сравнению с показателем интактных крыс выявлено с 7 по 30-е сутки. Максимальное увеличение ХС зафиксировано на 7-е сутки, содержание мочевины и активность АлАТ не отличались по срокам эксперимента и от показателей интактных животных. Выводы: СКМ является биосовместимым, имеет остеоиндуктивные и остеокондуктивные качества. В условиях имплантации его в кость остеорепарация не нарушается и на конечный срок исследования (90 сут) образуется костная ткань пластинчатой структуры. Особенностью материала является его постепенная резорбция. Ключевые слова: регенерация кости, пластика дефектов, биостекла, бедренная кость крыс, остеоинтеграция.

Ключові слова: регенерація кістки, пластика дефектів, біоскло, стегнова кістка щурів, остеointegraція

Вступ

Успіх реконструктивно-відновних операцій на кістках скелета залежить від обраної лікувальної тактики, технічного забезпечення, досвіду хірурга та фізико-хімічних властивостей остеопластичного матеріалу. Вимоги до сучасних біоматеріалів, що використовуються для заміщення дефектів кісток, не обмежуються відсутністю токсичного впливу на організм, біосумісністю та високими міцнісними якостями. Важливою є також хімічна спорідненість матеріалу з кістковим матриксом, схожість структури з відповідною ділянкою скелета, здатність утворення міцних фізико-хімічних зв'язків із прилеглою кісткою, сприяння репаративному остеогенезу, контрольована резорбція тощо [1, 2]. Для створення таких матеріалів і дослідження механізмів їхньої інтеграції в кісткову тканину необхідні скоординовані зусилля фахівців у галузі матеріалознавства, біології та медицини [3].

Серед штучних заміників кісткової тканини поширення набули біоактивні кальцій-фосфатні кераміки — гідроксилапатит (ГАП; $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) і трикальцій фосфат (ТКФ; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), які мають високі остеокондуктивні якості [4], проте демонструють обмежену стимуляцію остеогенної диференціації та відносно низьку поверхневу активність [4, 5]. Крім того, дотепер не підібраний ідеальний склад кальцій-фосфатних керамік та умови синтезу для отримання оптимальних темпів резорбції в кістці реципієнта. Дуже повільна резорбція ГАП може призводити до затримки кісткоутворення, а швидка резорбція ТКФ — до зниження міцнісних якостей у ділянці імплантації через недостатній темп формування зрілої кісткової тканини [4, 6].

Біоскло належить до генерації матеріалів, які здатні міцно з'єднуватися з кістковою тканиною ложа завдяки утворенню шару гідроксилкарбонат-апатиту (ГКА) та впливати на механізми активації та проліферації остеогенних клітин [7], васкуляризації [8] завдяки вивільненню у фізіологічному середовищі біологічно активних іонів (кремнію, кальцію, фосфатів) [4, 9]. Проте механічні властивості зразків із біоскла обмежені, їх неможна моделювати за розміром дефекту кістки безпосередньо в операційній, а отримання ін'єкційних форм складне через особливості кристалізації під час синтезу [1].

Одним із підходів для покращення остеогенних властивостей і нівелювання обмежень використання обох видів матеріалів є створення композиційних сполук, до складу яких входять і кальцій-фосфатні кераміки, і біоскло [4, 5]. Легке регулювання складу біоскла дає можливість вводити в них кальцій-фосфатні сполуки й отримати матеріал з особливими властивостями, які задовольнили б вимоги використання в ділянках скелета з різним навантаженням та якістю кісткової тканини. Проте варіації в складі матеріалу призводять до зміни його біологічної активності та розчинності, що обумовлює необхідність проведення різнопланових досліджень, зокрема й для визначення остеоіндуктивних і остеокондуктивних властивостей у складному біологічному середовищі на моделях *in vivo*.

Мета роботи: дослідити структурні особливості та маркери метаболізму кісткової тканини за умов імплантації в дистальний метафіз стегнової кістки щурів склокристалічного кальцій-фосфатного матеріалу.

Матеріал і методи

Характеристика склокристалічного матеріалу

Матеріал із маркуванням АСЗ-5 виготовлений на кафедрі технології кераміки, вогнетривів, скла, емалей та в'язучих речовин біомедичного призначення НТУ «ХПІ». Він являє собою зміцнений біоактивний кальцій-фосфатосилікатний склокристалічний матеріал (СКМ), який складається з фрити, що містить оксиди Na_2O , K_2O , Li_2O , CaO , MgO , P_2O_5 , B_2O_3 , SiO_2 , ZnO , TiO_2 , MnO_2 , Cu_2O , SrO , CaF_2 , додатково вміщує оксид алюмінію, цирконію, церію, кобальту, ванадію, лантану та молібдену. Підвищення тріщиностійкості дослідних матеріалів реалізовано шляхом введення наповнювача діоксиду цирконію, стабілізованого оксидом ітрію у кількості 5 мас. ч. на 100 мас. ч. фрити.

