

УДК 615.837.3: 616.71–003.93: 615.465: 591.4 (599.323.4)

© Колектив авторів, 2013

## РЕПАРАТИВНА РЕГЕНЕРАЦІЯ КІСТКИ НАВКОЛО ТИТАНОВИХ ІМПЛАНТАТІВ ПІСЛЯ ДІЇ НИЗЬКОІНТЕНСИВНОГО ІМПУЛЬСНОГО УЛЬТРАЗВУКУ

**С. В. Малишкіна, В. І. Маколінець, І. В. Вишнякова, О. А. Нікольченко, Т. М. Гращенко**  
 Лабораторія експериментального моделювання (зав. – к. б. н. С. В. Малишкіна), Державна установа «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України». 61024, Україна, м. Харків, вул. Пушкінська, 80.  
 E-mail: s\_malysh@ukr.net

### BONE REPARATIVE REGENERATION AROUND TITANIUM IMPLANTS AFTER EXPOSURE TO LOW-INTENSITY PULSED ULTRASOUND EFFECT

S. V. Malyshkina, V. I. Makolynets, I. V. Vishnyakova, O. A. Nikolchenko, T. N. Grashchenkova

#### SUMMARY

We have performed a morphological analysis of the osteoreparative process in the titanium sample implantation zone after exposure to ultrasound with 0.4 W/cm<sup>2</sup> fluctuation intensity that was applied starting from the third day after the surgery. The experiment was carried out on 30 laboratory rats. It was found that on the implant contact border, the fibroreticular tissue area was significantly larger at the early stages, but the granular tissue area was smaller as compared to the control group in which the ultrasound was not applied. The ultrasound optimizes the osteoreparative process and the damaged bone remodeling in the implantation zone, which is indicated by high parameters of the active osteoblastic surface, the newly formed bone area around the implants, and the osteointegration index, as compared to the control group.

### РЕПАРАТИВНАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ КОСТИ ВОКРУГ ТИТАНОВЫХ ИМПЛАНТАТОВ ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ НИЗКОІНТЕНСИВНОГО ИМПУЛЬСНОГО УЛЬТРАЗВУКА

С. В. Малышкина, В. И. Маколинцев, И. В. Вишнякова, О. А. Никольченко, Т. Н. Гращенко

#### РЕЗЮМЕ

В эксперименте на 30 лабораторных крысах выполнен морфологический анализ течения остеорепарации в участке имплантации титановых образцов после действия ультразвука с интенсивностью колебаний 0,4 Вт/см<sup>2</sup>, примененного с 3 суток после операции. Установлено, что на границе контакта с имплантатом на ранних сроках исследования выявляются достоверно большие территории фиброретикулярной ткани и меньшие площади грануляционной ткани по сравнению с контролем, где не применялось воздействие ультразвука. Ультразвук оказывает оптимизирующее действие на остеорепаративный процесс и перестройку поврежденной кости в зоне имплантации, на что указывают высокие показатели активной остеобластической поверхности, площади новообразованной костной ткани вокруг имплантатов и индекса остеointegrации по сравнению с показателями контроля.

**Ключові слова:** низькоінтенсивний імпульсний ультразвук, титановий імплантат, стегова кістка щура, гістологічне дослідження.

При відновлювальній хірургії наслідків травм та захворювань кісток і суглобів широко використовують різні фіксуючі системи [1, 4, 8]. Питання щодо їх тривалого функціонування та остеointegrації у кістку до теперішнього часу ще не вирішене і залишається актуальним. З метою зміцнення кістки, що оточує імплантат, та профілактики асептичної нестабільності металевих фіксаторів і ендопротезів розробляються та застосовуються різні методи оптимізації остеорепаративної, зокрема, й ультразвуку (УЗ) [2, 5, 9]. Проте у дослідженні особливостей перебудови кістки при використанні титанових фіксаторів в умовах дії УЗ існує чимало суперечливих поглядів, наприклад, оцінка активності та якості кісткоутворення залежно від використаної інтенсивності УЗ коливань, визначення оптимального терміну дії УЗ після оперативного втручання (тобто стадії регенерації кістки), загального строку лікування, тощо.

