

УДК 616.718.4-089.843:615.465Тантал]:616-003.93-092.9(045)

## Морфологічні особливості остеointegraції пористих танталових імплантатів у щурів

Н. В. Дєдх, С. Є. Бондаренко, В. А. Філіпенко, І. О. Батура

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

*Among the metallic materials, porous tantalum attracts growing attention of orthopedics and traumatologists. The purpose of the study is to investigate osseointegration by using a porous tantalum implants in rats with normal bone health and osteoporosis simulated background. Methods: the study was performed in 18 laboratory rats weighing 250–350 g. Osteoporosis modeled in 9 animals with the help of ovariectomy in 3 months prior to implantation. 3 mm diameter defect produced in the distal femoral metaphysis in normal rats (control) and with osteoporosis (experimental), porous tantalum pins implanted. After 14, 30 and 90 days postoperatively the material was examined by using a histology techniques. Results: It was found that the orientation of osteoreparation process was identical for both groups of animals, ie at all stages of monitoring, the formation of bone around the implant. However, in comparison with the control group osteoporosis animals had larger areas of direct contact with the tantalum implant intertrabecular spaces of the bone marrow and the formation of the parent bone connective tissue sections. In control and experimental animals 90 days postoperatively bone tissue formed around the implant was presented collagen type I with a different refraction of collagen fibers. It is proved a good biological compatibility of porous tantalum implants with bone tissue and bone marrow, as well as higher quality of osseointegration. In animals with a normal structure of the bone implant 73.1 % of the perimeter was surrounded by mature bone tissue. In rats with osteoporosis this value was also quite high and amounted to 57.7 %. Conclusions: the study has evidence indicating that tantalum implants can be used in orthopedics and traumatology in patients with normal bone health and osteoporosis. Key words: porous tantalum, bone regeneration, osteoporosis.*

*Среди металлических материалов пористый тантал привлекает все большее внимание ортопедов и травматологов. Цель: исследовать остеointegraцию при использовании имплантатов из пористого тантала у крыс с нормальным состоянием костной ткани и на фоне моделированного остеопороза. Методы: исследование выполнено на 18 белых лабораторных крысах массой 250–350 г. Остеопороз моделировали у 9 животных с помощью овариоэктомии за 3 мес. до имплантации. Дефект диаметром 3 мм воспроизводили в дистальном метафизе бедренной кости крыс с нормальным состоянием костной ткани (контроль) и остеопорозом (опыт) и имплантировали штифты из пористого тантала. Через 14, 30 и 90 дней после операции материал исследовали с помощью методов гистологии. Результаты: установлено, что направленность процесса остеорепарации была идентична в обеих группах животных, т. е. на всех сроках наблюдения отмечено формирование костной ткани вокруг имплантата. Однако у животных с остеопорозом зафиксированы большие по сравнению с контролем площади непосредственного контакта танталового имплантата с костным мозгом межтрабекулярных пространств материнской кости и формирование участков соединительной ткани. У контрольных и опытных животных через 90 сут. после операции сформированная вокруг имплантата костная ткань была представлена коллагеном I типа с разной рефракцией коллагеновых волокон. Доказана хорошая биологическая совместимость имплантатов из пористого тантала с костной тканью и костным мозгом, а также высокие остеointegrативные качества. У животных с нормальным строением кости 73,1 % периметра имплантатов было окружено зрелой костной тканью. У крыс с остеопорозом этот показатель был также достаточно высоким и составил 57,7 %. Выводы: проведенное исследование свидетельствует, что имплантаты из тантала могут быть использованы в ортопедии и травматологии у пациентов с нормальным состоянием костной ткани и с остеопорозом. Ключевые слова: пористый тантал, костная ткань, регенерация, остеопороз.*

