

УДК 616.718.4-089.844:615.477-036]-092.9:599.323.452(045)

Морфологічні особливості загоєння експериментального дефекту коркового шару довгої кістки за умов імплантації β-трикальційфосфату

О. В. Кореньков

Медичний інститут Сумського державного університету. Україна

Objective: To compare the healing process in the defect of compact bone tissue after implantation of osteoplastic material ChronOS™ with restoration of unfilled defect. Methods: An experiment was conducted on 24 white male rats. In the middle third of the femoral shaft we created hole defect with 2.5 mm diameter toward the medullary canal, and we left it unfilled (control, group I) or filled with osteoplastic material ChronOS™ (group II). Fragments of injured bones were examined after 15 and 30 days by means of methods of light microscopy with morphometry and scanning electron microscopy. Results: It was found that the material ChronOS™ did not induce any inflammatory response, and in the implantation area adjacent to the maternal bone there were gaps with typical osteocytes, and in micropores of ChronOs™ - osteogenic cells with small foci of osteogenesis suggesting the biocompatibility and osteotropism of this material. In all terms of observation there were revealed some signs of just desmal osteogenesis which indicates the presence in defects of bone and connective tissue in both groups of the animals on. Bone tissue of regenerate in the control group presented with large and small loop meshwork of trabecular bone. In group II animals the newly formed bone tissue repeated the shape of pores of the implant has and contained a large amount of osteoblasts and osteocytes. On the 30th day in defects of animals of both groups we found areas of bone tissue approaching in structure to maternal bone. Material ChronOs™ subjected to resorption and replaced by bone and connective tissues. Their relationship on the 15th day of the experiment was $(39,75 \pm 2,85) / (41,1 \pm 1,87) / (19,14 \pm 1,2)\%$, on the 30th day - $(26,67 \pm 1,15) / (54,53 \pm 2,6) / (18,8 \pm 0,8)\%$. Key words: ChronOS™, β-tricalcium phosphate, reparative osteogenesis.

Цель: сравнить процесс заживления дефекта компактной костной ткани после имплантации остеопластического материала chronOS™ с восстановлением незаполненного дефекта. Методы: эксперимент проведен на 24 белых крысах-самцах. В средней трети диафиза бедренной кости создавали дырчатый дефект диаметром 2,5 мм до костномозгового канала и оставляли незаполненным (контроль, группа I) или заполняли остеопластическим материалом chronOS™ (группа II). Фрагменты травмированных костей исследовали на 15 и 30-е сутки методами световой микроскопии с морфометрией и растровой электронной микроскопии. Результаты: установлено, что материал chronOS™ не вызывал воспалительной реакции, в прилежащей к месту имплантации материнской кости располагались лакуны с типичными остеоцитами, а в микропорах chronOs™ — остеогенные клетки с небольшими очагами остеогенеза, что свидетельствует о биосовместимости и остеотропности материала. На всех сроках наблюдения выявлены признаки только десмального остеогенеза, на что указывает наличие в дефектах животных обеих групп костной и соединительной тканей. Костная ткань регенерата у животных контрольной группы представлена крупно- и мелкопетлистыми сетчатыми структурами из костных трабекул. У животных группы II новообразованная костная ткань повторяла форму пор имплантата и содержала большое количество остеобластов и остеоцитов. На 30-е сутки в дефектах животных обеих групп обнаружены участки костной ткани, приближающиеся по строению к материнской кости. Материал chronOs™ подвергался резорбции и замещался костной и соединительной тканями. Их соотношение на 15-е сутки эксперимента составило $(39,75 \pm 2,85) / (41,11 \pm 1,87) / (19,14 \pm 1,2) \%$, на 30-е — $(26,67 \pm 1,15) / (54,53 \pm 2,6) / (18,8 \pm 0,8) \%$. Ключевые слова: chronOS™, β-трикальцийфосфат, репаративный остеогенез.

