

НАПРАВЛЕННЫЙ ОСТЕОГЕНЕЗ ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ В ПОЛОСТНОЙ ДЕФЕКТ КОСТИ СЕТЧАТЫХ КОНСТРУКЦИЙ ИЗ НИКЕЛИДА ТИТАНА

DOI: 10.17691/stm2017.9.2.08

УДК 616.71-003.93-089.844

Поступила 8.04.2016 г.



Ю.М. Ирьянов, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории морфологии;
О.В. Дюрягина, к.в.н., старший научный сотрудник лаборатории гнойной остеологии и замещения
дефектов конечностей

Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. академика Г.А. Илизарова,
Курган, 640014, ул. М. Ульяновой, 6

Цель исследования — изучение морфологических особенностей репаративного остеогенеза при имплантации в полостной дефект метафиза бедренной кости крыс сетчатых конструкций из никелида титана.

Материалы и методы. В эксперименте на крысах изучали репаративное костеобразование при имплантации в полостной дефект метафиза бедренной кости сетчатых конструкций из никелида титана. Использовали методы рентгенографии, световой и сканирующей электронной микроскопии, рентгеновского электронно-зондового микроанализа.

Результаты. Установлено, что микропористая поверхность имплантата обеспечивает адгезию остеобластов, остеоинтеграцию и адсорбцию эндогенных костных морфогенетических белков. Имплантат обладает остеокондуктивными и остеоиндуктивными свойствами, купирует воспалительный процесс. В периостальной зоне дефекта вокруг структур имплантата формируется мембранный защитный барьер, препятствующий прорастанию соединительной ткани и обеспечивающий направленный в зону повреждения репаративный остеогенез. Возмещение дефекта осуществляется формирующейся губчатой костью, объемная плотность которой более чем в полтора раза превышает контрольные показатели.

Ключевые слова: полостной дефект кости; направленный репаративный остеогенез; сетчатые конструкции никелида титана; имплантация.

Как цитировать: Iryanov Yu.M., Dyuryagina O.V. Guided osteogenesis using titanium nickelide mesh constructs implanted into a bone cavity defect. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2017; 9(2): 68–74, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.2.08>

English

Guided Osteogenesis Using Titanium Nickelide Mesh Constructs Implanted into a Bone Cavity Defect

Yu.M. Iryanov, DSc, Professor, Chief Researcher, Laboratory of Morphology;
O.V. Dyuryagina, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Purulent Osteology and Limb Defect Filling

Russian Ilizarov Scientific Center for Restorative Traumatology and Orthopedics, 6 M. Ulyanova St., Kurgan,
640014, Russian Federation

The aim of the investigation was to study the morphological characteristics of reparative osteogenesis using titanium nickelide mesh constructs implanted into a cavity defect of the rat femoral metaphysis.

Для контактов: Ирьянов Юрий Михайлович, e-mail: irianov@mail.ru

Materials and Methods. Reparative bone formation after implantation of titanium nickelide mesh structures into a cavitory defect of femoral metaphysis has been studied experimentally on rats. The following methods were used in the work: radiography, light and scanning electron microscopy, electron probe X-ray microanalysis.

Results. The implant microporous surface has been established to provide osteoblast adhesion, as well as osseointegration and adsorption of endogenic bone morphogenetic proteins. The implant possesses osteoconductive and osteoinductive characteristics, stops inflammatory processes. The membrane protective barrier, which prevents connective tissue ingrowth and provides guided osteogenesis, has formed around the implant in the defect periosteal zone. The defect is replaced with cancellous bone, the volumetric density of which is 1.5 times more than the control values.

Key words: bone cavitory defect; guided reparative osteogenesis; mesh constructs from titanium nickelide; implantation.

