

## **Экспериментальное исследование использования углеродных наноструктурных имплантатов при замещении циркулярных диафизарных дефектов длинных костей**

Н.А. Кононович

Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории коррекции деформаций и удлинения конечностей, Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г. А. Илизарова.

В.И. Шевцов

Доктор медицинских наук, ортопедия, заслуженный врач Российской Федерации, Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г. А. Илизарова.

Е.Н. Горбач

Кандидат наук, гистология, старший научный сотрудник лаборатории морфологии, Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г. А. Илизарова.

В.А. Медик

Доктор медицинских наук, член-корреспондент Российской Академии наук.

М.В. Стогов

Доктор биологических наук, клиническая и экспериментальная лаборатория, Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г. А. Илизарова.

Д.Ю. Борзунов

Доктор медицинских наук, ортопедия, заместитель директора по научной работе, Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г. А. Илизарова.

М.А. Степанов

Кандидат ветеринарных наук, лаборатория гнойной остеологии и дефектов конечностей, ветеринарный хирург, Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г. А. Илизарова.

Соавтор: Наталия Кононович

[n.a.kononovich@mail.ru](mailto:n.a.kononovich@mail.ru)

Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории коррекции деформаций и удлинения конечностей, Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г. А. Илизарова, ул. Ульянова, дом 6, Курган, Россия.

### **Краткий обзор**

#### **Цель исследования**

В качестве объекта исследования использовались подопытные животные с целью получения научных результатов применения наноструктурных углеродных имплантатов при замещении диафизарных дефектов длинных костей.

#### **Материалы и методика**

Эксперимент проводился на восемнадцати взрослых собаках. Циркулярные диафизарные дефекты длинных костей задних правых конечностей были сформированы у группы №1 (в количестве девяти животных) и группы №2 (в количестве девяти животных) и составляли 10 мм (9% от начальной длины большеберцовой кости) и 20 мм (16% от начальной длины большеберцовой кости) соответственно. Были установлены пористые УНИ (производство НаноТехМедПлюс, Великий Новгород, Россия), соответствующие размеру сформированного дефекта. Конечность зафиксирована аппаратом Илизарова. Сразу же после операции был произведен осмотр на предмет безопасности и остеоинтеграции УНИ; соответствующий осмотр проводился через две, четыре, двенадцать и двадцать шесть недель после проведения операции. Использовались методы клинического, радиографического, биохимического и гистологического анализа.

## **Результаты**

Биохимический анализ показал, что УНИ биологически инертны и безопасны. Гистологическое исследование показало активную остеоинтеграцию и прорастание микрососудов в поры углеродного композита. В среднем, костно-углеродный блок формируется по истечении ста пятидесяти дней после операции. Более активная костная остеоинтеграция и формирование блока наблюдались при работе с небольшими дефектами.

## **Выводы**

Тестируемые УНИ играют роль пористого костяка при вращении кровеносных сосудов в клетки костной ткани. В ранний послеоперационный период наблюдается формирование костно-углеродного блока. УНИ соответствуют требованиям к продукции, вживляемой в живой организм, и могут быть рекомендованы для клинических испытаний при замещении циркулярных диафизарных дефектов длинных костей.

## **Ключевые слова**

Наноструктурные углеродные имплантаты; диафизарные дефекты; формирование кости; остеоинтеграция.

## **Введение**

Одним из последних веяний в современной ортопедической науке является поиск материалов для имплантации для замещения дефектов больших участков костной ткани [1-4]. С этой целью часто приводились исследования созданных человеком материалов. Имплантаты из нержавеющей стали, кобальто-хромовых сплавов, керамики, титана или титановых сплавом использовались и проходили испытания чаще всего [5-9]. Такой материал должен быть инертен по отношению к живым тканям, не должен быть канцерогенным, при этом быть механически прочным и резистентным к условиям внутренней среды организма.

Изделия из углерода соответствуют всем этим требованиям. Первые попытки использовать углерод в медицинской практике относятся к началу прошлого века. Углеродные имплантаты начали активно использоваться в начале 70-х [10]. Однако, интерес к их использованию постепенно угас. Очевидно, что это было связано с тем фактом, что углеродные имплантаты для применения в медицинской области изготавливались из углеродных материалов, предназначенных для промышленного применения, они обладали повышенной механической прочностью, при этом пористость их структуры была недостаточна для прорастания костной ткани в имплантат. В 90-е интерес к углеродным материалам начал расти в связи с развитием разработок, которые привели к изменению и улучшению прочностных и остеоинтегрирующих качеств материалов [11-18].

