

**Н.В.Зайцева**

Сумський державний  
університет

**Ключові слова:** металеві сплави, остеоінтеграція, растрова електронна мікроскопія, хімічний склад.

Надійшла: 13.08.2015  
Прийнята: 22.09.2015

УДК 616-001.17-089.26

## **БУДОВА ТА ХІМІЧНИЙ СКЛАД СТЕГНОВОЇ КІСТКИ ПРИ ІМПЛАНТАЦІЇ МЕТАЛЕВИХ СПЛАВІВ РІЗНОГО СКЛАДУ**

**Реферат.** Метою дослідження було вивчення структури та хімічного складу травмованої кістки методом растрової електронної мікроскопії в різні терміни після імплантації металевих сплавів. Доведено, що Імплантація в дистальний епіфіз сплаву TiVT6 та КТЦ-125 призводить до утворення сполучної тканини навколо простезу та активації процесів ремоделювання. Введення в дистальний епіфіз сплаву  $\beta$ -(Ti-Zr) призводить до ранньої регресії сполучної тканини навколо імплантату та призводить до розвитку мінімальних змін структури та хімічного складу кістки в усі терміни спостереження. Використання гідроксиапатиту в якості покриття металевих імплантів запобігає утворенню сполучної капсули та стимулює розвиток кісткової тканини навколо простезу, що забезпечує його оптимальну фіксацію. Оптимізація процесів остеоінтеграції призводить до зменшення активності процесів ремоделювання та втрати кальцію. Гідроксиапатитне покриття  $\beta$ -(Ti-Zr) сплаву забезпечує відсутність ефекту стрессового зміщення та розвитку мікроушкоджень кісткової тканини.

**Morphologia.** – 2015. – Т. 9, № 3. – С. 22-27.  
© Н.В.Зайцева, 2015

**Zaitseva N.V. The structure and chemical composition of the femur after different metal alloys implantation.**

**ABSTRACT. Background.** Osteointegration is a key factor for successful implant ingrowth. It depends on quality of bone, lack of initial stability, excessive loading, loosening or fracture of screw, and fracture of implant itself. Other factors that can affect osteointegration are implant composition and features of implant surface. **Objective.** The aim was to study the structure and chemical composition of an injured bone by scanning electron microscopy at different times after the implantation of metal alloys. **Methods.** Experiment was conducted on 90 rabbits, that were divided into 6 groups – 1 control and 5 experimental. We made round defect of femur in rabbits of control group and fill it by different alloys in experimental ones. **Results.** It was estimated that the implantation of TiVT6 and KTC-125 alloys in distal epiphysis leads to the formation of connective tissue around prosthesis and activation of bone remodeling.  $\beta$ -(Ti-Zr) alloy leads to early regression of the connective tissue around the implant and development of minimal changes in the structure and chemical composition of the bone during all periods of observation. Use of hydroxyapatite to coat metallic implants prevents connective capsule formation and stimulates bone growth around prosthesis that ensures its optimum fixation. **Conclusion.** Optimization of osteointegration leads to reduction of calcium loss. Hydroxyapatite coating of  $\beta$ -(Ti-Zr) alloy ensures the absence of stress-shielding displacement effect and development of bone micro-cracks.

**Key words:** metal alloys, osteointegration, scanning electron microscopy, chemical composition.

### **Citation:**

Zaitseva NV. [The structure and chemical composition of the femur after different metal alloys implantation]. *Morphologia*. 2015;9(3):22-7. Ukrainian.

### **Вступ**

Головним фактором успішної імплантації є оптимальна остеоінтеграція простезу та збереження якості кісткової тканини у віддалений термін після введення простезу [1]. Термін «остеоінтеграція» вперше був запропонований датським ортопедом Per-Ingvar Branemark у 1950 році для визначення процесів взаємодії металевого імплантату з оточуючою кістковою тканиною. Успішна остеоінтеграція залежить як від якості кісткової тканини, зокрема наявності остеопору, вікових змін, хвороб опорно-рухового апарату тощо, так і від якості і виду імплантату [2]. У процесі використання «класичних» матеріалів,

зокрема оксиду титану та його сплавів було доведено, що навіть через 17 років, відсоток контакту з кісткою не досягає 70%. Відсоток ускладнень при використанні титанових сплавів досягають 20% та зростає зі збільшенням терміну експлуатації імплантату [3, 4].

Для вирішення проблеми покращення взаємодії імплантату з кісткою на сьогодні запропоновані чисельні модифікації, зокрема зміна морфології та складу поверхні матеріалу для збільшення адгезії остеогенних клітин та їх проліферації. Для цього використовують покриття імплантату гідроксиапатитом, формування нано- та мікроструктурованої поверхні тощо. Чисельні

дослідження довели перевагу модифікованих імплантатів та зменшення ускладнень при їх використанні [5, 6, 7].