Главным препятствием реституции больших по объему дефектов кости является прорастание с периаппаратной поверхности соединительной ткани, что обусловлено более высокой скоростью миграции фибробластов по сравнению с остеогенными клетками [1–3]. Это может полностью или частично ингибировать процесс репаративного костеобразования и явиться причиной замещения дефекта плотной соединительной тканью по типу рубцовой. Для обеспечения оптимальных условий для формирования органотипичного регенерата разработана методика направленного репаративного остеогенеза с использованием мембранной технологии, препятствующей прорастанию соединительной ткани [4, 5]. Для этой цели применяются мембраны из синтетических и природных материалов, которые, однако, не остеointегируются, могут вызвать воспалительную реакцию и отек тканей, при их использовании необходимо повторное оперативное вмешательство [6, 7]. Новые возможности возникли благодаря внедрению медицинских технологий, связанных с применением имплантатов на основе никеля и титана, которые по механическим характеристикам приближаются к костной ткани и являются биосовместимыми [8–10]. Однако все исследования этого материала были выполнены при моделировании только небольших дырчатых дефектов кости и без контрольной серии экспериментов. Эффективность лечения объемных полостных дефектов кости в условиях имплантации сетчатых структур из никелида титана и особенности формирования при этом регенерата кости ранее не изучались. Это свидетельствует об актуальности проблемы и необходимости проведения дальнейших исследований.

Цель исследования — изучение морфологических особенностей репаративного остеогенеза при имплантации в полостной дефект метафиза бедренной кости крыс сетчатых конструкций из никелида титана.

Материалы и методы. У взрослых крыс-самцов линии Wistar в экспериментальной (n=20) и контрольной (n=20) группах моделировали полостные дефекты метафиза бедренной кости. Объем дефекта составлял около 40% общего объема метафиза. Животным экспериментальной группы в дефект помещали имплантат, в контрольной группе дополнительных манипуляций не проводили. Работа выполнена согласно этическим принципам, установленным Европейской

конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.), а также приказу Минздравсоцразвития РФ №708н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Исследование одобрено Этическим комитетом Российского научного центра «Восстановительная травматология и ортопедия» им. академика Г.А. Илизарова.

Имплантат представлял собой сетчатый каркас, выполненный из никелид-титановой нити марки ТН-10 калибром 90 мкм, сформированный по типу трикотажной вязки с ячейками — сквозными открытыми макропорами 100–300 мкм в диаметре (рис. 1, а) [11].

Нить имплантата была изготовлена из композиционного материала, ее сердцевина состояла из наноструктурного монолитного никелида титана, микропористый поверхностный слой (рис. 1, б) толщиной 5–7 мкм — из оксида титана (НПП «МИЦ» НИИ медицинских материалов и имплантатов с памятью формы Сибирского физико-технического института при Томском государственном университете, Россия, сертификат №РООСРУ.АЯ79Н18304). Через 7, 14, 30 и 60 сут животных выводили из эксперимента (использовали по 5 животных на каждую временную точку). Метаэпифизарную зону костей выпиливали, фиксировали в 2% растворе параформальдегида и глутаральдегида на 0,1 М фосфатном буфере при pH=7,4, дегидратировали и заливали в аралдит и парафин (после декальцинации). Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином и по Ван-Гизону. Аралдитовые блоки исследовали при помощи рентгеновского электронно-зондового микроанализатора INCA-200 Energy (Oxford Instruments, Англия) и сканирующего электронного микроскопа JSM-840 (Jeol, Япония). С помощью этих приборов в регенерате определяли объемную плотность костной ткани, индекс компактности и содержание кальция, фосфора, магния, натрия и серы [8].

Статистический анализ проводили с использованием программы Microsoft Excel 2010. Данные представляли в виде средней величины (M), стандартной ошибки среднего (m) и уровня значимости различий (p). Значимость межгрупповых различий сравниваемых параметров, учитывая нормальность распре-

