

**Шишацкая Е.И., Винник Ю.С., Маркелова Н.Н., Шагеев А.А.,  
Камендов И.В., Старосветский С.И., Хоржевский В.А., Перьянова О.В.,  
Шумилова А.А., Пахомова Р.А.**

**ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ  
РЕЗОРБИРУЕМОГО ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА IN VIVO НА  
МОДЕЛЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ОСТЕОМИЕЛИТА**

*Сибирский федеральный университет, г. Красноярск*

*Институт биофизики СО РАН, г. Красноярск*

*Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-  
Ясенецкого*

*Красноярский стоматологический научный центр по проблеме сахарного диабета*

**Введение.** Заболевания и травмы опорно-двигательного аппарата относятся к частым патологиям, приводящим к снижению качества жизни, а их удельный вес среди общей заболеваемости неуклонно растет [1,2]; до 30% заболеваний связано с травматизмом. Ежегодно на 100 000 населения регистрируется свыше 1700 повреждений, среди них около 37,5% приходится на переломы верхних и 31,1% - нижних конечностей [3]. Несмотря на использование современных конструкций и технологий лечения, процент осложнений и неудовлетворительных результатов все еще остается высоким, до 37% [4, 9]. Учитывая высокий травматизм и большое количество ортопедических манипуляций, разработка новых эффективных методов реконструктивной ортопедии является важнейшей проблемой восстановительной медицины.

Среди подходов, направленных на улучшение механических свойств биоматериалов из гидроксиапатита (уменьшение жесткости, повышение эластичности) в последние годы сформировалось направление исследований, ориентированное на получение композитов гидроксиапатита (ГАП) с синтетическими полимерами (полиэтиленом, полисульфоном). Однако наполнение гидроксиапатита такими полимерами значительно снижает биосовместимость [5]. Новым решением проблемы может стать создание гибридных материалов на основе гидроксиапатита и биосовместимых полимеров, способных к биодеградации [6, 7, 10].

Среди разрушаемых биополимеров особое место занимают полигидроксикалканаты (ПГА) - полимеры гидроксипроизводных алкановых кислот, которые с конца 1980-х годов прошлого века активно изучают в качестве материала для хирургических элементов, тканевой инженерии и биоискусственных органов [3, 4, 11]. ПГА представляют большой интерес для ортопедии в связи с их механической прочностью, высокой биосовместимостью и медленной биодеградацией [3, 5, 8].

В Институте биофизики СО РАН разработана технология получения ПГА различного состава; получено семейство экспериментальных полимерных изделий и конструкций биомедицинского назначения различного типа; для реконструктивного остеогенеза разработан композит из полимера гидроксимасляной кислоты (полигидроксипроизводного, ПГБ) и ГАП с различным соотношением компонентов, исследованы физико-химические и физико-механические свойства [4]; in vivo показано, что композит ПГБ/ГАП облада-

---

---

ет окстекондуктивными свойствами и способствует образованию костной ткани в тесте эктопического костеобразования [5, 6, 12].

**Цель настоящей работы** - исследование остеопластических свойств полигидроксibuтирата на лабораторных животных на моделях хронического остеомиелита.

**Материал и методы.** Исследованы экспериментальные объемные имплантаты трех типов, изготовленные из собственно полигидроксibuтирата (ПГБ), гибридного материала полигидроксibuтират/гидроксиапатит (ПГА/ГАП) с содержанием ГАП 20 % (фирмы ЗАО Полистом®, Москва) и материал сравнения - Bio-Oss® (препарат ксенокости фирмы Geistlich, Швейцария), а также пломбирочный материал, представляющий собой порошок ПГБ и смесь ПГБ с тиенамом.

Хронический остеомиелит моделировали у кроликов-самцов породы «Шиншилла» 4-5 месячного возраста. Использовали 60 животных (3 группы по 20 животных): 2- экспериментальные и контрольная. Под калипсолдроперидоловым наркозом по переднемедиальной поверхности бедра животным проводили разрез кожи длиной 3 см. Мышцы тупо разводили и фиксировали. В области передней поверхности метадиафиза бедра выполняли остеотомию на протяжении 0,5 см, ограниченную отслойку надкостницы, вскрывали костномозговой канал; ложкой Фолькмана удаляли костный мозг. В образованный дефект имплантировали марлевую турунду с культурой золотистого стафилококка – 10<sup>9</sup> микробных тел *Staphylococcus aureus*. Рану послойно ушивали. Модель экспериментального остеомиелита формировали течение 1 месяца; воспроизводимость модели - 100%. ; процесс был первично-хроническим.