Ключові слова: chronOS™, β-трикальційфосфат, репаративний остеогенез

Вступ

Через схожість хімічної будови з кістковою тканиною та біологічну інертність остеопластичний

матеріал chronOS™ (β-трикальційфосфат) широко використовують для оптимізації репаративного остеогенезу. Матеріал продемонстрував виключно

біосумісність і чудові характеристики для заміщення кісткових дефектів у травматології, хірургії хребта і стоматології [1, 4, 6, 9–11]. Позитивний вплив chronOS™ на загоєння кісткових дефектів у губчастих кістках виявлений здебільшого за допомогою гістологічних досліджень. Результатів мікроскопічного дослідження впливу chronOS™ на загоєння дефекту компактною кістковою тканиною з порівняльним аналізом його відновлення під кров'яним згустком у науковій літературі ми не виявили [4, 6, 9, 13]. Крім того, більшість робіт, присвячених вивченню chronOS™, стосується морфологічних досліджень, в яких не вистачає морфометричних характеристик гістологічних препаратів і мікроскопічної та особливо електронно-мікроскопічної характеристики тканиноспецифічних структур регенерату [6, 7, 8, 12]. Тому *метою нашої роботи* було дослідити процес загоєння дефекту компактною кістковою тканиною після імплантації остеопластичного матеріалу chronOS™ і порівняти його з відновленням дефекту під кров'яним згустком за допомогою гістологічного, морфометричного та електронно-мікроскопічного методів.

Матеріал та методи

Експеримент проведений на 24 білих лабораторних щурах-самцях 8-місячного віку масою (250 ± 10) г. Під кетаміновим ($0,3\text{--}0,5$ мл/1 кг маси тіла) наркозом у середній третині діафіза стегнової кістки за допомогою портативної бормашини кулеподібною фрезою на малих обертах з охолодженням відтворювали дефект діаметром 2,5 мм до кістково-мозкового каналу. Тварин поділили на дві групи:

I (12 щурів) — контрольна (порівняльна), кістковий дефект залишали загоюватися під кров'яним згустком;

II (12 щурів) — експериментальна, дефект без жорсткої фіксації заповнювали остеопластичним матеріалом chronOS™ (Synthes, Швейцарія, реєстраційний номер ФС 2006/147). Він являє собою чистий β -трикальційфосфат у вигляді блоку із загальною пористістю 70 %, розмір макропор від 100 до 500 мкм і мікропор до 10 мкм (рис. 1). Перед імплантацією блоки chronOS™ змочували власною кров'ю щура (брали з хвостової вени) для заповнення пор і видалення залишків повітря з матеріалу, а також для забезпечення необхідної консистенції, яка давала змогу легко різати матеріал скальпелем і таким чином моделювати його за формою дефекту [11].

Через 15 і 30 днів після операції тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під глибоким ефірним наркозом із подальшим дослідженням трав-

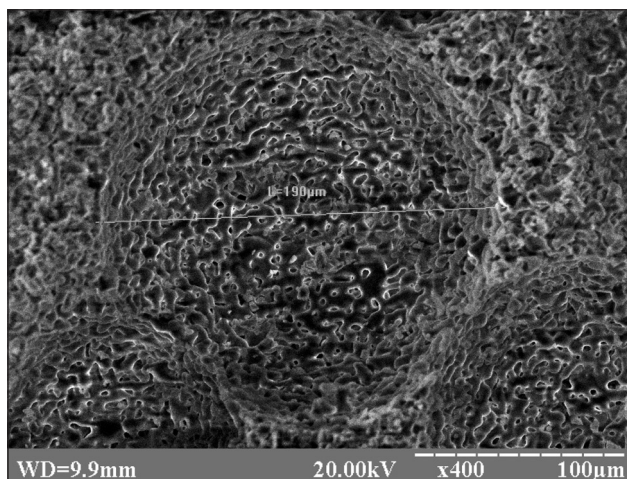


Рис. 1. Структура остеопластичного матеріалу chronOS™. Макропора розміром 190 мкм. Електронна сканограма. 36. 400

мованих кісток методами світлової (із морфометрією) і растрової електронної мікроскопії, яку виконували на електронному мікроскопі «РЭМ 106-И». Гістологічні зрізи, забарвлені гематоксилином та еозином, аналізували у світловому мікроскопі, фотографували за допомогою цифрової фотокамери. Морфометричний аналіз здійснювали з використанням програм обробки зображень «Відео-Тест» і «Відео-Розмір» [5]: визначали в ділянці дефекту відносний відсоток кісткової, фіброретикулярної, сполучної тканин і залишків остеопластичного матеріалу як відношення площ зазначених компонентів (%) до загальної площі ділянки дефекту (100 %). Крім цього, досліджували стан структури прилеглої до місця імплантації материнської кістки з метою встановлення або спростування післяопераційних ускладнень через наявність або відсутність у її складі ознак некробіозу і некрозу остеоцитів [2]. Отримані цифрові величини обробляли статистично з обчисленням середнього арифметичного (M) і його стандартної похибки (m). Значущість відмінностей між порівнюваними показниками оцінювали за допомогою t -критерію Стьюдента з використанням статистичної комп'ютерної програми MS Excel XP. Відмінності вважали значущими за $p < 0,05$ [3].