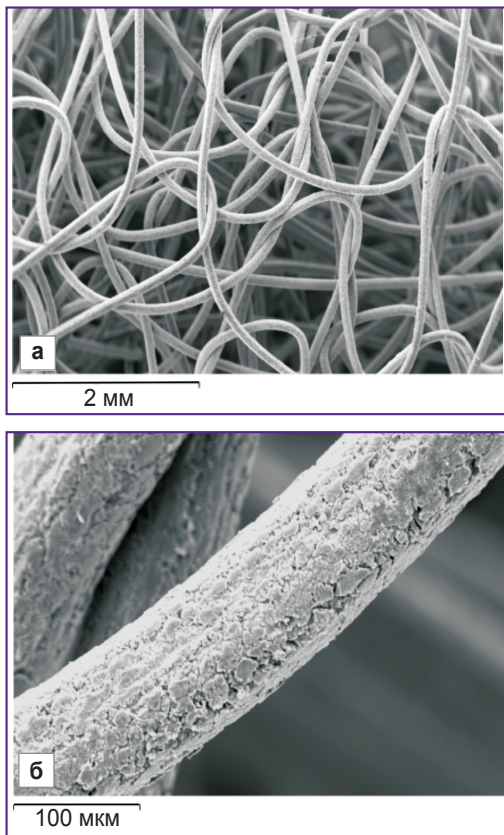


Рис. 1. Внешний вид имплантата (а) и микрорельеф поверхностного слоя нити имплантата (б); сканирующая электронная микроскопия, а — $\times 20$; б — $\times 180$

ления, рассчитывали с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Через 7 и 14 сут после операции в обеих группах животных отмечали признаки костеобразовательного процесса, который осуществлялся со стороны периоста, эндоста, костного мозга и поврежденных костных структур краев дефекта.

В контрольной группе животных в периостальной зоне формировался соединительнотканый регенерат, коллагеновые волокна которого лентовидными пучками прорастали из надкостницы неповрежденных

участков кости в дефект. Центральная зона дефекта была замещена рыхлой соединительной и грануляционной тканью, в которой располагались очаги лимфоцитарной и плазмоцитарной инфильтрации, выявлялись экссудат, клеточный детрит и сгустки фибрина. У наружных краев дефекта в области неповрежденной надкостницы, а также со стороны эндоста формировались островки ретикулофиброзной костной ткани, представленные мелкоячеистой сетью переплетенных костно-остеоидных трабекул различной степени зрелости. У внутренних краев дефекта располагались хаотично расположенные фрагменты поврежденных костных структур, образовавшихся при моделировании дефекта, а также отдельные не связанные между собой очаги новообразованной костной ткани в виде коротких костно-остеоидных трабекул, выступающих внутреннюю поверхность дефекта.

Количественные исследования проводили после уменьшения интенсивности воспалительных процессов — к концу второй недели эксперимента. Установлено, что объемная плотность костной ткани в дефекте и индекс компактности регенерата через 14 сут после операции в группе контрольных животных составляли около 30% ($p < 0,001$) показателей неповрежденного метафиза (табл. 1).

В экспериментальной группе животных через 7 и 14 сут после операции в периостальной зоне дефекта вокруг нитей и ячеек имплантата формировалась тонкая мембраноподобная оболочка из неоформленной соединительной ткани, которая была образована волнообразно извитыми плоскими пучками плотно переплетенных коллагеновых волокон, ориентированных в различных направлениях (рис. 2, а). Формирование оболочки начиналось на поверхности нити в местах ее переплетений и распространялось от периферии ячеек к их центру. Оболочка имела слоистое строение. Внутренний слой состоял из плотной оформленной соединительной ткани. Коллагеновые волокна были собраны в плотные, циркулярно ориентированные шнуровидные пучки и в форме муфты оплетали нити имплантата, были жестко фиксированы к их микропористой поверхности, врастали в просветы между ними и обеспечивали фиксацию нитей имплантата между собой и в дефекте кости (рис. 2, б). Наружный слой оболочки был образован плотной неоформлен-

Таблица 1

Характеристика костной ткани в полостном дефекте метафиза в контрольной и экспериментальной группах животных и в неповрежденном метафизе контралатеральной конечности ($M \pm m$)