Мета роботи – в експерименті на щурах дослідити структурну організацію стегових кісток з

титановими імплантатами в умовах дії імпульсного ультразвуку з інтенсивністю коливань 0,4 Вт/см<sup>2</sup>, застосованого з 3 доби після імплантації.

#### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Експериментальне дослідження проведено на 30 білих щурах-самцях (маса тіла від 300 до 350 г). Тваринам під загальним знеболюванням (аміназин 10 мг/кг та кетамін 50 мг/кг, внутрішньом'язово) у дистальний метафіз стегової кістки імплантували титановий (ВТ 16) зразок циліндричної форми (висота 3,0 мм, діаметр 2 мм). Через 3 доби після імплантації (завершення стадії травматичного запалення в процесі репаративного остеогенезу) щурів розподілили на дві групи: 1 група – дослідна (15 щурів, у яких ділянку кістки з імплантатом піддавали дії УЗ); 2 група – контрольна (15 щурів, яким не застосовували дію УЗ).

Процедуру «озвучення» проводили апаратом УЗТ-1.01 із головкою ИУТ 0,88–1,03 Ф (ефективна

площа випромінювання 1 см<sup>2</sup>). На задній поверхні стегна в зоні оперативного втручання контактено до шкіри, попередньо звільненої від шерсті, виконували «озвучення» протягом 5 хвилин (один раз на добу, впродовж 10 діб). Характеристики впливу УЗ: частота коливань – 0,88 МГц, інтенсивність коливань (ІК) – 0,4 Вт/см<sup>2</sup>, режим – імпульсний (тривалість імпульсу – 4 мсек, пауза – 16 мсек).

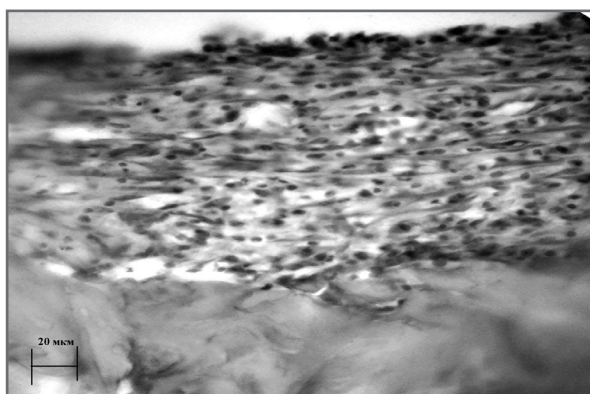
Тварин виводили з експерименту через 7, 14 та 45 діб після операції шляхом декапітації (через необхідність забору крові для біохімічних досліджень). Експерименти проведені з дотриманням сучасних вимог біоетики, що підтверджено рішенням Комітету з біоетики ДУ «ПХС ім. проф. М. І. Ситенка НАМНУ» (протокол № 75 від 18.10.2010 р.).

Для морфологічних досліджень матеріал (фрагменти стегнових кісток з імплантатом) проходив обробку за стандартною гістологічною методикою для кісткової тканини [3]. Імплантати видаляли після декальцинації. Гістологічні зрізи забарвлювали гематоксиліном Вейгерта та еозином. Матеріал досліджували на центральних повздовжніх зрізах у світлових мікроскопах «Primo Star» та «AxioStar Plus». Використовуючи окуляр-мікрометра МОВ-1–15<sup>х</sup>, вимірювали товщину сполучнотканинної капсули по периметру видаленого імплантата у п'ятьох ділянках, а також визначали показник активної остеобластичної поверхні (відношення довжини кісткових трабекул, зайнятих активними остеобластами, до загальної довжини трабекул, %). Оцінювали відносну площу новоутворених тканин (грануляційної, фіброретикулярної, кісткової) навколо імплантатів (за допомогою квадратно-сітчастої окулярної вставки з 289 точками) і визначали індекс остеointegraції, який характеризує величину безпосереднього контакту поверхні імплантата з кістковою тканиною. Отримані цифрові дані вимірювань опрацьовували методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Ст'юдента.