Была разработана технология производства наноструктурных углеродных материалов, которые могут быть адаптированы для производства имплантатов для применения в сфере медицины (НаноТехМед Плюс, Великий Новгород, Россия) (Регистрационное удостоверение Росздравнадзора № РЗН 2014/2080 от 31.10.2014 г.).

Целью эксперимента с использованием подопытных животных было получение научного подтверждения возможности углеродного наноструктурного имплантата обеспечить остеоинтеграцию и безопасность при замещении циркулярных диафизарных дефектов длинных костей.

## **Материалы и методика**

Эксперимент проводился в период с мая 2014 по май 2015. Для эксперимента было отобрано восемнадцать подопытных животных весом от 14 до 16 кг с длиной большеберцовой кости от 14 до 16 см. Все животные прошли карантин сроком сорок пять дней на предмет выявления хронических и острых заболеваний. Циркулярные диафизарные дефекты длинных костей задних правых конечностей были сформированы у группы №1 (в количестве девяти животных) и группы №2 (в количестве девяти животных) и составляли 10 мм (9% от начальной длины большеберцовой кости) и 20 мм (16% от начальной длины большеберцовой кости) соответственно

Правые задние конечности фиксируются в аппарате Илизарова с использованием четырех кольцевых опор (рис. 1). Дефект формируется посредством продольного рассечения. После этого каждому из подопытных животных в рассечение укладывается УНИ, соответствующий размеру дефекта. После этого рана ушивается швом узелками.

Тестируемый УНИ (НаноТехМед Плюс, Великий Новгород, Россия) имеет цилиндрическую форму и диаметр, близкий к диаметру диафиза длинной кости животного (рис. 2). Длина УНИ составляет 10 и 20 мм. Цилиндрическое окончание на 5 мм длиннее и имеют меньший диаметр для осуществления ввода и фиксации в канале. УНИ обладает пористой структурой. Поры имеют прямоугольную форму, при этом их размер составляет от 400 до 600 мкм.

Все хирургические мероприятия проводятся в операционной одной бригадой. В качестве анестетика используется тиопентал натрия. После операции прописываются антибиотики сроком на одну неделю. Животные содержатся в индивидуальных боксах и получают стандартное сбалансированное питание и питьевую воду. В исследовании используются временные отрезки (ВО), до проведения операции (ВО-0), сразу после операции (ВО-1), далее через четыре (ВО-2), двенадцать (ВО-3) и двадцать шесть (ВО-4) недель после операции.

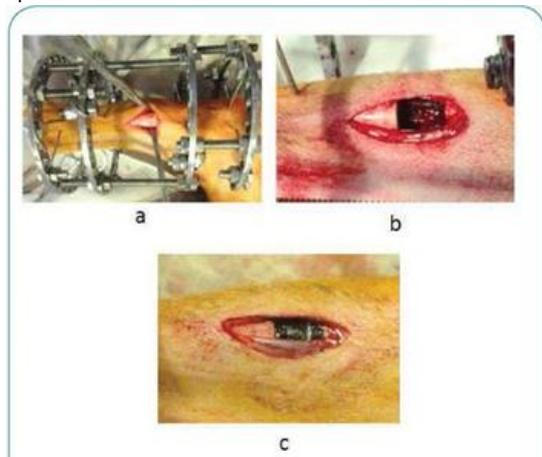


Рис. 1  
Стадии эксперимента:

- a). Установка аппарата Илизарова и проведение продольного разреза на поверхности средней большеберцовой кости;
- b). Моделирование диафизарного дефекта;
- c). Укладывание УНИ в сформированный дефект.



Рис. 2  
Внешний вид УНИ перед выкладкой в диафизарный дефект большеберцовой кости.

#### Методика и процедуры исследования

Ежедневно проводится проверка общего состояния здоровья (измерение температуры тела, частоты дыхания, пульса), изменений в поведении, визуальных изменений волосяного покрова, кожи, потребления пищи и воды.