Показатели	Срок эксперимента, сут						Неповрежденный метафиз
	14		30		60		
	Контроль	Эксперимент	Контроль	Эксперимент	Контроль	Эксперимент	
Объемная плотность костной ткани, %	8,44 \pm 0,38	12,17 \pm 0,61*	13,54 \pm 0,68	19,76 \pm 0,96*	15,02 \pm 0,74	22,98 \pm 1,09*	25,07 \pm 1,21
Индекс компактности	0,09 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01**	0,16 \pm 0,01	0,25 \pm 0,02**	0,18 \pm 0,01	0,30 \pm 0,02**	0,33 \pm 0,02

Примечание. Статистическая значимость межгрупповых различий: * — $p < 0,001$; ** — $p < 0,01$.

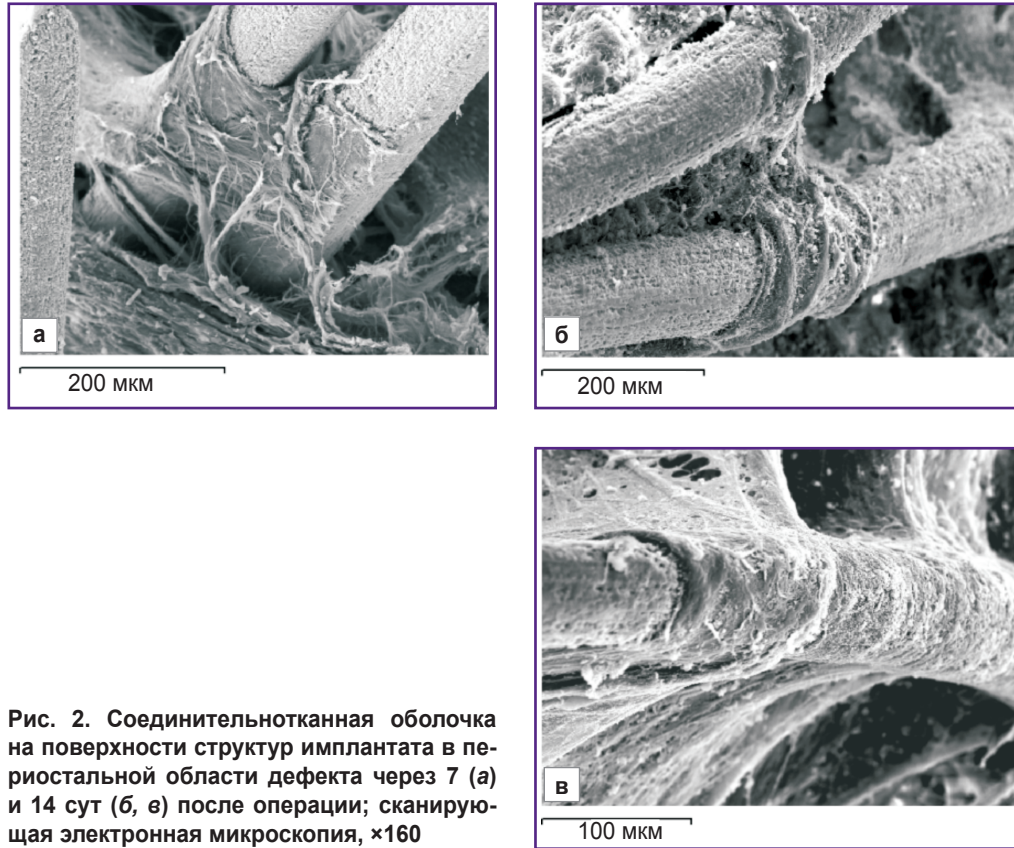


Рис. 2. Соединительнотканная оболочка на поверхности структур имплантата в периостальной области дефекта через 7 (а) и 14 сут (б, в) после операции; сканирующая электронная микроскопия, $\times 160$