Результати та їх обговорення

У тварин контрольної групи на 15-у добу експерименту в ділянці дефекту виявлений регенерат, який складався з ($47,66 \pm 2,3$) % ретикулофіброзної та ($52,34 \pm 2,3$) % фіброретикулярної тканини. Губчаста кісткова тканина була представлена кістковими трабекулами, які утворювали дрібно- і великопетлясті сітчасті структури з численними остеобластами та остеоцитами. Міжтрабекулярний простір заповнювала фіброретикулярна тканина,

яка містила фібробласти, колагенові волокна і судини. Материнська кістка характеризувалася наявністю поодиноких порожніх остеоцитарних лакун, які перемежувалися зі збереженими клітинами (рис. 2).

У тварин II групи на 15-у добу в ділянці дефекту між chronOS™ і материнською кісткою розташовувався тонкий прошарок фіброретикулярної або ретикулофіброзної тканини, який щільно контактував з імплантатом. Сполучна і кісткова тканини регенерату утворювалися не тільки на зовнішній поверхні остеопластичного матеріалу, але й у порах периферійного і центрального його відділів. При цьому кісткова тканина займала переважну площу дефекту — $(41,11 \pm 1,87)$ проти $(47,66 \pm 2,3)$ % у контролі. Новоутворена кісткова тканина розташовувалася безпосередньо на зовнішній поверхні chronOS™ та була представлена сітчастими структурами з кісткових трабекул, за формою і розміром повторювала пори імплантата і містила численні остеобласти й остецити. У деяких місцях пори керамічного матеріалу округлої форми були повністю заповнені кістковою тканиною, в інших вона займала тільки периферійні відділи, а в центральній частині пори розташовувалася остеїд або фіброретикулярна тканина (рис. 3). У складі остеїду виявляли остеогенні клітини, преостеобласти/остеобласти, а також колагенові волокна, які проростали в мікропори імплантата (рис. 4). Фіброретикулярна тканина була побудована з фібробластів, колагенових волокон і судин та займала $(19,14 \pm 1,2)$ % (проти $(52,34 \pm 2,3)$ % у контролі) від всієї площі дефекту. Вона містилася в міжтрабекулярних просторах кісткової тканини регенерату, порах, а також безпосередньо на поверхні периферійного і центрального відділу остеопластичного матеріалу. Останній на гістопрепаратах, забарвлених гематоксиліном та еозином, мав світлий (сірий) колір, займав $(39,75 \pm 2,85)$ % від всієї площі дефекту і містив у своїй вільній від кісткової та сполучної тканин частині остеогенні клітини з вогнищами остеогенезу, безклітинну речовину, колагенові волокна і судини. Треба зазначити, що в ділянці дефекту на 15-у добу експерименту ознак асептичного запалення не виявлено, а материнська кістка містила типові остецити з відростками, які розташовувалися в кісткових лакунах.

На 30-у добу експерименту в ділянці дефекту кісток тварин контрольної групи визначали пластинчасту і грубоволокнисту кісткову тканину загальною площею $(75,9 \pm 2,72)$ % на $59,33$ % більшою, ніж на 15-у добу експерименту. Решту площі дефекту заповнював кістковий мозок. Пластинчаста кісткова тканина за будовою наближалася до мате-

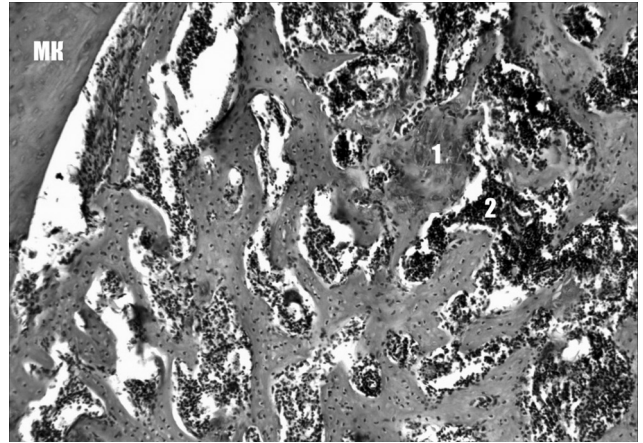


Рис. 2. Мікрофото. Ділянка дефекту стегнової кістки щура контрольної групи на 15-у добу після нанесення дефекту. Новоутворена губчаста кісткова тканина (1) на межі з материнською кісткою (МК). Червоний кістковий мозок (2) у міжтрабекулярному просторі. Гематоксилін та еозин. $\times 36$. 100