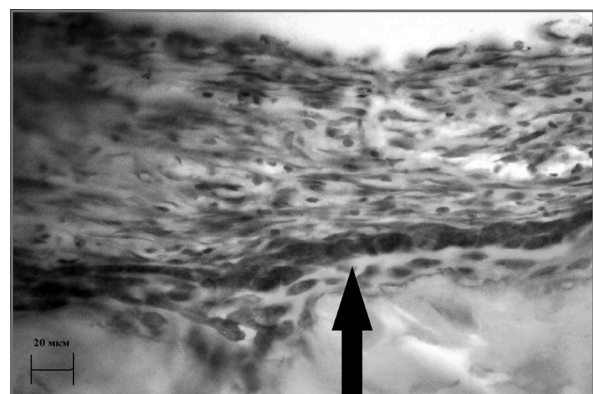
## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

**7 діб після операції.** У тварин контрольної групи по периметру порожнини від видалених зразків розташовувалась переважно грануляційна тканина (рис. 1а) з лімфоцитами, ретикулярними клітинами, поодинокими крупними макрофагами, фібробластами та численними капілярами різного калібру. Щільність клітин фібробластичного диферону була незначною. Виявлялись також ділянки фіброретикулярної тканини, в якій переважали клітини фібробластичного диферону. Площа фіброретикулярної тканини (23,11±1,4 ум. од.) була менша в 1,3 раза (p<0,05) за площу грануляційної тканини (29,33±1,5 ум. од.). У кортексі та губчастій кістці, що межують з імплантатом, визначалися післятравматичні деструктивні зміни – зони без остеоцитів, тріщини, базофілія цементних ліній, осередки розшарування кісткового матриксу та розчиненої кісткової речовини у вигляді гомогенних мас. На поверхні окремих кісткових трабекул відмічались дрібні зазубрини. У деяких з них розташовувались остеокласти, що вказує на процеси резорбції кісткової тканини за типом лакунарного розсмоктування. У міжтрабекулярних просторах були значними ділянки некрозу кісткового мозку та кистоподібні порожнини. Репаративні зміни були пов'язані з появою фіброретикулярної тканини у міжтрабекулярних просторах материнської губчастої кістки. Періост поблизу імплантатів був розширений, з численними проліфератами клітин фібробластичного диферону.

У щурів **дослідної групи** по периметру імплантата спостерігалась переважно фіброретикулярна тканина з високою щільністю фібробластів та значною кількістю яскраво базофільно забарвлених клітин остеобластичного диферону. Виявлялись поодинокі лімфоїдні клітини та макрофаги. Лише місцями, переважно у ділянці кортексу, відмічалась грануляційна тканина з високою щільністю клітин фібробластичного диферону та кровонос-



а



б

**Рис. 1.** Фотовідбитки гістопрепаратів у ділянці стінки порожнини від видаленого імплантата. 7 діб після операції: а) контроль – грануляційна тканина з низькою щільністю клітин фібробластичного диферону; б) дослід – грануляційна тканина з високою щільністю клітин фібробластичного диферону. Нашарування остеоїду на материнській кістці (стрілка). Гематоксилін Вейгерта та еозин. 36. 200