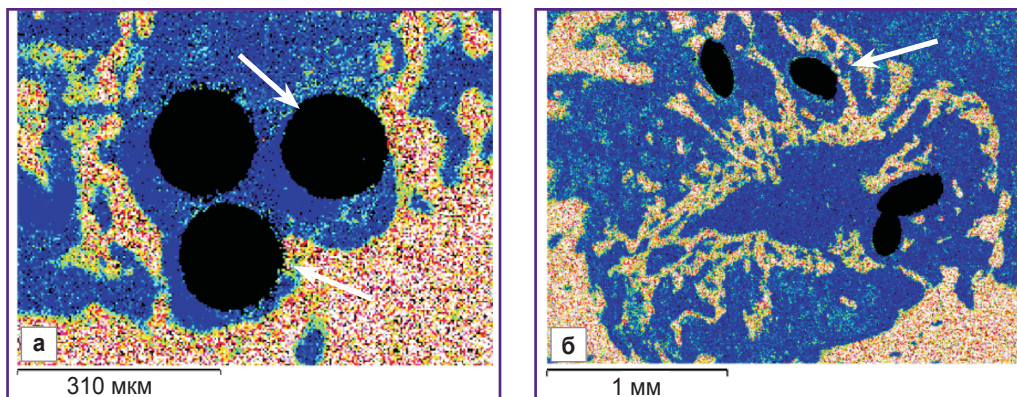
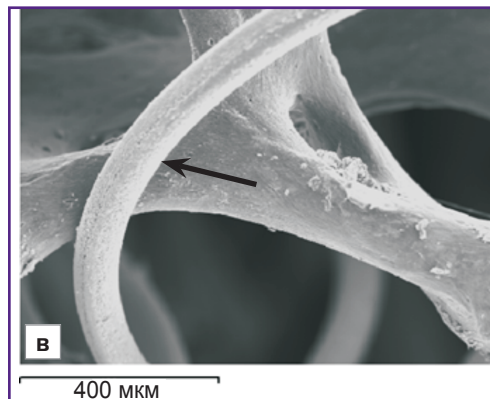


Рис. 3. Направленный репаративный остеогенез в дефекте метафиза через 7 (а) и 14 сут (б, в) после операции:
а, б — карты рентгеновского электронно-зондового микроанализа, изображения в характеристическом рентгеновском излучении атомов кальция; в — сканирующая электронная микроскопия (органические компоненты удалены 6% раствором гипохлорита натрия); стрелками отмечены участки остеоинтеграции; а — $\times 100$; б — $\times 25$; в — $\times 70$



ной соединительной тканью, тонкие плоские пучки коллагеновых волокон которой располагались мелкоячеистой сетью в различных направлениях между шнуровидными пучками каркаса внутреннего слоя и были связаны с окружающими костными и мягкоткаными структурами (рис. 2, в). Под соединительнотканной оболочкой в эндостальной и центральной зонах дефекта и по его краям вокруг структур имплантата и на их поверхности определялись области активного аппозиционного костеобразования. Непосредственно на поверхности нитей имплантата формировался

слой ретикулофиброзной костной ткани толщиной 300–400 мкм, образуя плотное остеоинтегративное соединение (рис. 3, а). Нити имплантата покрывались минерализующимся костным матриксом в участках остеоинтеграции. Новообразованные трабекулы врастали в мелкоячеистую структуру имплантата (рис. 3, б, в).

Результаты количественных исследований (см. табл. 1) свидетельствовали о значительной активизации репаративного костеобразования и увеличении степени зрелости новообразованной костной ткани в