СКМ виготовляли за традиційною технологією, до якої входить шихтування сировинних матеріалів, варка модельного скла у корундових тиглях із температурою 1250–1350 °C упродовж 6 год та витримка за цих температур упродовж 0,5 год. Зразки скла, подрібнені до залишку не більш ніж 5 % на ситі № 008, готували методом напівсухого ізостатичного пресування, формували у вигляді циліндрів діаметром 4 мм і висотою 10 мм, з яких потім для експерименту виточували циліндри діаметром 1 мм, висотою 3 мм.

За умов термічної обробки дослідного скла у визначеному температурному діапазоні вміст кристалічної фази ГАП досягав 60 об. %. Наявність ситалізованої структури матеріалу дозволяє забезпечити його високі міцнісні властивості та досягти необхідного рівня резорбції для формування кісткової тканини за скорочений термін [10].

Дослідження на тваринах

Експерименти виконано з дотриманням вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) [11] та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ст. 26, 31) [12] і схвалено позитивним рішенням комітету з біоетики при ДУ «ІПХС ім. проф. М. І. Ситенка НАМН» (протокол № 184 від 10.09.2018).

Дослідження проведено на 28 білих лабораторних щурах-самцях (на початок експерименту вік 4 міс., маса тіла 200–260 г), яких утримували на стандартному раціоні харчування та споживання води в умовах експериментально-біологічної клініки ДУ «ІПХС ім. проф. М. І. Ситенка НАМН». Додатково, як групу порівняння для біохімічних досліджень, використано 5 інтактних щурів.

Хірургічні втручання виконано в умовах асептики й антисептики під загальним знеболюванням (кетамін, 50 мг/кг живої маси, внутрішньом'язово). Після вистриження шерсті на лівому коліні й оброблення ділянки антисептиком бетадин передньо-латеральним доступом відкривали ділянку дистального метафіза стегнової кістки та за допомогою стоматологічного бора моделювали дірчастий дефект, розміри якого відповідали розмірам імплантата, — діаметром 1 мм, глибиною 3 мм. Циліндричні зразки зі СКМ розміщували в ділянці дефекту з використанням press-fit техніки. Після місцевої обробки антибіотиком пошарово зашивали м'язи та шкірну рану, ділянку хірургічного втручання обробляли антисептиком.

Через 7, 14, 28 і 90 діб після операції по 7 тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під ефірним наркозом. Метод евтаназії обумовлений необхідністю забору крові для біохімічного дослідження.

Для *гістологічного дослідження* виокремлювали прооперовану стегнову кістку щурів і фіксували в розчині 10 % нейтрального формаліну. Після декальцинації в 4 % розчині мурашиної кислоти препарувальною голкою видаляли імплантований зразок і вирізали дистальний мета-

фіз. Зневоднення фрагменту кістки з ділянкою імплантації проводили в етилових спиртах збільшеної концентрації, заливали матеріал у целодин. Виготовлені гістологічні зрізи завтовшки 7–10 мкм забарвлювали гематоксиліном Вейгерта й еозином, пікрофуксином за Ван-Гізоном [13]. Структуру клітин і міжклітинної речовини навколо ділянки імплантації аналізували у світловому мікроскопі Olympus BX63. Для фотографування використано цифрову камеру DP73 (Olympus) і програмне забезпечення «Cell Sens Dimension 1.8.1» (Olympus, 2013).

Морфометричні дослідження виконано за допомогою вбудованих інструментів програми «Cell Sens Dimension 1.8.1» (Olympus, 2013). На центральних зрізах (по 5 від кожної тварини) вимірювали по периметру імплантата довжину (мкм) безпосереднього контакту з кістковою тканиною, без прошарку будь-якої іншої тканини та вираховували у відсотках від загального периметра ділянки імплантації.

Біохімічні дослідження. У сироватці крові щурів для аналізу регенерації кісткової тканини визначали активність лужної фосфатази за кінетичним методом, хондроїтинсульфати — за методом Nemeth–Csoka у модифікації Л. І. Слуцького. Токсичність імплантатів оцінювали на підставі вивчення динаміки вмісту в сироватці крові сечовини та активності ферменту аланінової амінотрансферази (АлАТ). АлАТ визначали за кінетичним методом, вміст сечовини — ферментативним [14, 15].

Статистичний аналіз отриманих показників здійснено за допомогою програмних пакетів Microsoft Excel та Statsoft Statistica 6.0. Для визначення відмінностей між групами порівняння застосовано метод Манна–Уїтні. Значущою вважали різницю за умов $p < 0,05$. У біохімічних дослідженнях порівняння груп проводили за непараметричним критерієм Вілкоксона із розрахуванням медіани (Me) і процентилів (25–75 %).

Результати та їх обговорення

Ускладнень у післяопераційному періоді не спостерігали. Із перших днів після імплантації СКМ тварини повністю навантажували кінцівку, характеризувалися нормальною руховою активністю, споживанням їжі та води. Після декальцинації кістки СКМ вдалося видалити препарувальною голкою у вигляді блока на терміни 7 і 14 діб після імплантації. У подальшому (1 і 3 міс.) він вилучався у вигляді крихти, частина його залишалася замурованою в кістці.