Делаются фронтальные и латеральные рентгенограммы в течение временных отрезков ВО-0, ВО-1, далее ежемесячно, на этапе ВО-4 используется аппарат VEP X Technology Premium VET производства Испании. Производится осмотр структуры теней на стыках фрагментов кости и имплантата, а также структура, протяженность и интенсивность теней на костных фрагментах и имплантате. Пространственная стабильность имплантата в области дефекта изучается посредством проведения клинических тестов.

Проводятся биохимические тесты для определения активности щелочной фосфатазы (ALP) и костного изофермента устойчивой к тартрату кислой фосфатазы (TRACP), а также тесты на содержание общего кальция (Ca) и концентрации неорганических фосфов в сыворотке крови на этапах ВО-0, ВО-2, ВО-3, ВО-4 в качестве средства оценки эффективности исследуемого имплантата. Уровень безопасности УНИ определяется активностью аминотрансфераз (ALT, AST), а также анализом концентрации общих белков, мочевины, глюкозы, триглицеридов, натрия (Na), калия (K), и хлоридов (Chls) в сыворотке с использованием автоматического биомеханического анализатора Hitachi/ВМ 902 (Hoffmann-La Roche Ltd, Roche Diagnostics GmbH, Базель, Швейцария) и комплекта реагентов Vital Diagnostics (корпорация Витал Девелопмент, Санкт-Петербург, Россия). Анализ содержания натрия, калия и хлоридов проводится методами селекции с применением ионов с использованием системы селекции ионов биомеханического анализатора.

Микроскопическое исследование структуры интактного УНИ производится сканирующим электронным (СЭМ, англ. SEM) микроскопом JSM-840 С (производство компании JEOL, Япония).

Три подопытных животных приносятся в жертву исторического исследования на этапах ВО-2 и ВО-4 (общее количество двенадцать животных) посредством внутривенного введения летальной дозы тиопентала натрия. Костно-углеродный блок изучается при помощи сканирующего электронного микроскопа JSM-840 С. Содержание и распределение остеотропических элементов (кальций, фосфор) оценивается на микроанализаторе INCA-200 Energy, оснащенный рентгеновским электронным зондом (производство компании Оксфорд Интструментс, Великобритания).

Статистическое исследование определяет средние показатели и стандартные девиации ( $X_i \pm SD$ ). Значение разницы в результатах на различных временных отрезках оценивается согласно критерию Манна-Уитни-Уилкоксона, используемого для независимых образцов.

Данное исследование получило одобрение совета по этике. Вмешательство, уход за животными и эвтаназия соответствуют требованиям европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 18.03.1986); а также критериям, указанным в Руководящих принципах по уходу и использованию лабораторных животных (Национальная Академия наук США, 1996), а также законодательству Российской Федерации.

### Результаты

В течение всего периода эксперимента состояние животных удовлетворительное. Изменения в потреблении пищи и воды, а также поведении не наблюдаются. У трех животных из группы №1 и четырех из группы №2 наблюдается незначительная припухлость в месте проведения операции в течение четырех дней после оперативного вмешательства; у трех животных присутствует гематома. Эти эффекты не сказываются на результатах исследования.

Места наложения швов заживают первичным натяжением. Швы удаляются на седьмой день. Связующая ткань швов имеет розовый цвет (рис. 3). У трех животных из группы №2 развивается инфекция в послеоперационном шве на начальном этапе в течение семи дней после оперативного вмешательства. Производится повторный ввод антибиотиков, что приводит к остановке инфекции.

Животные осуществляют частичную нагрузку прооперированной конечности на третий-четвертый день и полностью нагружают конечность к четырнадцатому дню (рис. 3а).

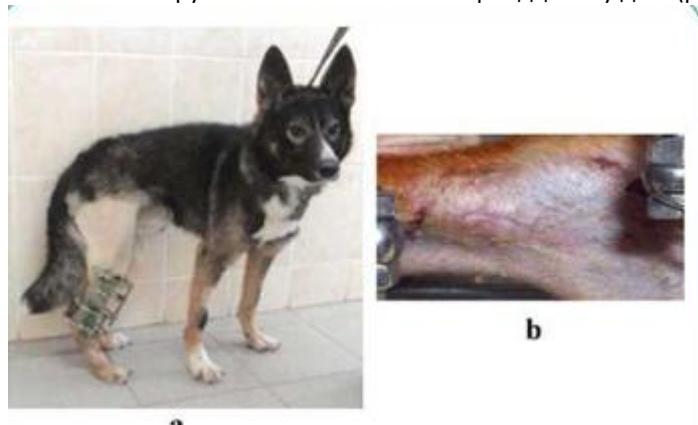


Рис. 3

Ранний послеоперационный период.