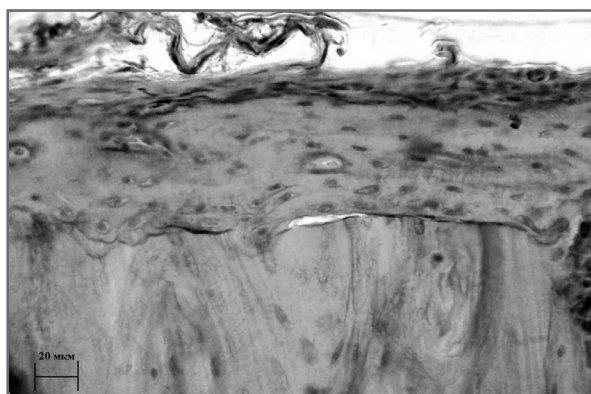
них судин різного калібру. Площа грануляційної тканини ( $21,67 \pm 1,2$  ум. од.) була менша в 1,35 раза ( $p < 0,01$ ) за площу грануляційної тканини у контрольних щурів, а площа фіброретикулярної тканини ( $39,33 \pm 1,6$  ум. од.) був більшою в 1,7 раза ( $p < 0,001$ ) за відповідний показник у контролі.

Материнська кісткова тканина поблизу імплантатів мала ознаки післятравматичної перебудови, аналогічні описаним у контрольних щурів. Проте, на відміну від контролю, на окремих материнських кісткових трабекулах відмічено нашарування остеοїду та формування молодих кісткових трабекул з високою щільністю яскраво забарвлених остеобластів по крайовій поверхні (рис. 16). У міжтрабекулярних просторах, що відкриваються до імплантата, відмічені осередки некрозу кісткового мозку, а у збереженому кістковому мозку виявлялись численні розширені та заповнені еритроцитами синусоїди. У кортикальній кістці біля дефекту відмічені розширені, переважно, пусті судинні канали з явищами пазушного розсмоктування. У окремих каналах розташовувалась фіброретикулярна тканина. Структура періосту була подібна його структурі в контролі. Явищ запалення у перієсті не зафіксовано у щурів обох груп.

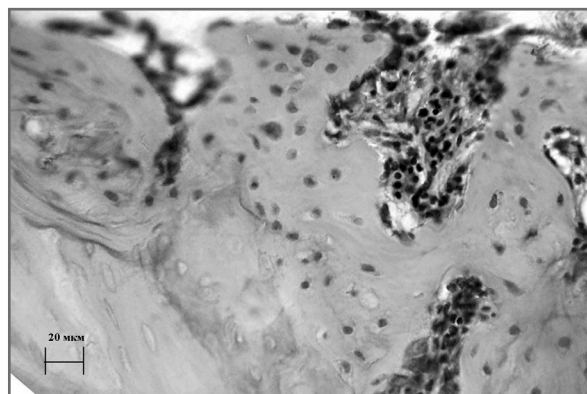
**14 дів після операції.** У щурів контрольної групи по периметру ділянки імплантації у вигляді широкої смужки виявлялась переважно щільна сполучна тканина. Її ширина становила  $116,7 \pm 5,1$  мкм. На окремих ділянках периметру порожнини відмічені осередки фіброретикулярної тканини з високою щільністю фібробластів, а також новоутворена кісткова тканина та остеοїд. Структурна організація кортикальної та губчастої материнської кістки навколо ділянки імплантації свідчить про перевагу деструктивних змін з незначним проявом остеорепарації. Лише на окремих кісткових трабекулах виявлялись нашарування остеобластів.