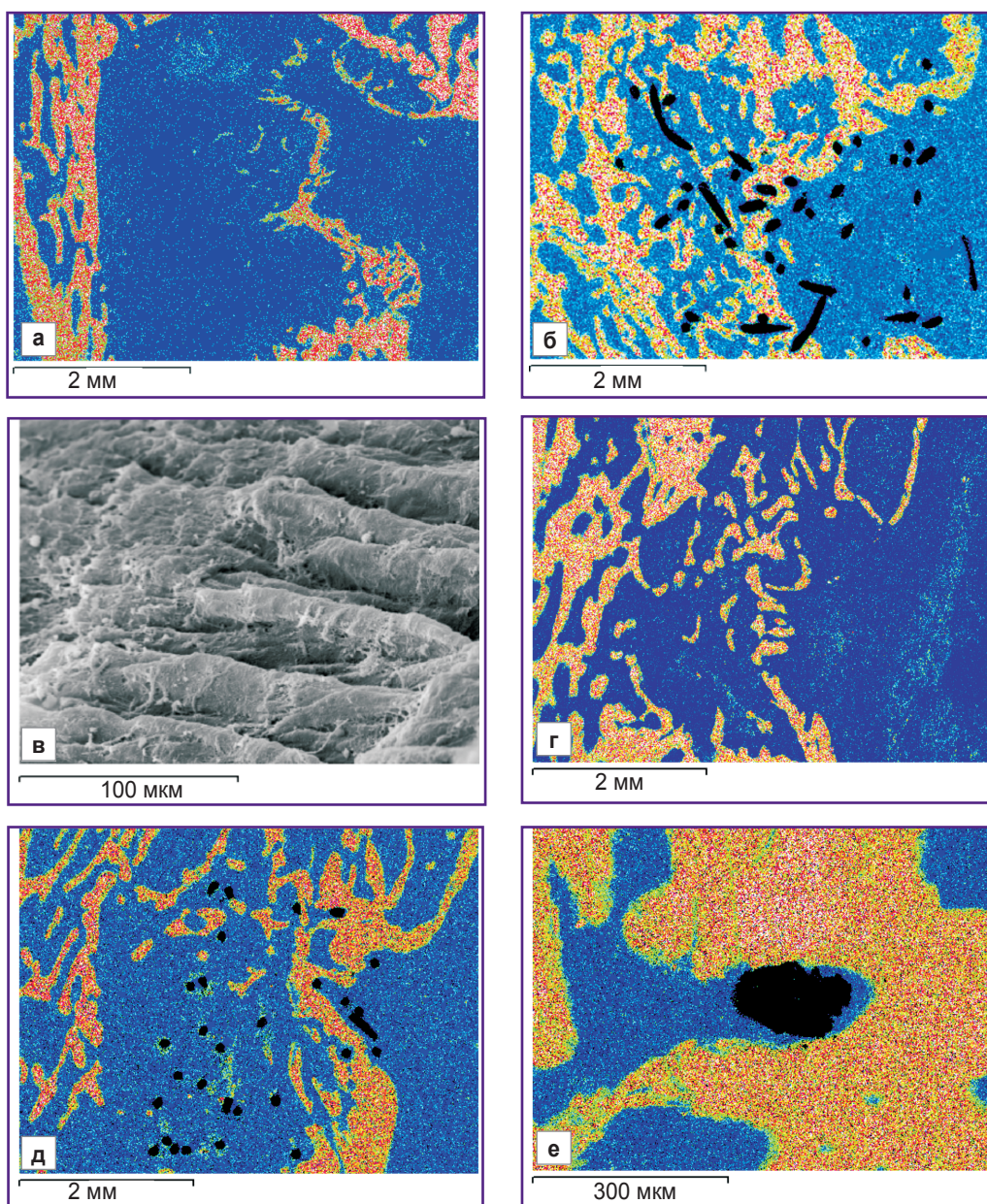


Рис. 4. Замещение дефекта метафиза через 30 (а, б, в) и 60 сут (г, д, е) после операции в контрольной (а, г) и экспериментальной (б, в, д, е) группах животных: а, б, г, д, е — карты рентгеновского электронно-зондового микроанализа, изображения в характеристическом рентгеновском излучении атомов кальция; а, б, г, д — $\times 20$; е — $\times 40$; в — сканирующая электронная микроскопия, $\times 500$

регенератах животных экспериментальной группы по сравнению с контрольной. Так, объемная плотность костной ткани в дефекте составляла 144,19%, а индекс компактности — 155,56% по сравнению с показателями в контрольной группе животных ($p < 0,001$) (см. табл. 1).