Далее у животных с хроническим остеомиелитом производили пластику костных дефектов. Разрез кожи осуществляли с иссечением послеоперационных рубцов, свища и свищевых ходов. По ходу разреза вскрывали гнойные затеки, удаляли некротические ткани, секвестры. В процессе операции отбирали пробы для определения возбудителя и чувствительности к антибиотикам. Выполняли трепанацию кости на достаточном протяжении до видимой здоровой кости, с вскрытием костномозговых каналов. Образовавшаяся крытообразная костная полость и прилежащие костномозговые каналы тщательно обрабатывали ложкой Фолькмана. После удаления всех нежизнеспособных тканей, полость промывали раствором антисептиков (пливасепт, раствор хлоргексидина). Через контрапертурные разрезы в рану устанавливали ирригаторы для дренирования в области операции в послеоперационном периоде. Далее в костную полость заполняли полностью костнопластическими материалами на основе ПГБ и ксенотрансплантатом. Рану послойно ушивали наглухо. Дренажные трубки присоединяли к вакуумному устройству. В послеоперационном периоде для покоя проводили иммобилизацию конечности гипсовой лонгетой или ортезом.

В послеоперационном периоде осуществляли динамическое наблюдение за состоянием животных (аппетит, двигательная активность, опороспособ-

ность оперированной конечности, состояние тканей в месте операции. Выведение животных из эксперимента для забора материала осуществлялся летальной дозой ингаляционного наркоза. Морфологические исследования выполнены общепринятыми методами. После декальцинации препаратов раствором «Трилона-Б» готовили гистологические срезы (толщиной 5-10 мкм), которые окрашивали гематоксилин-эозином. На аутопсии оценивали состояние окружающих мягких тканей, состояние надкостницы, кортикального слоя и костномозгового канала. В эксперименте с модельным остеомиелитом в области дефекта проводили бактериологический посев на среду Чистовича (желточно-солевой агар). Морфологические исследования проводили с применением поляризационного микроскопа в проходящем свете Axioskop 40 Pol. (Karl Zeiss) с цифровой фотокамерой AxioCam MRc-5. С использованием Image Analysis System «Carl Zeiss» (Германия) проводили анализ изображений и морфометрические исследования срезов для костной ткани в месте дефекта, оценки состояния и динамику резорбции материала имплантатов. Определение остаточного содержания материала имплантатов в месте дефекта проводили модифицированным морфометрическим методом В.П. Яценко.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы «MS Excel»; рассчитывали среднюю арифметическую величину и ее ошибки ( $M \pm m$ ) и критерий Стьюдента ( $t$ ) с определением достоверности различий ( $p$ ). Критический уровень значимости  $p$  принимали меньшим или равным 0,05. Анализировали не менее 5-ти гистологических срезов препаратов, полученных от каждого животного; в ходе морфометрического анализа анализировали не менее 10 областей (10 полей зрения).

**Результаты и обсуждение.** В раннем послеоперационном периоде (до 3 суток) животные оставались вялыми, мало двигались, щадили оперированную конечность. Аппетит и двигательная активность кроликов восстанавливалась к 3-5 суткам, однако отсутствовала опора на больную конечность. На 5-12 сутки после операции у 19 животных выявлен отек мягких тканей в области операции, у 12 – локальная гиперемия кожи. В среднем на  $16,5 \pm 3,2$  сутки отек и гиперемия купировались. Опора на конечность появлялась на  $6,22 \pm 1,72$  сутки после операции. Операционные раны заживали в среднем на  $11 \pm 1,32$  сутки. Летальных случаев в послеоперационном периоде не наблюдали. При замещении костных полостей экспериментального остеомиелита пломбировочным материалом на основе ПГБ наблюдали достоверно более быстрое заживление послеоперационных кожных ран и восстановление опорных свойств оперированной конечности, по сравнению с контрольной группой. Так, в экспериментальных группах заживление операционной кожной раны произошло в среднем через  $7,4 \pm 0,9$  суток; купирование отека и гиперемии мягких тканей - через  $8,75 \pm 0,96$  суток; в контрольной группе, соответственно, на  $9,9 \pm 1,7$  и  $11,7 \pm 1,8$  суток. Восстановление опороспособность оперированной конечности у экспериментальных животных получено на  $4,28 \pm 0,9$  сутки; в контрольной группе – на  $5,56 \pm 1,2$  сутки.