У щурів дослідної групи по периметру порожнини спостерігались остеοїд, новоутворена кісткова тканина, фіброретикулярна тканина з високою щільністю клітин остеобластичного диферону та, місцями, тонька смужка щільної сполучної тканини, товщина якої ( $53,9 \pm 2,1$  мкм) менша, ніж у тварин контрольної групи у 2,1 раза ( $p < 0,001$ ). Молода кісткова тканина утворювала дрібнопетлясту сітку, трабекули якої характеризувались значною щільністю остеοцитів та остеобластів по їх крайовій поверхні. Були виражені прояви репаративних змін у материнській кістці, на що вказували нашарування молоді кісткової тканини на кісткових трабекулах. Показник активної остеобластичної поверхні ( $21,5 \pm 1,4\%$ ) був більшим у 2,2 раза ( $p < 0,001$ ) за аналогічний показник у контрольних щурів ( $9,8 \pm 0,5\%$ ). Площа новоутвореної кісткової тканини у щурів дослідної групи ( $27,8 \pm 1,5$  ум. од.) була більша в 2,3 раза ( $p < 0,001$ ), ніж у тварин контрольної групи ( $12,2 \pm 0,9$  ум. од.), а індекс остеοінтеграції – в 1,9 раза. У міжтрабекулярних просторах поблизу дефекту розташовувався червоний кістковий мозок зі значною щільністю розширених мікросудин, частина з яких заповнена еритроцитами. Перієст поблизу ділянки імплантації потовщений за рахунок проліферації остеοгенних клітин його внутрішнього шару та формування грубоволокнистих кісткових трабекул.

**45 дів після операції.** У тварин контрольної групи навколо зони імплантації виявлялась вузька смужка пластинчастої кісткової тканини, від якої відходили переважно повздовжні трабекули з високою щільністю остеοцитів (рис. 2а). Обширно залишалась територія фіброретикулярної тканини, а також щільної сполучної тканини, товщина котрої не відрізнялась від встановленої на 14 добу. Поблизу імплантата у полі зору мікроскопа відмічалось від 2 до 4 трабекул. Виявлялись новоутворені кісткові трабекули. Показник активної остеобластичної поверхні вірогідно не відрізнявся від встановленого



а



б

**Рис. 2.** Фотовідбитки гістопрепаратів у ділянці стінки порожнини від видаленого імплантата. 45 дів після операції: а) контроль – новоутворена кісткова тканина пластинчастої будови з прошарком щільної сполучної тканини; б) дослід – новоутворені кісткові трабекули пластинчастої будови з високою щільністю остеοцитів на поверхні та остеобластів по краю трабекул. Гематоксилін та еозин.  $\times 360$

на попередній термін. Межа з'єднання новоутворених кісткових трабекул з материнськими чітко визначається. Індекс остеоінтеграції підвищився в 2 рази порівняно з 14 добою. Материнські кісткові трабекули і на цей строк зберігали сліди післятравматичної перебудови. Були помітними репаративні зміни, пов'язані з нашаруванням остеоїду на окремих кісткових трабекулах. Структура компактної кістки навколо імплантата відрізняється від материнської топографією розташування остеонів та судинних каналів, деякі з них були порожніми та розширеними.

У тварин **дослідної групи**, на відміну від контрольних щурів, по периметру порожнини від видаленого імплантата спостерігалась новоутворена кісткова тканина, яка в зоні губчастої кістки представлена крупнопетлястими трабекулами, переважно, з пластинчастої кісткової тканини, а в зоні кортексу – компактною кісткою, структурна організація якої відрізняється від материнської кістки орієнтаційним розташуванням судинних каналів. Фіброретикулярна тканина з клітинами остеобластичного диферону та тоненькі смужки щільної сполучної тканини спостерігались лише на невеликих ділянках по периметру імплантата. Товщина сполучної тканини була меншою за аналогічний показник у контролі в 1,9 рази ( $p < 0,001$ ). Поблизу зони імплантації у полі зору мікроскопа виявлялось від 6 до 8 кісткових трабекул, які орієнтовані як вздовж периметра порожнини, так і перпендикулярно до поверхні імплантата. На значній частині кісткових трабекул визначалися ланцюги остеобластів (рис. 26). Показник активної остеобластичної поверхні вірогідно не відрізнявся від показника, встановленого на 14 добу, проте був вищим у 5,7 рази відносно контролю. Це може бути результатом оптимізації процесів остеогенезу на межі з імплантатом. Індекс остеоінтеграції був вищим у 1,3 рази за аналогічний показник на 14 добу. Визначити площу новоутвореної кісткової тканини у зоні імплантації було не можливо, бо межа її з'єднання з материнською кісткою, особливо у ділянці губчастої кістки, майже не виявлялась. Лише місцями у материнських кісткових трабекулах відмічались ознаки післятравматичної репаративної перебудови. Періост біля зони імплантації був представлений тонким шаром кісткових трабекул.