а). Внешний вид подопытного животного на четырнадцатый день;

б). Зона оперативного вмешательства на четырнадцатый день (шесть дней после снятия швов).

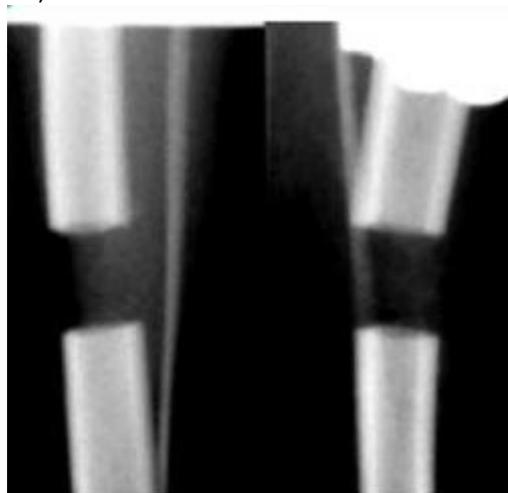


Рис. 4

Рентгенограмма дефекта большеберцовой кости на этапе ВО-1 (УНИ не наблюдается в связи с тем, что является прозрачным для излучения).

### Биохимические результаты

Биохимическое исследование (таблица 1) показывает, что на всех контрольных этапах у животных из обеих групп не проявляется значительной разницы в активности костного изофермента устойчивой к тартрату кислой фосфатазы (TRACP), концентраций общего кальция и неорганического фосфата в сравнении с начальными данными.

### Радиографические результаты

Рентгенограммы на этапе ВО-1 показывают, что оси конечностей корректны у всех животных. Длина большеберцовой кости равна длине в дооперационный период. Костные фрагменты имеют гладкие контуры. Расстояние между фрагментами соответствует размеру имплантированного УНИ. Последний на рентгенограммах не наблюдается (рис. 4).

На этапе ВО-2 все животные группы №1 и шесть животных группы №2 имеют сходные рентгенографические результаты (рис. 5 а, б). На концах фрагментов наблюдаются тени периостальных реакций шириной от 1,5 до 3 мм и длиной от 3,5 до 7 мм. У трех животных группы №2 наблюдаются слабые признаки репаративного остеогенезиса: тени имеют ширину около 1 мм и длину около 2 мм.

На этапе ВО-3 рентгенографическое исследование показывает, что во всех случаях ось большеберцовой кости находится в требуемом положении. Контур костных фрагментов становятся неровными и неотчетливыми (рис. 5 с, д).

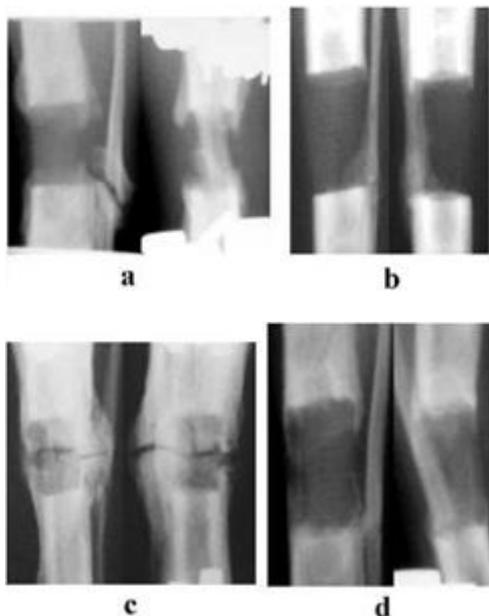


Рис. 5  
Рентгенограмма дефекта на этапе ВО-2:  
а). Группа №1;  
б). Группа №2.

На этапе ВО-3:  
с). Группа №1;  
д). Группа №2.