Анализ рентгенографических данных оперированных конечностей жи-

вотных выявил следующее: на 15-е сутки после применения для пластики дефекта ПГБ и ПГБ/тиенам в проекции костного дефекта определены участки просветления округлой формы с четкими границами с облачковидным затемнением в центре. На 90 сутки у всех экспериментальных животных рентгенологически подтверждалось восстановление анатомической структуры кости. В контрольной группе животных в эти сроки сохранялась неоднородность структуры регенерата и утолщение надкостницы.

При исследовании микробного профиля контрольной группы на 30 и на 90 сутки высевались ассоциации микроорганизмов, среди которых доминировали (48,2 %) *Staphilococcus aureus*, остальное - ассоциации грамм положительных и грамм отрицательных анаэробных микроорганизмов, кишечная палочка. В экспериментальной группе с использованием ПГБ на 30 сутки высевались ассоциации микробов преимущественно (44,1 %) *Staphilococcus aureus* и 55,9 % ассоциации грамм положительных, грамм-отрицательных анаэробных микроорганизмов, *E. coli*. На 90 сутки бактериоскопические посеы были отрицательными, то есть гидрофобный порошок ПГБ подавлял инфекцию. В группе животных с использованием ПГБ/тиенам пробы при бактериоскопическом исследовании показали отсутствию роста микроорганизмов на более ранних сроках.

Восстановление анатомической структуры костной ткани наблюдали только в экспериментальных группах животных. В группе сравнения полноценного восстановления костной структуры не произошло. При гистологическом исследовании препаратов экспериментальных групп, в которых дефект заполняли порошком ПГБ и ПГБ/тиенам на 15-е сутки дефект в центре был заполнен грубоволокнистой соединительной тканью с выраженной перифокальной пролиферацией капиллярного типа сосудов, очаговой лимфогистиоцитарной инфильтрацией. Преимущественно вокруг новообразованных сосудов отмечены очаги примитивного остеогенеза с формированием остеоидно-подобных масс, а также костных балок с нарушенной архитектоникой, хаотичным расположением остеоцитов. Зона остеогенеза характеризовалась выраженной базофилией клеток и остеомукоида развивающейся костной ткани. В контрольной группе в эти сроки дефект был заполнен рыхлой соединительной тканью с участками грануляционной и фибро-ретикулярной ткани и остатками детрита. Отмечена выраженная лейкоцитарная инфильтрация регенерата, гиперемия кровеносных сосудов со стазом форменных элементов крови, периваскулярный отек, сосудистая сеть была слабо выражена.

В экспериментальных группах на 30-е сутки дефект уменьшался в размерах, был заполнен грубо-волокнутой фиброзной, костной и хрящевой тканью. Вокруг сосудов вновь образующихся остеонов концентрически наслаивалось межклеточное вещество, формировались костные пластинки. По периферии дефекта, костная ткань была более зрелая, остеоно-балочного строения, расположение остеонов - нерегулярное, гаверсовы каналы различной ширины, полнокровны, периваскулярный отек отсутствовал. В контрольной группе дефект по периферии был заполнен незрелой костной тка-

---

---

нию, в центре представлен грубо-волокнистой рубцовой и хрящевой тканью. Васкуляризация регенерата и окружающей костной ткани - слабая. Надкостница утолщена, инфильтрирована клетками макрофагального ряда.

На 90-е сутки во всех препаратах экспериментальных групп наблюдали признаки, указывающие на полное восстановление целостности костной структуры. Надкостница полностью моделирована, состояла из наружного и внутреннего слоев. Костная ткань различной степени зрелости, пластинчатого строения, расположение остеонов нерегулярное, увеличивалось количество зрелых фиброцитов и остеоцитов. Межуточное вещество становилось оптически более плотным и гомогенным. В группе контроля на 90-е сутки область дефекта определялась по сужению костной ткани в месте операции. Микроскопически в препаратах дефект заполнялся достаточно зрелой костной тканью, местами с прослойками хрящевой ткани. Преобладала плотная костная ткань с малочисленными остеонами, межклеточное вещество, менее гомогенное и рыхлое. Клетки представлены в основном зрелыми фибробластами и остеоцитами, не наблюдалось базофилии клеток и межклеточного вещества. Кортикальная пластинка сужена, костная ткань более зрелая, клетки малочисленны, в межбалочных пространствах сосуды синусоидного типа, костномозговой канал либо резко сужен, либо закрыт замыкательной пластинкой.