**Ключові слова:** пористий тантал, кісткова тканина, регенерація, остеопороз

## Вступ

Традиційними матеріалами для фіксувальних пристроїв та ендопротезів, які використовують в ортопедії та травматології, є метали — титан і його сплави, тантал, цирконій, кобальтові сплави, хромо-нікель-молібденова сталь тощо [5, 6]. Найчастіше застосовують титан і його сплави, проте останнім часом пористий тантал привертає все більше уваги як новий біоматеріал [9, 11, 15, 16]. Його модуль пружності близький до субхондральної та губчастої кістки, що сприяє кращому передаванню навантаження та зниженню стрес-шилдинг синдрому. Тантал має високі стабілізуювальні якості [13]. Ці властивості дають змогу отримати хороші, а іноді й відмінні клінічні результати. Крім того, тантал стійкіший до корозії, ніж титан [14].

Тантал характеризується високою тропністю до кісткової тканини. Виявлено, що на його поверхні в культурі отриманих від плодів людини остеобластів (лінія hFOB) формування міжклітинного матриксу, адгезія та густина прикріплених клітин у 6 разів більші порівняно з титаном [11].

Відомо, що ефективність інтеграції імплантата з кісткою залежить від низки факторів, серед яких найважливішими є: стан кістки реципієнта, умови механічної стабілізації, структура поверхні та якість імплантата [1].

Дослідження, наведені в науковій літературі щодо інтеграції пористого танталу з кісткою, проведені з використанням тварин із нормальною будовою кістки [16].

*Мета роботи:* дослідити остеointegraцію за умов використання імплантатів із пористого танталу в щурів з нормальним станом кісткової тканини та з модельованим остеопорозом.

## Матеріал та методи

Експериментальне дослідження виконано на 18 білих лабораторних щурах (маса 250–350 г) популяції експериментально-біологічної клініки ПХС ім. проф. М. І. Ситенка з дотриманням міжнародних норм та закону України щодо гуманного ставлення до піддослідних тварин [3, 4]. План дослідження затверджений на засіданні локального комітету з біоетики (протокол № 131 від 16.06.2014).

Для моделювання остеопорозу за 3 міс. до імплантації пористого танталу 9 тваринам виконали оваріоектомію [8]. Хірургічне втручання проводили під загальним внутрішньом'язовим знеболюванням (аміназин — 10 мг/кг, кетамін — 50 мг/кг). За допомогою зубного бора (діаметр 3 мм)

у дистальному метафізі стегнової кістки створювали дірчастий дефект, в який імплантували зразки пористого танталу відповідного розміру дефекту. Рани пошарово ушивали.

Тварин виводили з експерименту через 14, 30 та 90 діб після імплантації, що відповідає різним стадіям репаративного остеогенезу. Евтаназію щурів здійснювали шляхом передозування тіопенталу натрію (90 мг/кг, внутрішньочеревинно).

Виділяли фрагмент стегнової кістки з імплантатом і готували до морфологічного дослідження, керуючись рекомендаціями Д. С. Саркісова та Ю. Л. Перова [7]. Після фіксації та декальцинації матеріалу танталові штифти видаляли, а зразки зневоднювали в розчинах етилового спирту збільшувальної міцності (від 60 до 96°) та в суміші етилового спирту з діетиловим ефіром (1:1), заливали в целоїдин. Гістологічні зрізи (товщиною 6–10 мкм) виготовляли на санному мікроскопі «Reichert», забарвлювали гематоксиліном Вейгерта й еозином, пікрофуксином за Ван-Гізеном, а також толуїдиновим синім (рН 2,5). Зрізи досліджували в світловому мікроскопі «Olympus BX63».

Для поляризаційно-оптичного аналізу стану колагену гістологічні зрізи фарбували 0,1 % розчином пікросиріусу червоного (F3BA) [12] й аналізували в поляризаційному мікроскопі «Olympus BX53». Оцінювали колір рефракції: червоний свідчить, що колагенові волокна в складі матриксу кістки товсті, щільно розташовані, містять колаген I типу; жовто-оранжевий відображує тонкі колагенові волокна також із колагеном I типу.