У процесі гістологічного аналізу через 7 діб після операції по периметру видалених зразків у зоні кісткового дефекту виявлено фіброретикулярну тканину остеогенного типу різного ступеня зрілості. У ній спостерігали високу густину клітин остеобластичного та фібробластичного диферонів, які містили великі гіпохромні ядра та базofilьну розвинену цитоплазму, що відображує спрямованість біосинтетичних процесів на продукцію білків, зокрема колагену (рис. 1, а).

Молоді кісткові трабекули розташовувалися між материнською кісткою та фіброретикулярною тканиною в ділянці дна дефекту. У цій самій зоні виявлено також ділянки безпосереднього контакту новоутворених кісткових трабекул з матеріалом імплантата. Щільність остеоцитів у них була високою, на зовнішній поверхні розташовувалися функціонально активні остеобласти (рис. 1, б).

Ознак запалення не виявлено в жодному випадку.

За результатами морфометричного аналізу визначено, що відносний вміст фіброретикулярної тканини, утвореної по периметру ділянки імплантатів був більшим за показник знов сформованої кісткової тканини у 2,5 разу, $p < 0,001$ (табл. 1).

У материнській кістковій тканині поблизу зони імплантатів виявляли ділянки без клітин, демаскування цементних ліній, тріщини, вогнища розшарування кісткового матриксу, що відображує реакцію на травматичне ушкодження. На віддаленні від дефекту структура стегнової кістки не відрізнялася від нормальної.

Через 14 діб після операції по периметру ділянки видалення зразка розташовувалася переважно грубоволокниста кісткова тканина, в якій визначали високу густину великих яскраво забарвлених остеоцитів, розширені кровоносні судини. Її матрикс характеризувався нерівномірним забарвленням, що може відображувати різний ступінь його мінералізації. Хоча на цей

термін після декальцинації імплантований зразок ще вдалося видалити у вигляді суцільного блока, під час гістологічного аналізу виявлено проростання новоутвореної кісткової тканини в поверхневій відділі імплантата сформовані внаслідок його резорбції порожнини, тому мікрочасточки матеріалу опинялися оточеними нею (рис. 2).

За результатами морфометричного дослідження встановлено, що відносний вміст новоутвореної кісткової тканини збільшився порівняно з попереднім терміном експерименту в 2,71 разу ($p < 0,001$; табл. 1). Імовірно, це пов'язано з умовами синтезу цього матеріалу та його фізико-хімічними властивостями, які обумовлюють швидку резорбцію. Продукти розпаду та вивільнені в процесі біорезорбції зі складу склокристалічного композиту іони можуть брати участь в обміні речовин і створювати лужне середовище, яке сприяє підвищенню активності клітин і, відповідно, прискоренню регенерації кістки [16]. У результаті досліджень, проведених у культурі остеобластів людини, доведено, що максимальна експресія генів відбувається за умов наявності в середовищі 20 г/мл розчинного кремнію та 60–90 г/мл іонів кальцію [17]. Також встановлено, що продукти розчинення склокераміки підсилюють в остеопрогеніторних клітинах транскрипцію деяких факторів, необхідних для переходу від фази спокою G0 до активної G1 фази клітинного циклу, що має важливе значення у формуванні нової кісткової тканини [18].

Крім кісткової тканини, навколо порожнини від імплантата містилася фіброретикулярна тканина з високою щільністю бластних клітин і кровоносних капілярів.

У прилеглий до зони дефекту материнській кістці відмічено невеличкі території без клітин, порожні лакуни остеоцитів, ділянки розтріскування кісткового матриксу. Слід зауважити, що на поверхні ушкоджених під час хірургічного втручання материнських кісткових трабекул і розташованих поблизу ділянки дефекту виявлено підвищену щільність остеокластів (рис. 2), резорбційні лакуни, а також території нашарування остеїду, що свідчить про їхню реорганізацію. У міжтрабекулярних просторах містився червоний кістковий мозок.

Над ділянкою дефекту з боку кортексу виявлено формування періосту, який був дещо розширеним через проліферацію та високу функціональну активність клітин остеогенного шару.

Таблиця 1

Відносний вміст тканин (%), утворених по периметру імплантованого СКМ у дефекті дистального метафіза стегнової кістки щурів

Доба спостереження	Новоутворена тканина	
	фіброретикулярна	кісткова
7-ма	71,41 ± 1,33*	28,59 ± 1,33
14-та	22,40 ± 2,35*, **	77,60 ± 2,35**

* — порівняння середніх значень відносного вмісту різних тканин на однаковий термін дослідження, $p < 0,001$;

** — порівняння середніх значень у групах на різні терміни дослідження, $p < 0,001$.

Через 28 днів після операції навколо ділянки імплантації, по всій довжині її периметру, відмічено утворення кісткової тканини (100 %, тобто збільшення її відносного вмісту в 1,3 разу), трабекули якої були спрямовані вздовж поверхні введеного матеріалу. Густина остеоцитів, які утворювали лакуни, залишалася підвищеною.

Слід зазначити, що мікрочасточки остеопластичного матеріалу були «замуровані» в кісткових трабекулах, а також розміщувалися в червоному кістковому мозку міжтрабекулярних просторів (рис. 3).