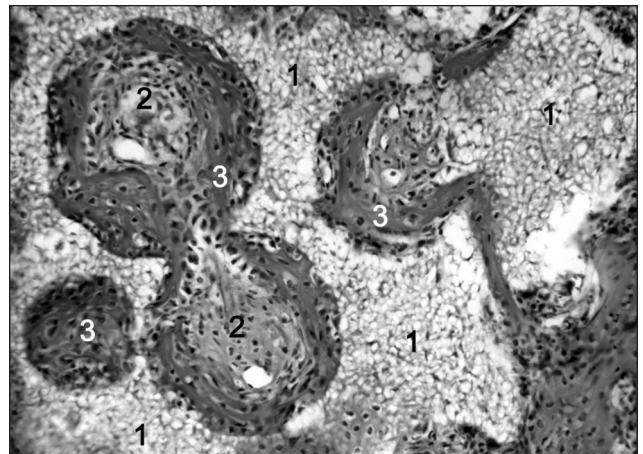


Рис. 3. Мікрофото. Ділянка дефекту стегнової кістки щура на 15-у добу після імплантації chronOS™. Остеопластичний матеріал (1), в порах якого утворився остеїд (2) і кісткова тканина (3). Гематоксилін та еозин. $\times 36$. 200

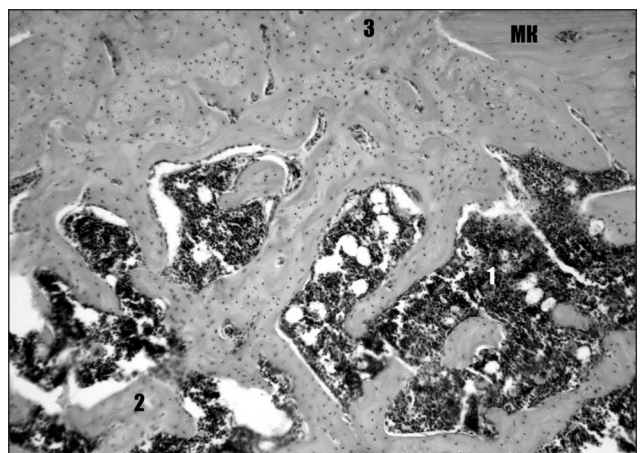


Рис. 4. Мікрофото. Ділянка дефекту стегнової кістки щура контрольної групи на 30-у добу після нанесення дефекту. Кістковий мозок (1) у міжтрабекулярному просторі кісткової тканини (2). Пластинчаста кісткова тканина регенерату (3), материнська кістка (МК). Гематоксилін та еозин. $\times 36$. 100

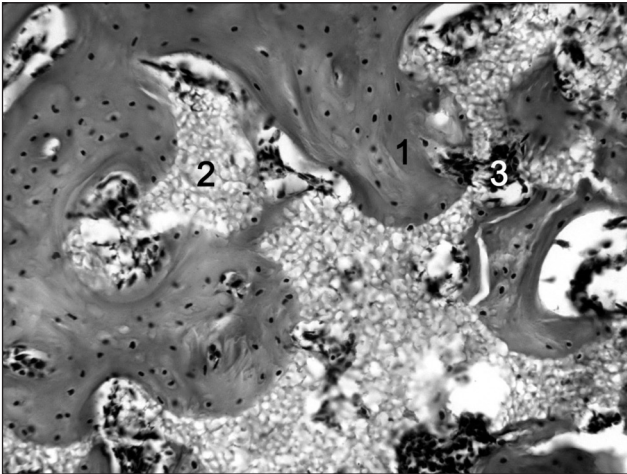


Рис. 5. Мікрофото. Ділянка дефекту стегнової кістки щура на 30-у добу після імплантації chronOS™. Специфічні округлі новоутворення кісткової тканини (1) із залишками остеопластичного матеріалу (2) і фіброретикулярною тканиною (3) між ними. Гематоксилін та еозин. Зб. 200

ринської, у ній виявлені остеобласти, остеоцити і сформовані остеони. Однак переважно в дефекті відмічені великі трабекули грубоволокнистої кісткової тканини з кістковим мозком у трабекулярних просторах (рис. 4).