Морфометричне дослідження виконано з використанням програми «CellSensDimension», версія 510 (Olympus Soft Imaging Solution GmbH, 2013). Вимірювали на 5 препаратах по периметру імплантата протяжність кісткової тканини (мкм), що його оточувала. Розрахунок проводили у відсотках від загальної площі тканин навколо імплантата.

Статистичний аналіз отриманих показників здійснено за допомогою програмних пакетів Microsoft Excel. Для визначення відмінностей між групами порівняння застосовували метод Манна-Уїтні. Значущою вважали різницю за умов  $p < 0,05$ .

## Результати та їх обговорення

*Кісткова тканина стегнової кістки щурів після моделювання остеопорозу.* У тварин через 3 міс. після оваріоектомії виявлені характерні

остеопоротичні зміни в губчастій та компактній кісткових тканинах стегнової кістки. Губчаста кісткова тканина, розташована безпосередньо під епіфізарним хрящем, містила одиничні короткі тонкі кісткові трабекули, які не формували сітки (рис. 1, а), що свідчить про зниження кісткової маси. Кісткові трабекули на ділянках були з вираженими деструктивними змінами — лізісом матриксу, мікротріщинами та мікропереломами. Безпосередньо під епіфізарним хрящем зафіксовано порушення енхондрального остеогенезу.

Компактна кісткова тканина була потоншена, у ній виявляли ділянки неперебудованого хрящового матриксу, тріщини та резорбційні порожнини (рис. 1, б).

Виявлені порушення будови компактною та губчастою кісткових тканин стегнової кістки відповідають остеопорозу, що співпадає з поданою в науковій літературі інформацією про розвиток системних змін скелета у щурів [2, 8].

*Дослідження перебудови стегнової кістки в умовах імплантації пористого танталу.* На 14-ту добу в губчастій кістковій тканині по периметру імплантатів із танталу в щурів із нормальною будовою кістки та остеопорозом була розташована новоутворена кісткова тканина у вигляді дрібнопетлястої сітки грубоволокнистих кісткових трабекул та ділянки фіброретикулярної тканини (рис. 2, а, б) із високою густиною клітин фібробластичного та остеобластичного диферонів, а також поодинокі макрофаги. Проте у тварин із модельованим остеопорозом навколо імплантатів ділянки фіброретикулярної тканини були більшими порівняно з контролем. У щурів обох груп міжтрабекулярні простори з новосформованою губчастою кістковою тканиною містили фіброретикулярну тканину з тонкостінними поодинокими судинами. Невеликі осередки детриту виявлені на поверхні імплантатів.

Під час поляризаційно-оптичного дослідження встановлено, що шар кісткової тканини навколо імплантатів був представлений колагеном I типу з більш потовщеними колагеновими волокнами у тварин дослідної серії (рис. 2, в, г).

У материнській кортикової пластинці та кісткових трабекулах біля ділянки імплантації, особливо у тварин із модельованим остеопорозом, відмічено деструктивні зміни (мікротріщини, безклітинні ділянки матриксу та осередки лізису), які можуть відображати наслідки травматичного ушкодження під час формування дефекту для імплантата. Періост на прилеглих до імплан-