Через 30–60 сут после операции в контрольной группе животных дефект был замещен регенератом с преобладанием слабо минерализованной плотной неоформленной соединительной ткани, прорастающей с периостальной поверхности (рис. 4, а, в). Оперированная зона метафиза приобретала ярко выраженную конусовидную форму. В периостальной зоне регенерата преобладала слабо кальцифицированная плотная соединительная ткань. Мелкоячеистые костные структуры периостального регенерата сливались с новообразованными трабекулами эндоста, дугообразно врастали в центральную зону дефекта и формировали тонкий серповидный слой новообразованной кортикальной кости. Очаги остеогенеза наблюдали в центральных и краевых зонах дефекта, где выявлялись участки остеоида и фрагменты слабо минерализованных ретикулофиброзных костных трабекул, изолированных друг от друга широкими прослойками рыхлой соединительной ткани с полостями, заполненными лимфоцитарными и макрофагальными элементами.

Объемная плотность костной ткани в дефекте, индекс компактности регенерата, содержание кальция и фосфора составляли 50–60% показателей неповрежденного метафиза ($p < 0,001$) (табл. 1, 2).

В экспериментальной группе животных через 30–60 сут после операции область костного дефекта была замещена регенератом, в котором преобладала губчатая кость (рис. 4, б, д). Был сформирован новообразованный участок кортикального слоя, представленный компактной костью пластинчатого строения. На периостальной поверхности дефекта вокруг имплантата располагались пучки коллагеновых волокон плотной соединительной ткани защитной оболочки, формирующие сплетения по типу деревенской изгороди (рис. 4, в). Нити имплантата были окружены остеоидом или полностью обрастали новообразованной костной тканью, образуя композит — армированную никелид-титаном компактную кость (рис. 4, е). Объемная плотность костной ткани, индекс компактности и степень минерализации регенерата были несколько меньше по сравнению с показателями неповрежденного метафиза, но к концу эксперимента эти отличия не являлись статистически значимыми, вместе с тем они были более чем в полтора раза больше ($p < 0,001$) показателей в контрольной группе животных (см. табл. 1, 2).

Результаты проведенного исследования показали, что в периостальной области дефекта на поверхности имплантата формируется слой плотной соединительной ткани, который выполняет функцию биологического защитного барьера и препятствует прорастанию

Т а б л и ц а 2

Содержание остеотропных химических элементов в регенерате, формирующемся в полостном дефекте метафиза, в контрольной и экспериментальной группах животных через 60 сут после операции и в неповрежденном метафизе контралатеральной конечности, % ($M \pm m$)

Элементы	Контроль	Эксперимент	Неповрежденный метафиз
Натрий	0,41±0,02	0,44±0,02	0,40±0,02
Магний	0,22±0,01	0,25±0,01	0,22±0,01
Фосфор	1,93±0,04	2,94±0,13*	3,22±0,15
Сера	0,23±0,01	0,30±0,02**	0,22±0,01
Кальций	3,85±0,16	5,89±0,26*	6,44±0,31

П р и м е ч а н и е. Статистическая значимость межгрупповых различий: * — $p < 0,001$; ** — $p < 0,05$.

параоссальной соединительной ткани. При этом возмещение дефекта осуществляется губчатой костью, объемная плотность которой на всех этапах эксперимента более чем в полтора раза превышала контрольные показатели, а ее минеральный состав к концу эксперимента приближался к показателям губчатой кости неповрежденного метафиза. Репаративное костеобразование осуществляется по типу прямого интрамембранного и аппозиционного остеогенеза. Ни в одном из случаев не наблюдалось признаков воспалительного процесса, что подтверждает полученные нами ранее данные [8–10]. Микропористая структура поверхностного слоя нитей имплантата облегчает адгезию остеобластов, остеоинтеграцию и остеоиндуктивные свойства. Благодаря капиллярным свойствам имплантата происходит адсорбция эндогенных костных морфогенетических белков, функциональная активность которых обеспечивает остеоиндуктивность имплантата [12].