Як і на попередній термін спостереження, на гістологічних препаратах у зоні імплантації виявлено залишки СКМ, у зовнішні відділи якого проростала кісткова тканина, а в середині нього відмічено тканинну рідину, клітини крові та малодиференційовані. Очевидно, унаслідок біорезорбції матеріал стає проникним для клітин і рідин організму та поступово руйнується ними. Це, на нашу думку, обмежує можливість використання зразків АСЗ-5 у більш навантажених ділянках скелета.

У материнській кістці і на цей термін дослідження виявлено післятравматичні зміни — тріщини (заповнені рідиною або остеїдом), території без клітин, окремі ділянки некротичних змін у кістковому мозку.

Через 90 днів після операції на гістопрепаратах визначали залишки остеопластичного матеріалу, між фрагментами якого в зовнішніх відділах містилися молоді кісткові трабекули, глибше проростали стрічкоподібні тяжі сполучної тканини, кровоносні капіляри, поодинокі малодиференційовані клітини, фібробласти. Новоутворена кісткова тканина пластинчастої структури тісно контактувала з імплантованим матеріалом і без чіткої межі переходила в прилеглу материнську (рис. 4).

Проте на ділянках, де на поверхні СКМ розташовувалися не кісткові трабекули, а кістковий

мозок, відмічено наявність у ньому багатоядерних клітин і макрофагів із цитоплазмою, заповненою гранулярним вмістом. Ці клітини, імовірно, беруть участь у процесі резорбції імплантованого матеріалу, який триває на цей термін дослідження.

За результатами біохімічного аналізу (табл. 2) сироватки крові щурів після імплантації в дистальний метафіз стегнової кістки зразків СКМ виявлено значуще підвищення активності лужної фосфатази в сироватці крові порівняно з показником інтактних щурів із 7 по 28-му добу спостереження. При цьому на 7-му добу різниця становила 1,4 разу, на 14-ту — 1,6; на 28-му — 2,8; тобто показник збільшувався з терміном спостереження, а на 90-ту добу повернувся до референтних значень.

Динаміка зростання вмісту в крові хондроїтинсульфатів зберігалась із 7 до 28-ї доби спостереження, що вказує на можливі деструктивні зміни в кістковій тканині за місцем імплантації. Максимальне підвищення зафіксовано на 7-му добу на 67,8 % порівняно з показником інтактних щурів ($p < 0,05$; табл. 2)

У результаті аналізу токсичності імплантів за динамікою вмісту в сироватці крові сечовини й активності АлАТ статистично значущої різниці між досліджуваними показниками на термінах експерименту та величинами в інтактних тварин не виявлено, що свідчить про відсутність впливу імплантів АЗС-5 на функціональний стан печінки та нирок експериментальних тварин.

Таким чином, у результаті проведеного дослідження встановлено, що за умов імплантації блоків (діаметр 1 мм, висота 3 мм) кальцій-фосфатного склокристалічного матеріалу АСЗ-5 у дистальний метафіз стегнової кістки щурів процес репаративної регенерації кістки не порушувався та перебігав відповідно до загальновідомих стадій.

Таблиця 2
Динаміка лабораторних маркерів крові щурів після імплантації кальцій-фосфатного СКМ (Me, 25–75 %)

Показник	Інтактні щури, n = 5	Доба спостереження			
		7	14	28	90
Сечовина, ммоль/л	4,20 3,80–4,40	3,90 3,50–4,18	2,90 * 2,48–3,00	3,10 1,95–3,90	4,70 4,33–5,60
АлАТ, U/L	58,00 54,50–68,40	65,00 61,25–76,25	56,00 45,50–73,00	61,00 57,75–66,50	54,50 46,50–60,75
Хондроїтинсульфати, г/л	0,230 0,216–0,245	0,386 * 0,346–0,399	0,345 * 0,334–0,356	0,296 * 0,285 — 0,301	0,201 0,168–0,227
Лужна фосфатаза, U/L	328,00 318,00–332,00	464,50 * 411,50–500,10	525,00 * 481,00–546,00	921,50 * 834,50–1032,00	324,50 312,00–417,75

* — вірогідно за Вілкоксоном порівняно з інтактною групою, $p < 0,05$.

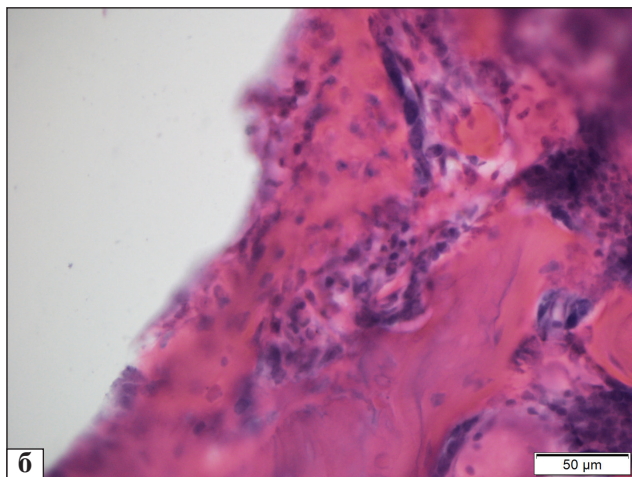
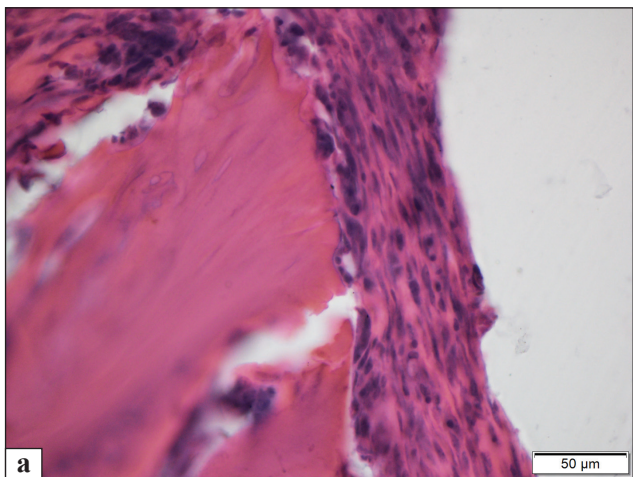