Дані про механізм дії УЗ на кісткоутворення в умовах імплантації біоматеріалів знаходиться на стадії накопичення. На цей час відомо, що одним із механізмів стимуляції репаративного остеогенезу як навколо біоматеріалів, так і при переломах є підвищення клітинної адгезії за рахунок експресії фібронектину [13], а стимуляція формування кісткового регенерату може відбуватися за рахунок активізації остеобластів щодо експресії ростових факторів [9, 10]. Відомо, що васкуляризація – необхідний та важливий етап остеоінтеграції, бо він впливає на диференціацію остеобластів та осифікацію тканин.

У нашому дослідженні було зафіксовано збільшення щільності судин різного калібру у грануляційній тканині та кістковому мозку міжтрабекулярних просторів у дослідних тварин. Це узгоджується з результатами дослідження G. J. Della Rocca (2009), де в експериментах *in vivo* доведено, що дія УЗ позитивно впливає на ангиогенез [5]. В культурі клітин було показано, що УЗ підвищує експресію судинного ендотеліального фактора росту остеобластами та періостальними клітинами [6]. Встановлений у нашому дослідженні факт активної перебудови грануляційної тканини та ранньої остеогенної диференціації клітин у фіброретикулярній тканині не суперечить даним літератури. Так, в експерименті на щурах за допомогою електронно-мікроскопічного методу було доведено, що при застосуванні УЗ інтенсивністю до 0,6 Вт/см<sup>2</sup> остеогенна диференціація клітинного регенерату на ранніх стадіях процесу остеорепації відбувається швидше, ніж у контролі [7]. В органічній культурі зачатків кінцівок 17-добових ембріонів мишей після дії низькоінтенсивного УЗ впродовж 7 діб був відмічений ріст діафіза, який по відношенню до контролю був більшим у три рази [11]. Автори пов'язують таку стимуляцію з безпосередньою дією УЗ на проліферацію та диференціацію попередників остеогенних клітин. В літературі є дані щодо позитивного впливу УЗ низької інтенсивності на активність «дозрівання» кісткового регенерату. Так, S. H. Sadraie et al. (2011) у клітинах кісткового регенерату кролів, яким застосовували дію УЗ з ІК=30 мВт/см<sup>2</sup>, виявили у більш ранні строки, ніж у контрольних тварин, розвинуту ендоплазматичну сітку з великою кількістю рибосом, що свідчить про активний синтез білків [8]. W-L. Lam et al. (2012) в експерименті на щурах, моделюючи перелом стегна і застосовуючи дію низькоінтенсивного УЗ, встановили за допомогою методу кісткової денситометрії, що мінеральна щільність регенерату та прилеглої кістки при порівнянні з контролем була вірогідно більшою вже на початковій стадії формування регенерату [12]. У виконаному нами дослідженні при застосуванні УЗ з ІК=0,4 Вт/см<sup>2</sup> формування кісткового регенерату навколо імплантованих зразків спостерігалось раніше, а території новоутвореної кістки були більшими, ніж у контрольних щурів. В умовах застосування УЗ даної інтенсивності активніше відбувається і перебудова материнської кістки навколо ділянки імплантації.

#### ВИСНОВКИ

Імпульсний ультразвук при інтенсивності коливань 0,4 Вт/см<sup>2</sup>, застосований із 3 доби після імплантації титанових зразків, не порушує стадійність остеорепаративного процесу. Ультразвук даного режиму активізує перебудову грануляційної тканини та остеогенну диференціацію фіброретикулярної тканини на ранніх стадіях остеорепації,

що обумовлює у подальшому вірогідно вищі по відношенню до контролю показники новоутвореної кісткової тканини навколо імплантатів, активної остеобластичної поверхні, індексу остеоінтеграції.