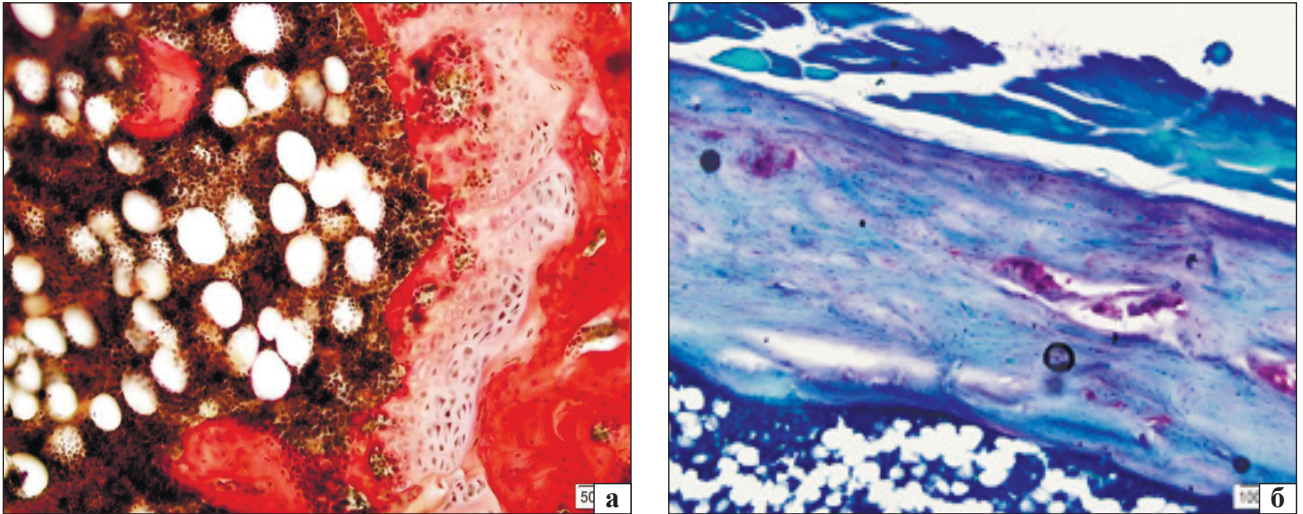
татів ділянках був розширений через формування остеогенного та фіброзного шарів.

На 30-ту добу імплантати в ділянці губчастою кістковою тканиною у тварин із нормальним станом кістки і на фоні остеопорозу були оточені по периметру тонким шаром кісткової тканини з прилеглими кістковими трабекулами різної товщини з високою густиною яскраво забарвлених остеоцитів, активними остеобластами по їхній крайовій поверхні. Проте у тварин із модельованим остеопорозом материнські кісткові трабекули поряд із ділянкою імплантації були тонкими, не з'єднувалися між собою. На невеликих територіях навколо імплантата у тварин з остеопорозом відмічено тонкий шар сполучної тканини, який відокремлював новоутворену кісткову тканину. Також виявлені невеликі вогнища детриту. Коркова пластинка як на межі з імплантатом, так і на віддалені від нього щільно з'єднувалася новоутвореними кістковими трабекулами. У материнській губчастій кістковій тканині поблизу ділянки імплантації деструктивних змін не встановлено, а кістковомозковий канал було заповнено кістковим мозком червоного та жовтого кольору.