Рис. 1. Фрагмент дистального метафіза стегнової кістки щура через 7 діб після імплантації СКМ, по периметру якого розташована: а) щільна сполучна тканина; б) фіброретикулярна тканина й молоді кісткові трабекули з високою щільністю остеочитів і остеобластів. Гематоксилін та еозин. Зб. 400

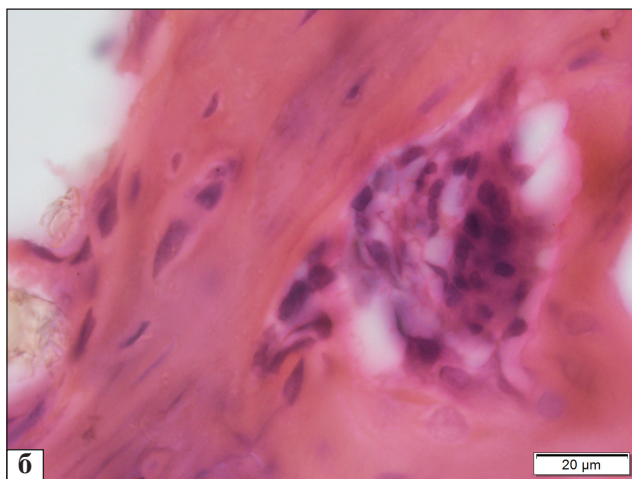
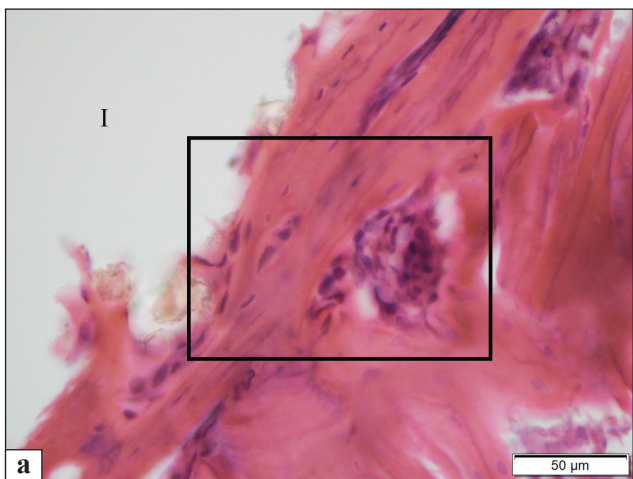


Рис. 2. Фрагмент дистального метафіза стегнової кістки щура через 14 діб після введення зразка СКМ (I). Новоутворені кісткові трабекули проростають у поверхневі відділи матеріалу. Остеокласти на поверхні травмованих материнських трабекул. Гематоксилін та еозин. а) Зб. 400; б) фрагмент рис. 2, а. Зб. 1000

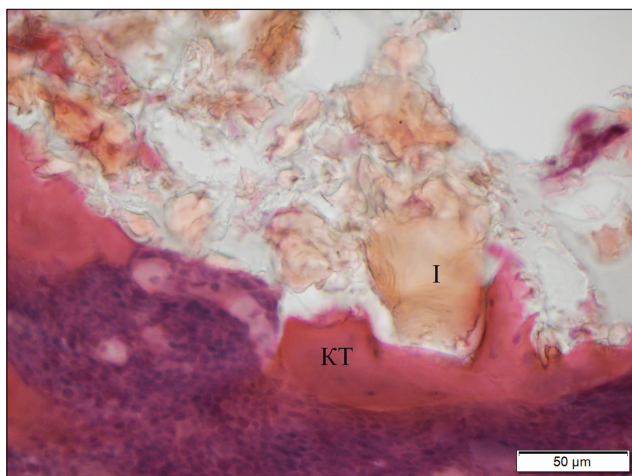
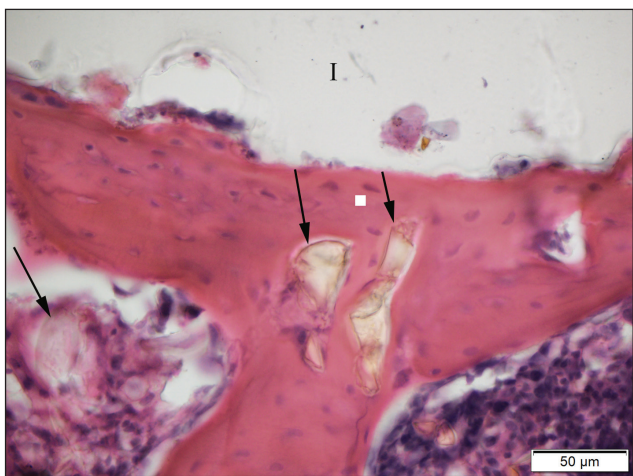