Заключение. Имплантат из сетчатых конструкций никелида титана обладает хорошей биосовместимостью, остеоиндуктивными, остеоиндуктивными и остеопластическими свойствами, купирует воспалительный процесс и может с успехом применяться для замещения объемных полостных дефектов костей.

Финансирование исследования. Работа выполнена в рамках утвержденной темы НИР.

Конфликт интересов. Авторы данной статьи подтверждают отсутствие конфликта интересов.

Литература/References

1. Liu J., Kerns D.G. Mechanisms of guided bone regeneration: a review. *Open Dent J* 2014; 8(1): 56–65, <https://doi.org/10.2174/1874210601408010056>.
2. Kim J.-Y., Yang B.-E., Ahn J.-H., Park S.O., Shim H.-W. Comparable efficacy of silk fibroin with the collagen membranes for guided bone regeneration in rat calvarial

defects. *J Adv Prosthodont* 2014; 6(6): 539, <https://doi.org/10.4047/jap.2014.6.6.539>.

3. Jung R.E., Fenner N., Hämmerle C.H.F., Zitzmann N.U. Long-term outcome of implants placed with guided bone regeneration (GBR) using resorbable and non-resorbable membranes after 12–14 years. *Clin Oral Implants Res* 2012; 24(10): 1065–107, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2012.02522.x>.

4. Hammerle C.H.F., Jung R.E. Bone augmentation by means of barrier membranes. *Periodontol 2000* 2003; 33(1): 36–53, <https://doi.org/10.1046/j.0906-6713.2003.03304.x>.

5. Karring T., Nyman S., Gottlow J., Laurell L. Development of the biological concept of guided tissue regeneration — animal and human studies. *Periodontol 2000* 1993; 1(1): 26–35, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1993.tb00204.x>.

6. Schmidmaier G., Baehr K., Mohr S., Kretschmar M., Beck S., Wildemann B. Biodegradable polylactide membranes for bone defect coverage: biocompatibility testing, radiological and histological evaluation in a sheep model. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17(4): 439–444, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2005.01242.x>.

7. van Leeuwen A.C., Huddleston Slater J.J.R., Gielkens P.F.M., de Jong J.R., Grijpma D.W., Bos R.R.M. Guided bone regeneration in rat mandibular defects using resorbable poly(trimethylene carbonate) barrier membranes.

Acta Biomater 2012; 8(4): 1422–1429, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.12.004>.

8. Ирьянов Ю.М., Ирьянова Т.Ю. Замещение дефекта кости в условиях чрескостного остеосинтеза и применения имплантата из никелида титана. *Морфология* 2012; 142(4): 83–86. Iryanov Yu.M., Iryanova T.Yu. Bone defect replacement under conditions of transosseous osteosynthesis and titanium nickelide implant application. *Morfologiya* 2012; 142(4): 83–86.

9. Iriyanov Y.M., Chernov V.F., Radchenko S.A., Chernov A.V. Plastic efficiency of different implants used for repair of soft and bone tissue defects. *Bull Exp Biol Med* 2013; 155(4): 518–521, <https://doi.org/10.1007/s10517-013-2191-4>.

10. Irianov I.M., Diuriagina O.V., Karaseva T.I., Karasev E.A. The osteoplastic effectiveness of the implants made of mesh titanium nickelide constructs. *Bosn J Basic Med Sci* 2014; 14(1): 4–7.

11. Ирьянов Ю.М., Ирьянова Т.Ю. Имплантат для замещения дефекта кости. Патент РФ 111759, МПК: А61F2/28. 2011. Iryanov Y.M., Iryanova T.Y. *Implantat dlya zameshcheniya defekta kosti* [The implant to replace bone defect]. RF Patent 111759, МПК: А61F2/28. 2011.

12. Uebersax L., Hagenmüller H., Hofmann S., Gruenblatt E., Müller R., Vunjaknovakovic G., Kaplan D.L., Merkle H.P., Meinel L. Effect of scaffold design on bone morphology in vitro. *Tissue Eng* 2006; 12(12): 3417–3429, <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.3417>.