У тварин експериментальної групи на 30-у добу експерименту більша частина остеопластичного матеріалу chronOS™ розташовувалася в центральній ділянці дефекту. Кісткова тканина переважала в периферійних відділах дефекту та мала переважно пластинчасту будову. Тобто в цей термін спостереження між остеопластичним матеріалом і материнською кісткою містилася вже тільки кісткова тканина з остеобластами та остеоцитами. Площа останньої порівняно з 15-ю добою експерименту збільшилася на 32,67 % і становила $(54,53 \pm 2,6) \%$ ($p < 0,05$), але це було на 28,15 % менше, ніж у контролі. Крім цього, кісткова тканина регенерату, переважно в периферійній частині дефекту, була представлена суцільними полями із сформованими остеонами і без залишків імплантата. У центральних відділах дефекту кісткова тканина регенерату зі значною кількістю остеобластів і остеоцитів відповідно до пор керамічного матеріалу мала вигляд специфічних округлих новоутворень, між якими містилися залишки остеопластичного матеріалу з остеогенними клітинами і невелика кількість фіброретикулярної тканини (рис. 5, 6). Вона побудована з фібробластів, колагенових волокон, судин і безпосередньо контактувала зі сформованою кістковою тканиною та остеопластичним матеріалом. Площа сполучної тканини та остеопластичного матеріалу порівняно з 15-ю добою експерименту зменшилася на 1,77 % ($p > 0,05$) і 32,92 %

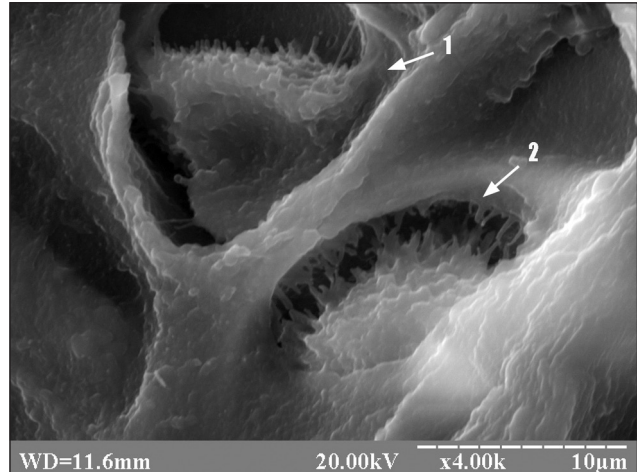


Рис. 6. Електронна сканограма. Ділянка дефекту стегнової кістки щура на 30-у добу після імплантації chronOS™. Остеобласт (1) і остеоцит (2) у лакунах сформованої кісткової тканини, яка утворилася у макропорі остеопластичного матеріалу. Зб. 4000

($p < 0,05$) та становила $(18,8 \pm 0,8) \%$ в першому і $(26,67 \pm 1,15) \%$ у другому випадку.

Висновки

Остеопластичний матеріал chronOS™ має високу біосумісність, про що свідчить відсутність у ділянці дефекту запальної реакції і наявність у прилеглий до місця імплантації материнській кістці лакун із типовими остеоцитами без ознак їх некробіозу і некрозу. У мікропорах chronOS™ виявляються остеогенні клітини і невеликі вогнища остеогенезу, що вказує на високу тропність кісткових клітин до остеопластичного матеріалу.

На всіх етапах спостереження відмічено ознаки тільки десмального остеогенезу, про що свідчить наявність у ділянці дефекту тварин експериментальної групи сполучної, кісткової тканини з інтегрованими в їх структури залишками остеопластичного матеріалу, а у тварин контрольної групи — кісткової та сполучної тканини на 15-у і кісткової тканини з елементами кісткового мозку — на 30-у добу експерименту.

Кісткова тканина регенерату з високою кількістю остеогенних клітин, остеобластів, остеоцитів на всіх етапах спостереження у тварин контрольної групи була представлена кістковими трабекулами, які утворювали велико- і дрібнопетлясті сітчасті структури, а у тварин експериментальної групи — окремими новоутвореннями специфічної округлої форми, які за формою і розмірами є прямими відбитками пор chronOS™, що доводить його остеокондуктивні властивості. На 30-у добу в обох серіях експерименту виявлено ділянки кісткової тканини, схожої за будовою на материнську кістку.