Рис. 3. Фрагмент дистального метафіза стегнової кістки щура через 28 діб після введення зразка СКМ. У кістковій тканині пластинчастої структури на межі з ділянкою імплантації розташовані часточки СКМ (стрілки). Гематоксилін та еозин. Зб. 200

Рис. 4. Фрагмент дистального метафіза стегнової кістки щура через 90 діб після імплантації СКМ, на поверхні та в крайових відділах якого розташована кісткова тканина пластинчастої структури матеріалу. Гематоксилін та еозин. Зб. 200

Утворення кісткової тканини на поверхні досліджуваного СКМ вже на 7-му добу спостереження обумовлено його біоактивністю (здатністю до формування хімічних зв'язків між поверхнею матеріалу та біологічною тканиною), остеокондуктивними й остеоіндуктивними властивостями. Доведено, що біоактивне скло має високу біосумісність і може утворювати сильний хімічний зв'язок з прилеглою кістковою тканиною в найкоротші терміни [16, 19]. У фізіологічному середовищі біоактивне скло вивільняє іони Si, Ca, P і Na шляхом іонного обміну, що призводить до утворення електронегативного Si-OH і багатого на кремній шару на поверхні. На ньому формується другий шар, який складається з аморфного фосфату кальцію. Із фізіологічних рідин у нього вводяться гідроксильні та карбонільні групи, а процес розчинення скла продовжується, починаючи з поверхні. Аморфний шар кристалізується та перетворюється на гідроксилкарбонат-апатит. Утворена поверхня дуже схожа на нанокристалічну мінеральну фазу фізіологічної кісткової тканини за складом і структурою. Завдяки формуванню цього міжфазного шару біоактивне скло здатне сприяти прикріпленню до його поверхні остеогенних клітин, що приводить до швидкого утворення остеоїду між частинками з подальшою його мінералізацією та дозріванням кісткових структур. Це явище визначає як позаклітинні, так і внутрішньоклітинні реакції на межі «біоскло – тканина» через взаємодію з іонами, що виділяються з поверхні [16].

Вивільнений зі складу композиційного матеріалу кремній може стимулювати проліферацію та диференціацію остеобластів, сприяти синтезу колагену та протеогліканів і підвищенню ступеня кальцифікації, особливо на ранніх стадіях репаративного остеогенезу [20]. Інші продукти іонного розчинення біоскла (іони Ca, P, Na тощо) також позитивно впливають на експресію генів остеобластів, що й обумовлює остеоіндуктивні властивості матеріалу. Досягнення вивільнення критичних концентрацій біологічно активних іонів, необхідних на певних стадіях регенерації, з контрольованою швидкістю — одне з головних завдань у створенні нових композицій біоскла [21].

Оцінювання остеointegraції є важливою ланкою дослідження пластичних матеріалів, призначених для використання в реконструктивно-відновних операціях на скелеті. Гістологічно остеointegraцію класифікують як залежний від часу відновлювальний процес з утворенням

кісткової тканини безпосередньо на поверхні імплантата без росту сполучної тканини [22]. У клінічних умовах використання гістологічних визначень цього явища обмежене, тому запропоновано його розуміння з огляду на біомеханіку. Саме показник остеointegraції визначає ступінь стабільності (жорсткості фіксації) імплантата, яка забезпечується завдяки регенерації та ремоделюванню кістки. Від швидкості інкорпорації матеріалу в кістку пластинчастої структури залежить рівень і час функціонального навантаження оперованого сегмента скелета. Серед головних чинників, які впливають на показники остеointegraції, слід зазначити біосумісність матеріалу імплантата, його фізико-хімічні властивості, характеристики поверхні, якість кісткової тканини, особливості хірургічного втручання та умови навантаження [23]. У нашому дослідженні виявлено, що відносний вміст кісткової тканини в регенераті навколо досліджуваного зразка СКМ підвищувався зі збільшенням періоду спостереження та за результатами морфометричного аналізу на 14-ту добу в 2,71 разу перевищував показник на 7-му. Через 28 діб після імплантації зразки СКМ оточувала кісткова тканина.

Як було вказано, створення композитів на основі фосфатів кальцію та біоактивного скла є актуальним завданням сучасного матеріалознавства в галузі біомедицини. Передбачається, що це дозволить не лише регулювати біорезорбцію матеріалу, покращити остеокондуктивні й остеоіндуктивні якості, а й підвищити біомеханічні властивості для розширення використання в ділянках скелета зі значним навантаженням [4, 5].