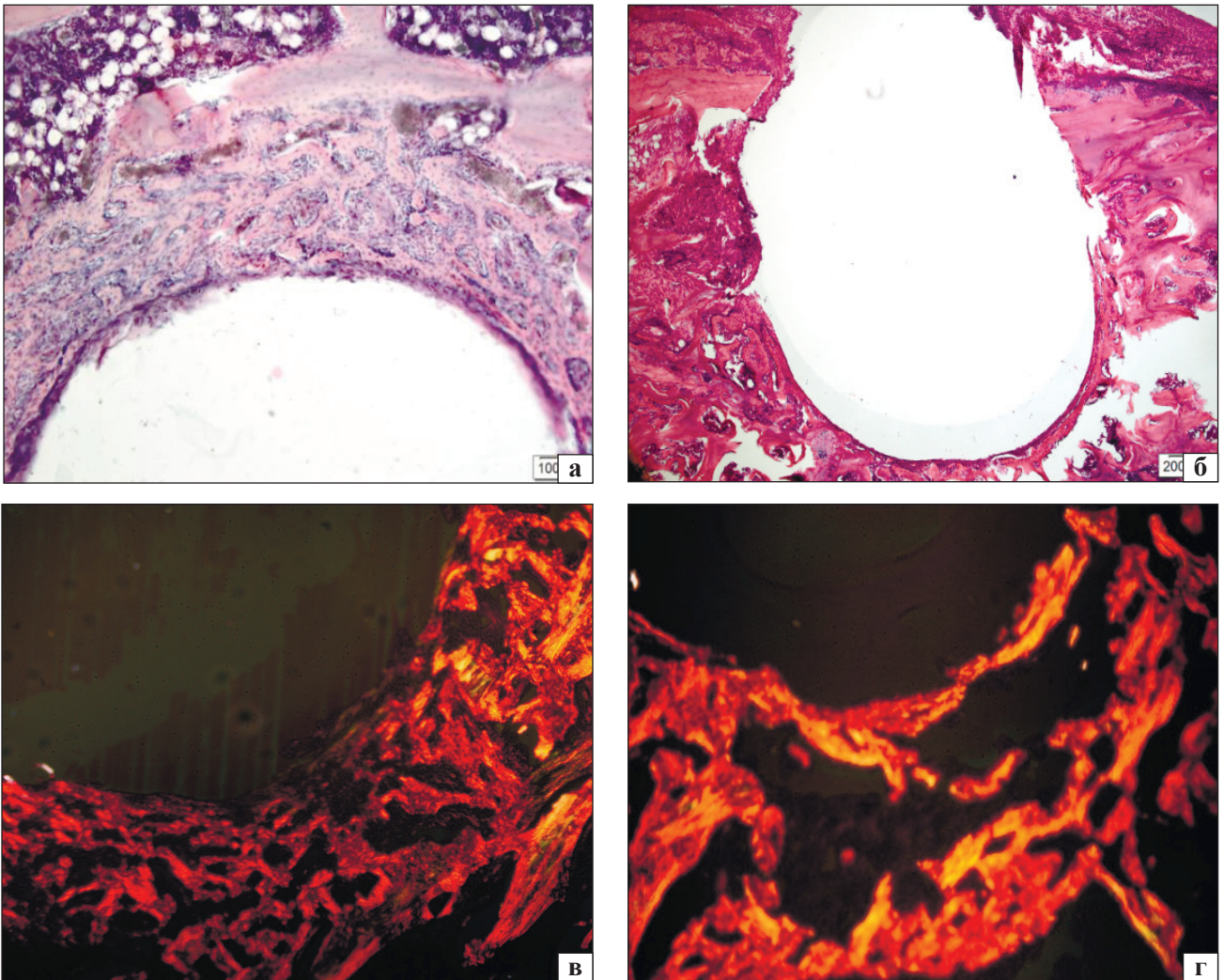
Через 90 днів у тварин із нормальною будовою кістки після вживлення танталових імплантатів навколо них по периметру сформувався вузький шар пластинчастою кістковою тканиною з новоутвореними кістковими трабекулами, які тісно контактували з материнськими та кортексом (рис. 3, а). У кістковій тканині, яка сформувалася на межі кортексу та губчастою кістки, зафіксовано високу густиною остеоцитів. Подекуди виявляли вузький прошарок сполучної тканини. У тварин з остеопорозом навколо імплантата також візуалізували прошарок кісткової тканини, але зберігалися ділянки сполучної тканини, а місцями тантал контактував безпосередньо з кістковим мозком прилеглих міжтрабекулярних просторів (рис. 3, б). Проте кісткові трабекули були потоншені та формували великопетлясту сітку. У тварин обох груп новоутворена кісткова тканина на межі з імплантатом була представлена колагеном I типу з колагеновими волокнами, різними за рефракцією — від червоного до оранжево-жовтого кольору (рис. 3, в, г), що свідчить про їхню неоднакову товщину.

Для доповнення результатів гістологічного аналізу виконано на 90-ту добу морфометричне дослідження щодо оцінювання остеointegraції кісткової тканини з танталовим імплантатом у контрольних та дослідних щурів (таблиця).