В перспективі одержані результати стосовно особливостей перебудови кісткової тканини в ділянці імплантації титанових зразків після дії низькоінтенсивного імпульсного УЗ стануть основою для обґрунтування показань та розробки методики щодо його використання у пацієнтів після реконструктивно-відновлювальних оперативних втручань із застосуванням фіксуєчих засобів.

*Дослідження є фрагментом НДР «Вивчити перебудову кістки в ділянці введення титанових імплантатів під впливом ультразвуку» (держреєстрація № 0111U000071)*

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Дєдх Н. В. Остеоінтеграція кісткової тканини з титановими імплантатами/Н. В. Дєдх, С. В. Малишкіна//Ортопедия, травматология и протезирование. – 2010. – № 1. – С. 45-49.
2. Малышкина С. В. Влияние импульсного низкоинтенсивного ультразвука на остеоинтеграцию имплантатов (обзор литературы)/С. В. Малышкина, В. И. Маколинец, И. В. Вишнякова//Ортопедия, травматология и протезирование. – 2012. – № 2. – С. 122–130.
3. Саркисов Д. С. Микроскопическая техника. Руководство/Д. С. Саркисов, Ю. Л. Перов. – М.: Медицина, 1996. – 544 с.
4. Шимон В. М. Покриття на титанові імплантати та остеоінтеграція/В. М. Шимон, С. В. Малишкіна, Н. В. Дєдх//Укр. медичний альманах. – 2010. – № 5. – С. 239–244.
5. Della Rocca G. J. The science of ultrasound therapy for fracture healing/G. J. Della Rocca//Indian J. Orthop. – 2009. – Vol. 43, № 2. – P. 121–126.
6. Dijkman B. G. Low-intensity pulsed ultrasound: Nonunions/B. G. Dijkman, S. Sprague, M. Bhandari//Indian J. Orthop. – 2009. – Vol. 43, № 2. – P. 141–148.
7. Effects of different therapeutic ultrasound intensities on fracture healing in rats/C.-H. Fung, W.-H. Cheung, N. M. Pounder [et al.]//Ultrasound Med. Biol. – 2012. – Vol. 38, № 5. – P. 745–752.
8. Effects of low intensity pulsed ultrasound on healing of denervated tibial fracture in the rabbit/S. H. Sadraie, Gh. R. Kaka, M. Mofid [et al.]//Iran. Red Crescent Med. J. – 2011. – Vol. 13, № 1. – P. 34–41.
9. Effects of near-field ultrasound stimulation on new bone formation and osseointegration of dental titanium implants in vitro and in vivo/S. K. Hsu, W. T. Huang, B. S. Liu [et al.]//Ultrasound Med. Biol. – 2011. – Vol. 37, № 3. – P. 403–416.
10. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates fracture healing by stimulation of recruitment of both local and circulating osteogenic progenitors/K. Kumagai, R. Takeuchi, H. Ishikawa [et al.]//J. Orthop. Res. – 2012. – Vol. 30, № 9. – P. 1516–1521.
11. Low-intensity pulsed ultrasound for bone healing: an overview/K. N. Malizos, M. E. Hantes, V. Protopappas, A. Papachristos//Injury Int. Care Injured. – 2006. – Vol. 37S. – P. 56–62.
12. The role of the sensory nerve response in ultrasound accelerated fracture repair/W.-L. Lam, X. Guo, K.-S. Leung, K. S. C. Kwong//J. Bone Joint Surg. – 2012. – Vol. 94-B, № 10. – P. 1433–1438.
13. Ultrasound for fracture healing: current evidence/Y. Watanabe, T. Matsushita, M. Bhandari [et al.]//J. Orthop. Trauma. – 2010. – Suppl. 1. – P. 56–61.