Особливістю досліджуваного матеріалу АС3-5 була його поступова резорбція з утворенням по периметру та в зовнішніх відділах кісткової тканини та проникненням у внутрішні ділянки тканинної рідини, малодиференційованих клітин, фібробластів, а на кінцевий термін дослідження (90 діб) — сполучної тканини. Це свідчить про тривалість процесу біодеградації дослідного СКМ. Саме через це не вдавалося видалити його у вигляді суцільного блоку після декальцинації під час гістологічної обробки, а мікроскопічно встановлено, що через 28 і 90 діб після імплантації дрібні часточки СКМ були замуrowані в кісткові трабекули та розташовувалися в червоному кістковому мозку.

Деякі автори повідомляють, що збільшення частки в складі остеопластичного матеріалу гідроксилапатиту забезпечує після імплантації

стимулювання росту нової кісткової тканини з утворенням хімічного зв'язку з нею, міцність якого в 5–7 разів вища, ніж за умов використання біоінертної кераміки [20, 24]. Ми бачили, що новоутворена кісткова тканина пластинчастої структури через 90 дів після імплантації тісно контактувала зі СКМ. Проте в разі контакту з червоним кістковим мозком міжтрабекулярних просторів у ньому зафіксовано багатоядерні клітини та макрофаги із дрібногранулярним вмістом у цитоплазмі, що, імовірно, пов'язано з їхньою участю в процесах резорбції матеріалу.

Тобто, досліджуваний матеріал характеризується високою біосумісністю, має добрі остеокондуктивні, остеоіндуктивні властивості, інкорпорується в кістку. Проте швидка деградація зразків АСЗ-5 робить його крихким, що може стати обмеженням для його використання в навантажених ділянках скелета.

Висновки

У результаті експериментального дослідження з використанням методів біохімії та гістології встановлено, що матеріал АСЗ-5 є біосумісним, має остеокондуктивні й остеокондуктивні якості.

Під час морфологічного дослідження встановлено, що за умов введення циліндричних блоків, виготовлених зі склокристалічного кальцій-фосфатного матеріалу АСЗ-5, у дистальній метафіз стегнової кістки щурів остеорепарація навколо них перебігає відповідно до загальноновідомих стадій з утворенням кісткової тканини пластинчастої структури на кінцевий термін дослідження (90 дів).

Характерною особливістю матеріалу АСЗ-5 є його поступова резорбція з утворенням по периметру та в зовнішніх відділах кісткової тканини і проникненням у внутрішні ділянки тканинної рідини, малодиференційованих клітин, фіброblastів, а на кінцевий термін дослідження (90 дів) — сполучної тканини. Через 90 дів після імплантації в кістковому мозку, який межував із матеріалом імплантата АСЗ-5, виявлено клітини макрофагальної системи, які беруть участь у його утилізації.

Конфлікт інтересів. Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

Список літератури

1. Біологічно активні склокристалічні матеріали медичного призначення / О. В. Саввова, О. В. Бабіч, О. І. Фесенко, Г. К. Воронов. — Харків : Планета-Принт, 2018. — 132 с.
2. Amini A. R. Bone tissue engineering: recent advances and challenges / A. R. Amini, C. T. Laurencin, S. P. Nukavarapu // *Critical Reviews in Biomedical Engineering*. — 2012. — Vol. 40 (5). — P. 363–408. — DOI:10.1615/critrevbiomedeng.v40.i5.10.
3. Catauro M. Advanced glass-ceramic materials for biomedical applications / M. Catauro, F. Bollino // *Journal of Bone Reports&Recommendations*. — 2017. — Vol. 3. — Article ID: 2. — DOI: 10.4172/2469-6684.100035.
4. Biological properties of calcium phosphate bioactive glass composite bone substitutes: current experimental evidence / M. Karadjian, C. Essers, S. Tsitlakidis [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2019. — Vol. 20 (2). — Article ID: 305. — DOI: 10.3390/ijms20020305.
5. Bellucci D. Hydroxyapatite and tricalcium phosphate composites with bioactive glass as second phase: State of the art and current applications / D. Bellucci, A. Sola, V. Cannillo // *Journal of Biomedical Materials Research*. — 2015. — Part A, Vol. 104 (4). — P. 1030–1056. — DOI: 10.1002/jbm.a.35619.
6. Шпак А. П. Апатиты / А. П. Шпак, В. Л. Карбовский, В. В. Трачевский. — К. : Академперіодика, 2002. — 414 с.
7. Bioactive glass ions as strong enhancers of osteogenic differentiation in human adipose stem cells / M. Ojansivu, S. Vanhatupa, L. Bjorkvik [et al.] // *Acta Biomaterialia*. — 2015. — Vol. 21. — P. 190–203. — DOI: 10.1016/j.actbio.2015.04.017.
8. Angiogenic potential of boron-containing bioactive glasses: In vitro study / P. Balasubramanian, L. Hupa, B. Jokić [et al.] // *Journal of Materials Science*. — 2017. — Vol. 52 (15). — P. 8785–8792. — DOI: 10.1007/s10853-016-0563-7.
9. Bioactive glasses: from parent 45S5 composition to scaffold-assisted tissue-healing therapies / E. Fiume, J. Barberi, E. Verné, F. Baino // *Journal of Functional Biomaterials*. — 2018. — Vol. 9 (1). — Article ID : 24. — DOI: 10.3390/jfb9010024.
10. Biocompatible glass-ceramic coatings. Calcium-phosphate-silicate coatings on titanium for dental implants / O. Savvova, O. Babitch, O. Fesenko, L. Bragina, H. Voronov. — Riga : SIA OmniScriptum Publishing. — 2018. — 67 p.
11. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Страсбург, 18 березня 1986 року : офіційний переклад [Електронний ресурс] / Верховна Рада України. — Офіц. веб-сайт. — (Міжнародний документ Ради Європи). — Режим доступу до документа : http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994_137.
12. Про захист тварин від жорстокого поводження : Закон України № 3447-IV від 21.02.2006 р. [Електронний ресурс] / Верховна Рада України. — Офіц. веб-сайт. — Режим доступу до документа : <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=3447-15>.
13. Саркисов Д. С. Микроскопическая техника : руководство / Д. С. Саркисов, Ю. Л. Перов. — М. : Медицина, 1996. — 544 с.
14. Тимошенко О. П. Клінічна біохімія : навчальний посібник / О. П. Тимошенко, Л. М. Вороніна, В. М. Кравченко. — Харків : Золоті Сторінки, 2003. — 239 с.
15. Морозенко Д. В. Методи дослідження маркерів метаболізму сполучної тканини у сучасній клінічній та експериментальній медицині / Д. В. Морозенко, Ф. С. Леонтєва // *Молодий вчений*. — 2016. — № 2. — С. 168–172.
16. Hench L. L. Bioceramics: from concept to clinic / L. L. Hench // *Journal of the American Ceramic Society*. — 1991. — Vol. 74 (7). — P. 1487–1510. — DOI:10.1111/j.1151-2916.1991.tb07132.x.
17. Hench L. L. Genetic design of bioactive glass / L. L. Hench // *Journal of the European Ceramic Society*. — 2009. — Vol. 29 (7). — P. 1257–1265. — DOI: 10.1016/j.jeurceramsoc.2008.08.002.
18. Jones J. R. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids / J. R. Jones // *Acta Biomaterialia*. — 2013. — Vol. 9 (1). — P. 4457–4486. — DOI:10.1016/j.actbio.2012.08.023.
19. Incorporation of sol-gel bioactive glass into PLGA improves mechanical properties and bioactivity of composite scaffolds