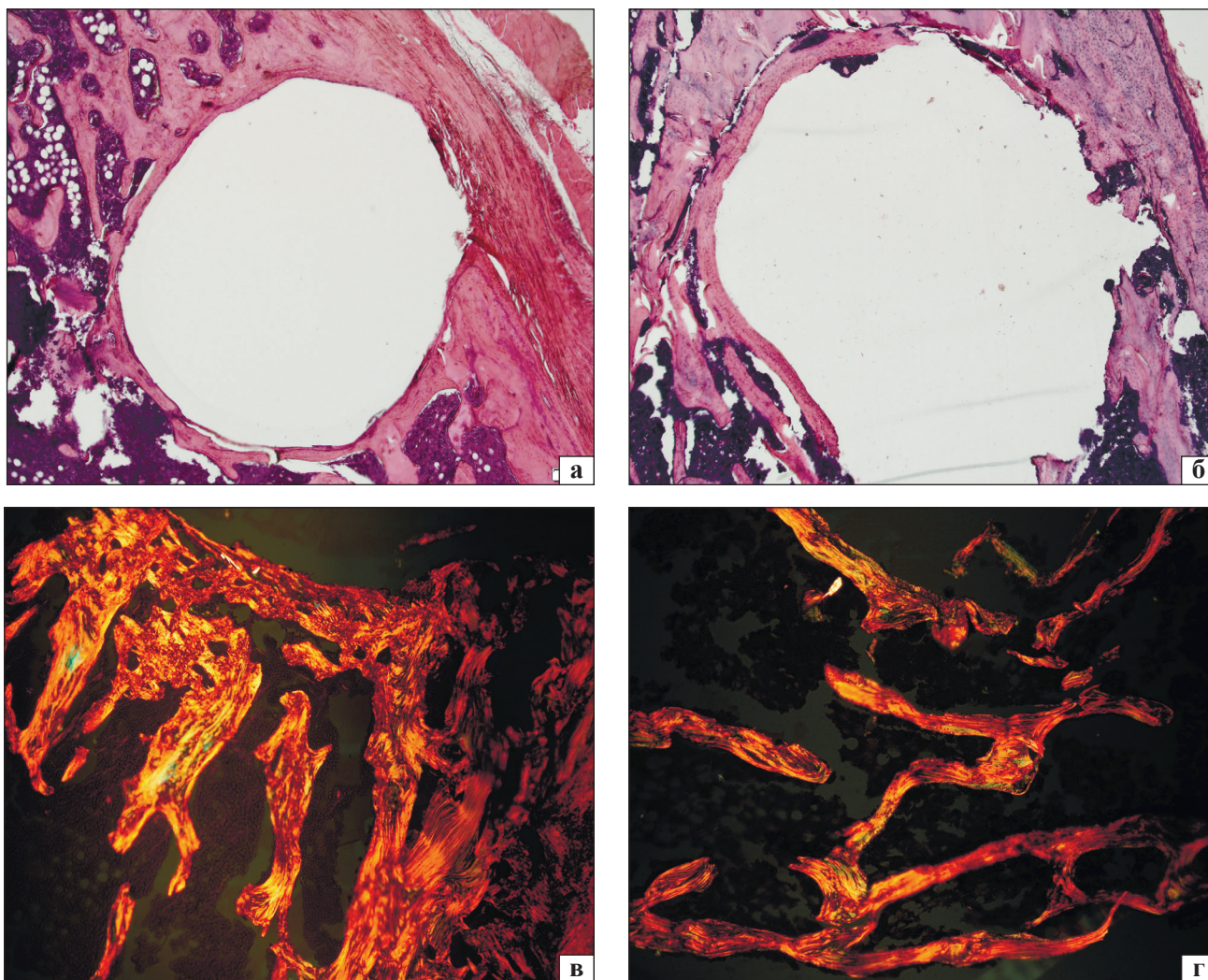


**Рис. 1.** Мікрофото стегнової кістки щура з оваріоектомією, 90-та доба: а) губчаста кісткова тканина, поодинокі фрагментовані кісткові трабекули під епіфізарною пластинкою, пікрофуксин за Ван-Гізеном, зб. 200; б) осередки порушення енхондрального остеогенезу, вогнища лізису, тріщини, резорбційні порожнини в кортексі, толуїдиновий синій, зб. 100