У двух животных группы №1 и двух группы №2 на стыке формируется прочный костно-углеродный блок. Тени вновь сформированной кости покрывают поверхность имплантата со всех сторон на протяжении всей длины. Клиническое обследование не выявляет мобильность на стыке костных фрагментов с имплантатами. Для проведения клинического анализа, ослабляется фиксация кольцевых опор и прилагается усилие на сгиб в месте контакта УНИ с костью. Аппарат снимается у этих животных.

На этом этапе у других животных наблюдается удлинение теней костной регенерации только на 3 мм. Жесткая патологическая мобильность наблюдается в контактной зоне. Наблюдается формирование костно-углеродного блока у двух животных группы №1 по истечению четырех месяцев, у остальных животных этот процесс наблюдается на этапе ВО-4.

#### Микроскопическое исследование структуры УНИ

Интактная микроструктура УНИ состоит из цилиндрических волокон диаметром 1,5 мм. Каждое из них состоит из микроволокон диаметром до 8,5 мкм. Между волокнами и микроволокнами наблюдается аморфная масса. Прямоугольные поры наблюдаются между волокнами и имеют размер от 400 до 600 мкм (рис. 6).

#### Гистологические результаты

Гистологическое исследование на этапе ВО-2 показало сходные результаты для обеих групп. В контактной зоне наблюдается активная остеоинтеграция костной матрицы в структуру УНИ, как со стороны надкостницы, так и со стороны костных фрагментов.

Размер костной ткани надкостницы на поверхности УНИ составляет от 3 до 7 мм вне зависимости от размеров дефекта. Однако, у животных группы №1 содержание кальция в формируемой надкостнице (процентная концентрация по массе составляет 8,75) в полтора раза превышает по сравнению с животными группы №2 (процентная концентрация по массе составляет 5,83).

Более того, процесс остеоинтеграции на стыке кость-УНИ более активно проходит у животных группы №1. Это находит свое выражение в увеличении содержания кальция в данной зоне в полтора раза (процентная концентрация по массе составляет 4,5) по сравнению с животными группы №2 (процентная концентрация по массе составляет 2,25-3). У обеих групп наблюдается интеграция микрососудов, прилегающего остеобласта и окружающей костной ткани в поры УНИ (рис. 7).

В группе №1 наблюдается формирование непрерывной компактной костной прослойки по всей окружности УНИ (рис. 8а). Ткань более компактна на концах фрагментов (процентная концентрация по массе составляет

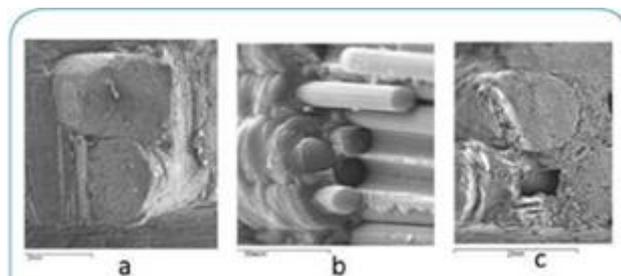


Рис. 6  
Структура интактного УНИ.

- а). Волокна располагаются под разными углами (увеличение в 22 раза);
- б). Микроволокна в связи с аморфным компонентом (увеличение 1700 раз);
- с). Пора УНИ (увеличение 22 раза).

14-15), в то время, как костная прослойка менее компактна в срединных сферических зонах (процентная концентрация по массе составляет 8-9). На этапе ВО-4 в группе №2 наблюдается прерывание кортикальной прослойки на некоторых участках вдоль УНИ (рис. 8б). На некоторых участках поверхности УНИ в непосредственном контакте с концами фрагментов наблюдаются конусообразные прослойки шириной от 5 до 7 мм. Процентная концентрация кальция по массе составляет 12,5 в компактной прослойке ближе к концам фрагментов, в то время, как Процентная концентрация кальция по массе составляет 7,5 в центральной зоне поверхности УНИ. В порах УНИ обнаруживаются остеогенические клетки и микрососуды.