Остеопластичний матеріал поступово резорбувався і заміщувався кістковою та сполучною тканинами, співвідношення їх на 15-ту добу експерименту становило $(39,75 \pm 2,85)$, $(41,11 \pm 1,87)$ і $(19,14 \pm 1,2)$ %, а на 30-у — $(26,67 \pm 1,15)$, $(54,53 \pm 2,6)$ і $(18,8 \pm 0,8)$ %.

Кількість кісткової і сполучної тканини регенерату у тварин експериментальної групи стосовно контролю становила $(41,11 \pm 1,87)$ $(47,66 \pm 2,3)$ і $(19,14 \pm 1,2)$ проти $(52,34 \pm 2,3)$ % на 15-у добу та $(54,53 \pm 2,6)$ до $(75,94 \pm 2,72)$ % і $(18,8 \pm 0,8)$ до 0 % на 30-у добу експерименту відповідно.

Список літератури

1. Арсеньев И. Г. Экспериментально-морфологическое обоснование клинического применения деградируемых биоимплантатов в комплексном лечении переломов и ложных суставов длинных трубчатых костей: дис.... канд. мед. наук: 14.00.22, 14.00.15 / Игорь Геннадьевич Арсеньев. — М., 2007. — 200 с.
2. Григорьян А. С. Проблемы интеграции имплантатов в костную ткань (теоретические аспекты) / А. С. Григорьян, А. К. Топоркова. — М.: Техносфера, 2007. — 128 с.
3. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Губенко, П. Н. Бабич. — Киев: Морион, 2000. — 320 с.
4. Параскевич В. Л. Дентальная имплантология: основы теории и практики / В. Л. Параскевич. — 3-е изд. — М.: ООО «Медицинское информационное агенство», 2011. — 400 с.
5. Саркисов Д. С. Микроскопическая техника / Д. С. Саркисов, Ю. Л. Перов. — М.: Медицина, 1996. — 542 с.
6. Behaviour of ChronOs™ inject in metaphyseal bone defects of distal radius fractures: tissue reaction after 6–15 months / R. Arora, S. Milz, C. Sprecher [et. al.] // *Injury*. — 2012. — Vol. 43 (10) — P. 1683–1688, doi: 10.1016/j.injury.2012.06.006.
7. β -Tricalcium phosphate as a bone substitute for dorsal spinal fusion in adolescent idiopathic scoliosis — preliminary result of a prospective clinical study / M. Muschik, R. Ludwig, S. Halbhubner [et al.] // *Eur. Spine J.* — 2001. — Vol. 10 (2). — P. 178–184.
8. β -TCP bone graft substitutes in a bilateral rabbit tibial defect model / W. R. Walsh, F. Vizesi, D. Michael [et al.] // *Biomaterials*. — 2008. — Vol. 29 (3). — P. 266–271.
9. Pochon J. P. Knochenersatzplastiken mit tricalciumphosphatkeramik im Kindesalter / J. P. Pochon // *Aktuelle Probleme in Chirurgie und Orthopädie*. — 1990. — Vol. 36. — P. 146.
10. Porous tricalcium phosphate and transforming growth factor used for anterior spine surgery / T. Steffen, T. Stoll, T. Arvinte, R. K. Schenk // *Eur. Spine J.* — 2001. — Vol. 10 (Suppl. 2). — P. S132–S140.
11. Stoll T. New aspects in osteoinduction / T. Stoll // *Mat.-wiss. U. Werkstofftech.* — 2004. — Vol. 35 (4). — P. 198–202.
12. Tricalcium phosphate granules or rigid wedge preforms in open wedge high tibial osteotomy: a radiological study with a new evaluation system / W. L. van Hemert, K. Willems, P. G. Anderson [et al.] // *Knee*. — 2004. — Vol. 11 (6). — P. 451–456.
13. Wheeler D. Grafting of massive tibial subchondral bone defects in a caprine model using — tricalcium phosphate versus autograft / D. Wheeler // *J. Orthop. Trauma*. — 2005. — Vol. 19 (2). — P. 85–91.

DOI: <http://dx.doi.org/10.15674/0030-59872015346-50>

Стаття надійшла до редакції 02.03.2015

MORPHOLOGICAL FEATURES OF HEALING IN EXPERIMENTAL CORTICAL LAYER DEFECT OF LONG BONE UPON CONDITION OF B-TRICALCIUM PHOSPHATE IMPLANTATION

O. V. Korenkov

Medical Institute of Sumy State University. Ukraine