**Рис. 2.** Мікрофото. Новоутворені кісткові трабекули навколо танталового імплантата через 14 діб після операції: у щура з нормальним станом кісткової тканини (а, зб. 100) та остеопорозом (б, зб. 40), гематоксилін та еозин; рефракція колагену І типу в поляризованому світлі у щура з нормальним станом кісткової тканини (в) та остеопорозом (г), пікросиріус червоний, зб. 100





**Рис. 3.** Мікрофото дистального метафіза стегнової кістки щурів через 90 діб після імплантації: зріла кісткова тканина навколо імплантатів у щурів із нормальною будовою кістки (а) та з остеопорозом (б), гематоксилін та еозин, зб. 40; колаген I типу в складі колагенових волокон у щурів із нормальною будовою кістки (в) та остеопорозом (г), пікросириус червоний, поляризоване світло, зб. 100

Виявлено, що в контрольній групі тварин 73,1 % периметра імплантата оточувала кісткова тканина, а в дослідній — 57,7 %. Ці показники свідчать про високі остеointегративні властивості пористих танталових імплантатів і у тварин із нормальною будовою кістки, і з проявами остеопорозу, що також зафіксовано іншими дослідниками в умовах використання танталу різної структури. Зокрема, після імплантації зразків плетеного пористого танталу в стегнову кістку кролів за результатами мікрокомп'ютерної томографії та гістоморфометричного дослідження доведено, що через 6 тижнів відносна площа новоутвореної кістки навколо імплантата становила  $(56,52 \pm 2,90) \%$ , а через 12 —  $(68,98 \pm 6,04) \%$  [16].

Архітектура пористої структури танталового матеріалу в поєднанні з його механічними влас-

тивостями сприяє остеointеграції та регенерації кістки, що доведено в експерименті на щурах [9]. Тантал вважають перспективним матеріалом ще й тому, що порівняно з іншими металевими біоматеріалами він має низьку адгезію до *St. aureus* та *St. epidermidis*, що є важливим фактором для його використання як ортопедичного імплантата [10].

Таблиця

**Остеointегративні властивості імплантата з пористого танталу (90-та доба дослідження)**

Серія експерименту	Загальний периметр тканин навколо імплантата (мкм)	Кісткова тканина по периметру імплантата (мкм)
Контроль	$88056,83 \pm 3917,85$	$62977,67 \pm 3241,1$
Дослід	$88240 \pm 4481,58$	$50932,5 \pm 2803,33$
P	> 0,05	< 0,05

Аналізуючи регенерацію кісткової тканини навколо танталових імплантатів, слід відмітити, що спрямованість процесу була ідентичною в дослідній та контрольній групах тварин. Упродовж усього спостереження зафіксовано формування кісткової тканини навколо імплантата. Проте у тварин із модельованим остеопорозом разом з кістковою тканиною, яка оточувала імплантат, виявлено безпосередній контакт танталу з кістковим мозком міжтрабекулярних просторів материнської губчастої кісткової тканини та формування більших ділянок сполучної тканини порівняно з контрольними тваринами.

### Висновки

Імплантати з пористого танталу мають хорошу біологічну сумісність із кістковою тканиною та кістковим мозком, характеризуються високими остеointегративними властивостями. У тварин із нормальною будовою кісткової тканини імплантати на 73,1 % периметра були оточені зрілою кістковою тканиною, у шурів із модельованим остеопорозом цей показник був також достатньо високим і становив 57,7 %. Проведене дослідження свідчить, що імплантати з танталу можуть бути використані в ортопедії та травматології в пацієнтів як з нормальним станом кісткової тканини, так і з остеопорозом.