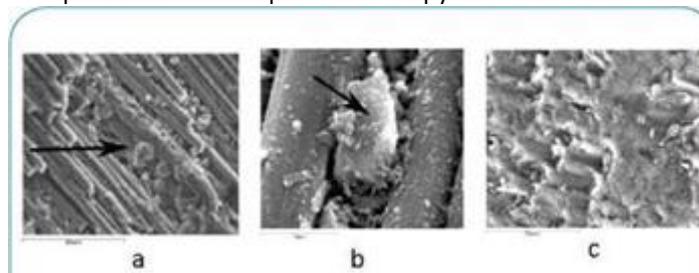


Рис. 7  
Экспрессивность остеоинтеграции на различных участках УНИ на этапе ВО-2.

- а). Капилляры, расположенные между волокнами УНИ (сканирующий электронный микроскоп, увеличение 550 раз);  
 б). Активный остеобласт в средней части УНИ (сканирующий электронный микроскоп, увеличение 4200 раз);  
 в). Синтез костной матрицы между микроволокнами (сканирующий электронный микроскоп, увеличение 900 раз).

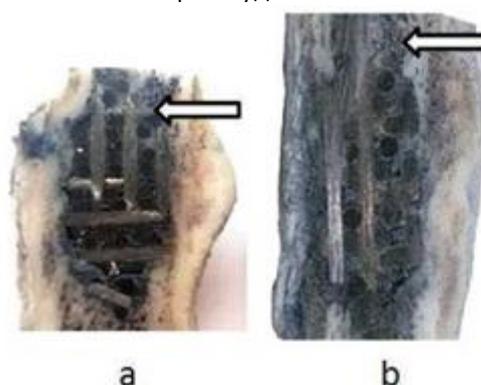


Рис. 8  
Врастание костной ткани в структуру УНИ:  
 а). Группа №1;  
 б). Группа №2.

### Обсуждение

Преыдушие исследования по вопросу использования современных композитных материалов для замещения дефектов костей дают результаты, подтверждающие возможность использовать в костной пластике и реконструктивной хирургии материалы, производимые с применением углерода [19].

Человеческая кость представляет собой композитный материал, состоящий из армированной основы (оссеин) и соединительной матрицы (соли кальция). На основе исследований была разработана инновационная технология производства прочного пористого углеродного композитного материала. Данный материал состоит из армированной основы (углеродные штанги) и наноструктурной углеродной матрицы, которая имеет пористую структура при этом размер пор составляет от 400 до 600 мкм. Физические характеристики УНИ были проверены на наличие возможных дефектов (плотность, прочность на излом, напряжение и модуль эластичности), что показало, что данные характеристики максимально приближены к биомеханическим характеристикам человеческой кости.

Результаты исследования совпадают с результатами, полученными рядом авторов, и подтверждают, что углеродные материалы соответствуют основным требованиям к имплантатам [15]. Анализ проведенного нами клинического исследования и биомеханические изыскания показывают высокий уровень биологической совместимости УНИ, значительную механическую прочность и отсутствие токсичных и канцерогенных эффектов. Архитектура УНИ способствует остеогенезису клеток, врастания микрососудов и волокнистых компонентов.

Ряд авторов описывают контакт углеродных композитов с костной тканью, при котором образуется тонкая слабо абсорбируемая белковая прослойка на поверхности контактного участка соединительной и костной тканей [20]. При этом сам имплантат играет роль механической опоры и пористого костяка для врастания кровяных сосудов и проникновения костных клеток [21]. В результате остеоинтеграционного процесса наблюдается формирование прочного костного блока на стыке кости с имплантатом.

В среднем на формирование такого блока на круговых диафизарных дефектах большеберцовой кости у подопытных животных уходит двадцать две недели, при этом используются УНИ на дефектах размером от 10 до 20 мм. Как и ожидалось, процесс формирования кости является более активным на мелких дефектах размером до 10 мм. Эти данные подтверждаются результатами рентгенографических и морфологических исследований. Дефекты размером до 20 мм, составляющие 16% от анатомической длины большеберцовой кости подопытных животных, в подобных случаях у человека считаются крупными.

Остеогенезис по Илизарову давно используется при работе с диафизарными дефектами длинных костей. Однако, классическая фиксация с использованием кругового фиксатора ассоциируется с рядом осложнений, таких, как инфекции от использования металла, боль, костные инфекции, жесткость суставов, появление шрамов, а также повреждение нервов и сосудов. Также необходимо учитывать дискомфорт, возникающий у пациентов при использовании аппарата Илизарова. Важным является тот факт, что крупные диафизарные дефекты формируются при онкологических заболеваниях и высоко-энергетических травмах и их сложно заполнить в связи с низкой регенеративной способностью диафиза по сравнению с метафизом.