- and results in their osteoinductive properties / J. Filipowska, J. Pawlik, K. Cholewa-Kowalska [et al.] // *Biomedical Materials*. — 2014. — Vol. 9 (6). — Article ID : 065001. — DOI: 10.1088/1748-6041/9/6/065001.
20. Bone biomaterials and interactions with stem cells / C. Gao, S. Peng, P. Feng, C. Shuai // *Bone Research*. — 2017. — Vol. 5 (1). — DOI: 10.1038/boneres.2017.59.
 21. Hoppe A. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics / A. Hoppe, N. S. Güldal, A. R. Boccaccini // *Biomaterials*. — 2011. — Vol. 32 (11). — P. 2757–2774. — DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.004.
 22. Albrektsson T. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration / T. Albrektsson, C. Johansson // *European Spine Journal*. — 2001. — Vol. 10. — P. S96–S101. — DOI: 10.1007/s005860100282.
 23. Role of primary stability for successful osseointegration of dental implants: Factors of influence and evaluation / F. Javed, H. B. Ahmed, R. Crespi, G. E. Romanos // *Interventional Medicine and Applied Science*. — 2013. — Vol. 5 (4). — P. 162–167. — DOI: 10.1556/imas.5.2013.4.3.
 24. Abidi S. S. Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite powder using wet chemical precipitation reaction / S. S. Abidi, Q. Murtaza // *Journal of Materials Science&Technology*. — 2014. — Vol. 30 (4). — P. 307–310. — DOI: 10.1016/j.jmst.2013.10.011.

Стаття надійшла до редакції 22.07.2019

STRUCTURAL AND METABOLIC FEATURES OF THE FEMUR OF RATS AFTER THE IMPLANTATION OF GLASS CRYSTALLINE MATERIAL

V. M. Shimon¹, N. O. Ashukina², F. S. Leontyeva², S. P. Alfeldi¹,
A. A. Sheregii¹, O. V. Savvova³, O. A. Nikolchenko²

¹ SE «Uzhhorod National University». Ukraine

² Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv

³ National Technical University «Kharkiv Polytechnic Institute». Ukraine

✉ Vasyl Shimon, MD, Prof. in Traumatology and Orthopaedics: kavtravm@rambler.ru

✉ Nataliya Ashukina, PhD in Biol. Sci.: natalya.ashukina@gmail.com

✉ Frieda Leontyeva, PhD in Biol. Sci.: alwisia@i.ua

✉ Sergii Alfeldi: alfeldisp@gmail.com

✉ Andrii Sheregii: a.a.s_07@ukr.net

✉ Oksana Savvova, Doctor of Technical Sci.: savvova_oksana@ukr.net

✉ Olga Nikolchenko, PhD in Biol. Sci.: o_nicolchenko@ukr.net