**Конфлікт інтересів.** Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

### Список літератури

1. Биоматериалы в ортопедии и травматологии — роль А. А. Коржа в развитии проблемы / Н. А. Корж, С. В. Мильшкіна, Н. В. Дедух, И. Б. Тимченко // *Наследие. Алексей Александрович Корж : научно-историческое издание* ; под ред. Л. Д. Горидовой. — Х., 2014. — С. 35–49.
2. Дедух Н. В. Костная ткань в норме и при остеопорозе / Н. В. Дедух, Е. А. Побел // *Ортопедия, травматология и протезирование*. — 2013. — № 3. — С. 92–98. — DOI: 10.15674/0030-59872013392-98.
3. 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 документу (URL) : [http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994\\_137](http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994_137).
4. Про захист тварин від жорстокого поводження : Закон України № 3447-IV. — [Чинний від 21.02.2006]. Ст. 26.
5. Музыченко П. Ф. Проблемы материаловедения в ортопедии и травматологии / П. Ф. Музыченко // *Лікарю, що практикує*. — 2012. — Т. 13, № 1. — С. 94–98.
6. Попков А. В. Биосовместимые имплантаты в травматологии и ортопедии (обзор литературы) / А. В. Попков // *Гений ортопедии*. — 2014. — № 3. — С. 94–99.
7. Саркисов Д. С. Микроскопическая техника / Д. С. Саркисов, Ю. Л. Перов. — М. : Медицина, 1996. — 542 с.
8. Экспериментальный остеопороз / В. В. Поворознюк, Н. В. Дедух, Н. В. Григорьева, И. В. Гопкалова. — К., 2012. — 228 с.
9. Additively manufactured porous tantalum implants / R. Wauthle, J. van der Stok, S. A. Yavar [et al.] // *Acta Biomater*. — 2015. — Vol. 14. — P. 217–225. — DOI: 10.1016/j.actbio.2014.12.003.
10. Bacterial adherence to tantalum versus commonly used orthopedic metallic implant materials / T. A. Schildhauer, B. Robie, G. Muhr, M. Koeller // *J. Orthop. Trauma*. — 2006. — Vol. 20 (7). — P. 476–484.
11. Direct laser processing of tantalum coating on titanium for bone replacement structures / V. K. Balla, S. Bodhak, S. Bose, A. Bandyopadhyay // *Acta Biomater*. — 2010. — Vol. 6 (6). — P. 2329–2334. — DOI: 10.1016/j.actbio.2009.11.021.
12. Junqueira L. C. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections / L. C. Junqueira, G. Bignolas, R. R. Brentani // *Histochem J*. — 1979. — Vol. 11 (4). — P. 447–455.
13. Osseous integration in porous tantalum implants / C. G. Paganias, G. A. Tsakotos, S. D. Koutsostathis [et al.] // *Indian J. Orthop*. — 2012. — Vol. 46 (5). — P. 505–513. — DOI: 10.4103/0019-5413.101032.
14. Porous metal for orthopedics implants / F. Matassi, A. Botti, L. Sirleo [et al.] // *Clin. Cases Miner. Bone Metab*. — 2013. — Vol. 10 (2). — P. 111–115.
15. Tantalum — a bioactive metal for implants / V. K. Balla, S. Bose, N. M. Davies, A. Bandyopadhyay // *JOM*. — P. 61–64. — DOI: 10.1007/s11837-010-0110-y.
16. Tantalum implanted entangled porous titanium promotes surface osseointegration and bone ingrowth / Q. Wang, Y. Oiao, M. Cheng [et al.] // *Sci. Rep*. — 2016. — Vol. 6. — Article 26248. — DOI: 10.1038/srep26248.

DOI: <http://dx.doi.org/10.15674/0030-5987201645-10>

Стаття надійшла до редакції 08.09.2016

## MORPHOLOGICAL FEATURES OSTEOINTEGRATION OF POROUS TANTALUM IMPLANTS IN RATS

N. V. Dedukh, S. E. Bondarenko, V. A. Filipenko, I. O. Batura

SI «Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv

✉ Ninel Dedukh, Dr. Biol. Sci., Prof.: [dedukh\\_ninel@ukr.net](mailto:dedukh_ninel@ukr.net)