Вышеуказанные факты послужили причиной тому, что исследователи обратились к другим методам замещения крупных дефектов, это касается и нашей группы. Использование УНИ полностью устраняет вышеописанные осложнения.

Операция включает в себя вскрытие зоны дефекта, установку УНИ в дефект в соответствие с его размером. Фиксация конечности может быть осуществлена на усмотрение хирурга – либо посредством внешнего фиксатора, либо пластинами. Возможно использование комбинированной внешней фиксации с пластинами с целью изучения более раннего снятия внешнего фиксатора, при этом пластины оставляются для сокращения срока внешней фиксации. Возможен вариант интрамедуллярной фиксации при помощи штырей, особенного в случаях, когда УНИ имеет центральное отверстие.

В заключение необходимо отметить тот факт, что наш эксперимент продемонстрировал совместимость тестируемых УНИ требованиям к имплантатам, используемым в живых организмах. УНИ не токсичны, не отторгаются и не оказывают воздействие на общее состояние здоровья. Костно-углеродный блок формируется уже на раннем послеоперационном периоде. Костная ткань постепенно покрывает УНИ и проникает в поры, создавая прямые связи с его поверхностью, внутренней структурой и костными фрагментами. Как альтернатива, УНИ могут быть рекомендованы для клинических испытаний в качестве имплантатов, используемых при замещении костных дефектов.

#### Заявление о конфликте интересов

Данное доклиническое исследование осуществлено при финансовой поддержке компании НаноТехМед Плюс, Великий Новгород, Россия.

Таблица 1. Биомеханические результаты, полученные на временных отрезках ( $\bar{X} \pm SD$ ).

Параметры	Группа Group	BO-0	BO-2	BO-3	BO-4
Щелочная фосфатаза ALP, ед/л	I	45±19	<b>80±30 p=0.005</b>	65±26	64±20
	II	38±10	<b>52±8 p=0.02</b>	38±15	39±10
TRACP, ед/л	I	3.60±0.64	3.79±1.97	3.55±1.11	3.25±1.23
	II	4.30±0.25	4.70±1.15	3.90±0.63	4.85±3.41
Кальций, ммоль/л	I	2.72±0.16	2.69±0.10	2.72±0.08	2.73±0.10
	II	2.63±0.16	2.65±0.06	2.63±0.05	2.63±0.14
Фосфор, ммоль/л	I	1.23±0.53	1.29±0.24	1.34±0.24	1.28±0.11
	II	1.32±0.17	1.30±0.30	1.51±0.32	1.19±0.14
Общий белок, г /л	I	65±4	69±4	69±5	70±6
	II	67±4	67±5	71±4	71±3
Глюкоза, ммоль/л	I	4.80±0.57	5.37±0.60	<b>5.77±0.75 p=0.03</b>	5.34±0.61
	II	5.24±0.48	5.04±0.52	4.70±0.55	4.93±0.35
ALT, ед/л	I	27±4	28±11	25±4	31±5
	II	29±10	21±8	27±8	29±8
AST, ед/л	I	34±8	29±11	34±10	36±12
	II	33±9	33±10	29±11	27±8
Мочевина, ммоль/л	I	4.64±1.68	3.74±0.86	3.90±0.99	5.55±2.46
	II	4.21±1.42	4.32±1.18	4.83±1.11	5.54±1.95
Триглицериды, ммоль/л	I	0.55±0.33	0.55±0.09	0.51±0.17	0.50±0.12
	II	0.58±0.18	0.53±0.17	0.65±0.15	0.57±0.11
Натрий, ммоль/л	I	144±3	145±2	150±2	148±3
	II	141±4	144±1	144±2	145±1
Калий, ммоль/л	I	4.57±0.23	4.51±0.45	4.86±0.35	4.68±0.14
	II	4.35±0.42	4.44±0.36	4.56±0.29	4.49±0.14
Хлор, ммоль/л	I	109±2	109±3	106±6	111±4
	II	106±4	109±4	106±2	106±3

**Прим.:** жирным текстом выделены значения с существенной разницей по сравнению с предоперационными данными ( $p < 0.05$ ).