Таким образом, в ходе эксперимента установлено, что при использовании для пластики костного дефекта, осложненного хроническим остеомиелитом, ПГБ купирование воспалительного процесса, реконструкция костных дефектов и восстановление функциональных свойств оперированных конечностей происходило значительно эффективнее, чем в контрольной группе животных (использован материал аллкости). Морфогенез репаративных процессов в экспериментальных полостях бедренных костей кроликов после пластики ПГБ характеризовался восстановлением анатомической и функциональной целостности костей уже к 60 суткам. При замещении костной полости деминерализованным костным аутотрансплантантом восстановления костной структуры не происходило.

**Заключение.** Полигидроксibuтират и композиты ПГБ с ГАП в виде объемных имплантатов обладают остеоиндуктивными свойствами, которые эффективны для восстановления дефектов костной ткани. Пломбирочный материал порошковогообразного ПГБ и смеси ПГБ/тиенам пригоден для пластики костных полостей, инфицированных *Staphylococcus aureus*. Биodeградируемые имплантаты и пломбирочный материал на основе ПГБ обладают выраженными остеопластическими свойствами, медленно деградируют *in vivo*, обеспечивая нормальное протекание репаративного остеогенеза. Результаты позволяют рекомендовать ПГБ в качестве костнопластического материала для восстановления дефектов костной ткани.

#### Список использованных источников

1. Шишацкая Е.И. Биосовместимые и функциональные свойства гибридного композита полигидроксibuтират/гидроксиапатит// Вестн. трансплантологии и искусственных

органов. – 2006. – № 3. – С. 34–38.

2. Шишацкая Е.И. и др. Структура и физико-химические свойства гибридного композита полигидроксibuтират/гидроксипапатит// Перспективные материалы. – 2005. – № 1. – С. 40–46.

3. Шишацкая Е.И. Реакция тканей на имплантацию микрочастиц из резорбируемых полимеров при внутримышечном введении// Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2007. – Т. 144, № 12. – С. 635–639.

4. Исследование остеопластических свойств матриц из резорбируемого полиэфира гидроксимасляной кислоты/ Е.И. Шишацкая, И.В. Камендов, С.И. Старосветский, Т.Г. Волова// Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2008. – Т. 3. – № 4. – С. 41–47.

5. Detection of breast implant rupture with aspiration cytology/ Н.Н. Caffee, N.S. Hardt, G. La Torre// Plast. Reconstr. Surg. – 1995. – Vol. 95, N 7. – P. 1145–149.

6. Hydroxyapatite reinforced poly(3hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3hydroxyvalerate) based degradable composite bone plate/ S. Coskun, F. Korkusuz, V. Hasirci// J. Biomat. Sci. Polymer – 2005/ – Vol. 16. – P. 1485–1502.

7. Bioplastique: a new textured copolymer microparticle promises permanence in soft-tissue augmentation/ R.A. Ersek, A.A. Beisang 3rd// Plast. Reconstr. Surg. – 1991. – Vol. 87, N 4. – P. 693–702.

8. Greene W.B. et al. Electron probe microanalysis of silicon and the role of the macrophage in proximal (capsule) and distant sites in augmentation mammoplasty patients// Plast. Reconstr. Surg. – 1995. – Vol. 95, N 3. – P. 513–519.

9. Hodgkinson D.J. Buckled upper pole breast style 410 implant presenting as a manifestation of capsular contraction // Aesthetic Plast. Surg. – 1999. – Vol. 23, N 4. – P. 279–281.

10. Does silicone induce autoimmune diseases? Review of the literature and case reports/ W. Kaiser, J. Zazgornik// Z. Rheumatol. – 1992. – Bd. 51, N 1. – S. 31–34.

11. Miro-Mur F. et al. Medical-grade silicone induces release of proinflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells without activating T cells// J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. – 2009. – Vol. 90, N 2. – P. 510–520.

12. Silicone deposition in reconstruction scars of women with silicone breast implants/ D.S. Raso, W.B. Greene, R.A. Harley, J.C. Maize// J. Am. Acad. Dermatol. – 1996. – Vol. 35, N 1. – P. 32–36.

13. Вовк Е.А., Гребенников В.В. Роль комплекса лучевых методов в диагностике хронического остеомиелита// Врач-аспирант, №1.2(50), 2012. – С. 267-273

14. Ладонин С.В. Особенности репаративного остеогенеза при экспериментальном хроническом остеомиелите после пластики костной полости деминерализованным костным имплантатом// Врач-аспирант, №2.4(45), 2011. – С. 586-592.