Окремою проблемою є розвиток ефекту стресового зміщення в наслідок невідповідності модуля пружності кісткової тканини (до 30 ГПа) та традиційних імплантатів (від 100 ГПа). В результаті тривалого використання відбувається перерозподіл навантаження навколо імплантату за розвиток ремоделювання кісткової тканини з виникненням змін, характерних для остеопорозу в результаті чого може бути порушена стабільність протезу [4]. Для вирішення цього питання створений низько модульний сплав  $\beta$ -(Ti-Zr) з модулем пружності до 47 ГПа, що потенційно може зменшити розвиток ефекту стресового зміщення.

Іншою проблемою тривалого використання імплантів є їх корозія з вивільненням металів та їх інтеграцію у метаболізм кісткової тканини. Корозія імплантатів виникає в результаті взаємодії продуктів кісткових клітин з поверхнею протезу, зокрема кислотна ерозія при вивільненні кислото фосфатази остеокластами [8].

Не зважаючи на чисельні експериментальні та клінічні дослідження змін кісткової тканини в періімплантаційній зоні при використанні імплантатів різного складу, зміни віддалених ділянок кістки майже не вивчалися.

Тому метою нашої роботи стало вивчення структури та хімічного складу травмованої кістки методом растрової електронної мікроскопії в різні терміни після імплантації металевих сплавів.

#### Матеріали та методи

Експеримент проведений на 95 кролях породи «шиншила» віком 4-5 місяців з початковою масою  $3,5 \pm 0,3$  кг. Експеримент проведений згідно положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Планування та проведення експерименту було погоджено Комісією з біомедичної етики Медичного інституту СумДУ. Тварини були поділені на 7 серій – інтактна, контроль та 5 експериментальних серій. Контрольній серії кролів наносили дефект у проксимальному відділі стегнової кістки (на межі діафізу та дистального епіфізу) діаметром 3,5 мм. Таким чином, дана група тварин використовувалась в якості негативного контролю для вивчення факту травми кістки на морфофункціональні особливості кістки та порівняння їх з експериментальними групами.

Особидам 3 – 7 серії під наркозом (кетамін 7 мг/кг та тіопентал 10 мг/кг) проводилась операція з постановки зубного імплантату в проксимальний відділ стегнової кістки з навантаженням

на імплантат від 30 до 35 Н. В експериментальній серії використовували імплантати наступного складу: Титановий сплав ВТ-6 (TiVT6); Цирконієвий сплав КТЦ-125; Цирконієвий сплав КТЦ-125 з гідроксиапатитним покриттям;  $\beta$  (Ti-Zr) сплав;  $\beta$  (Ti-Zr) сплав з гідроксиапатитним покриттям ( $\beta$  (Ti-Zr)-ГА).

Тварин всіх груп виводили з експерименту шляхом передозування наркозу у терміни 1, 3 та 6 місяців після операції з метою визначення морфо- функціональних змін кісткової тканини в ранній та пізній післяопераційний періоди. Тваринам виділяли травмовану стегнову кістку, відсепаровували м'язи та інші м'які тканини та видаляли імплантат. Для дослідження брали три ділянки кістки: проксимальний епіфіз для виявлення змін в періімплантаційній зоні, середину діафізу та дистальний епіфіз для визначення змін віддалених ділянок органу на імплантацію матеріалу.

Кістку фіксували в розчині глютаральдегіду протягом доби та зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації (50 - 70 - 80 - 90 і 100%). Підготовлену поверхню напилювали сріблом в стандартній вакуумній установці ВУП-5. Проводили вивчення кількісного вмісту кальцію, фосфору та мікроелементів, що входять до складу імплантатів на поверхні кістки в 3-х точках – безпосередньо в періімплантаційній зоні, в тканині проксимального епіфізу та в середині діафізу.

Отримані цифрові дані оброблялися методом варіаційної статистики за допомогою програми для обробки статистичної інформації IBM SPSS Statistics 21 з використанням параметричних методів (порівняння середніх за допомогою t-тесту). Відмінності вважали значущими з рівнем ймовірності не менше 95% ( $p \leq 0,05$ ).

#### Результати та їх обговорення

Растрова електронна мікроскопія ділянок стегнової кістки в різні терміни після формування дірчастого дефекту свідчить про активізацію процесів ремоделювання, що виявляється у витонченні трабекул губчастої речовини, втрата кальцію та фосфору як в зоні дефекту, так і на віддалених ділянках. Через 6 місяців після травми відбувається відновлення будови та хімічного складу всіх досліджуваних ділянках (рис. 1). Подібні результати були отримані на різних тваринних моделях, таких як щурі та собаки [9, 10]. Проте, за даними деяких авторів у деяких випадках фаза закінчення ремоделювання кісткової тканини може тривати до 1,5 року у великих тварин, таких як собаки [11]. У людини повне відновлення будови та функції тканини після травми залежить від вихідного стану кістки, фізичної активності, виду перелому та супутніх захворювань та триває від 6 до 24 місяців [12].

Растрова електронна мікроскопія періімплантаційної зони свідчить про формування немі-

нералізованої сполучнотканинної капсули навколо сплавів TiVT6 та КТЦ-125 через місяць після травми. Навколо сплаву КТЦ-125 з ГА спостерігається лише залишок сполучної тканини та формування грубоволокнистої низькомінералізова-

ної кісткової тканини навколо імплантату. Імплантація чистого низькомодульного титанцирконієвого сплаву та з гідроксиапатитним покриттям стимулює розвиток кісткової тканини навколо протезу в ранні терміни після травми.

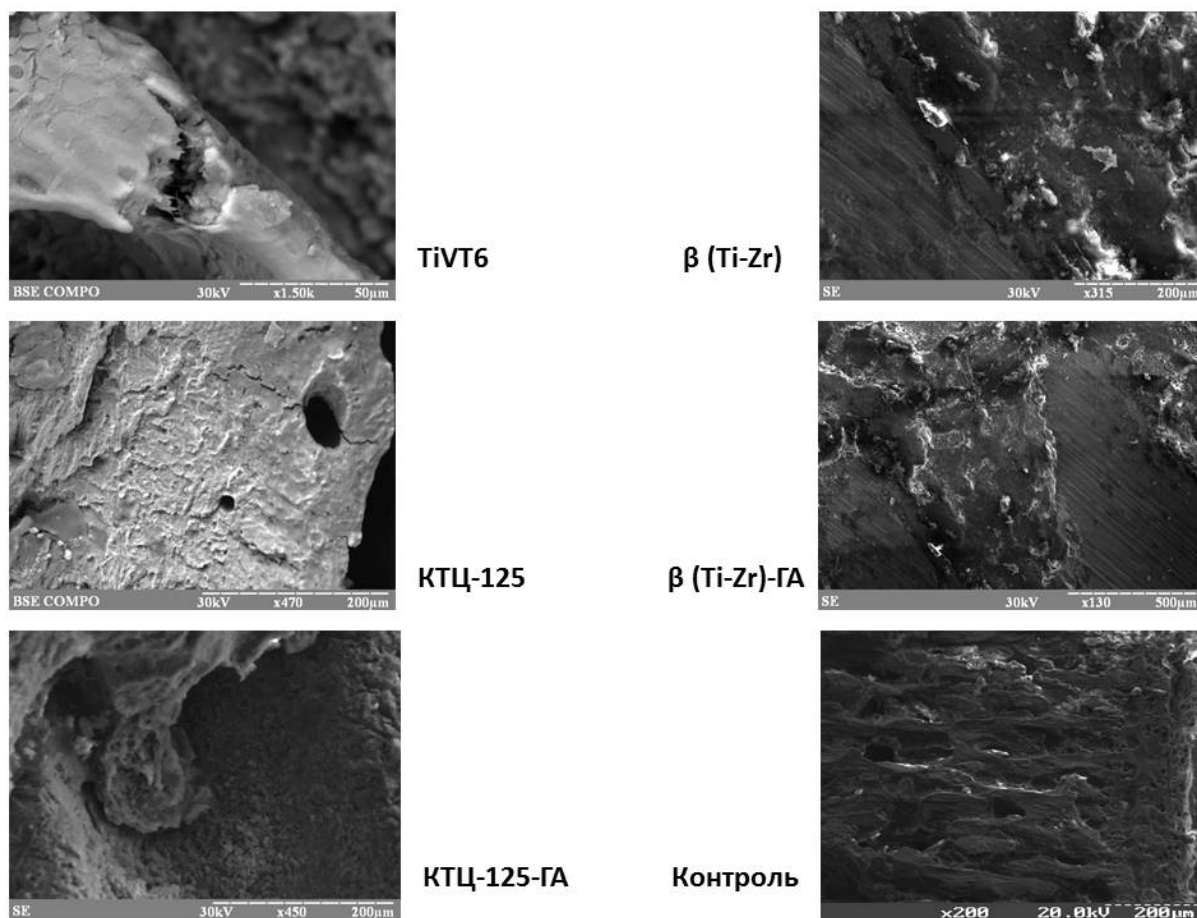


Рис. 1. Растрова електронна мікроскопія ділянки кістки навколо імплантату через 6 місяців після імплантації металів різного складу.

Характерною морфологічною особливістю периімплантаційної зони та віддалених ділянок кістки після імплантації металевих протезів є формування мікротріщин та мікропереломів. Мікротріщина визначається як дефект кісткової тканини в межах трабекули губчастої речовини чи пластинки компактної кістки. Розповсюдження дефекту за межі даних анатомічних утворень характеризується як мікроперелом і свідчить про глибокі порушення функції кістки. В нормі, механізми ремоделювання компенсують розвиток мікроструктурних дефектів, проте в умовах надлишкового навантаження або порушення процесів відновлення кісткового матриксу відбувається розвиток мікропереломів. Критична кількість мікроструктурних дефектів кістки може призвести до повноцінного перелому навіть при допороговому навантаженні. Імплантація високомодульних сплавів утворює градієнт міцності в системі імплантат-кістка, що призводить до утво-

рення значної кількості мікротріщин та подальших руйнування кісткової тканини. Нестабільність імплантату підсилює даний ефект.

У нашому експерименті спостерігається розвиток мікротріщин вже через місяць після імплантації сплаву TiVT6, який має найбільший модуль пружності. При імплантації сплаву КТЦ-125 утворення мікроструктурних дефектів відбувається на 3-му місяці після операції, що свідчить про більшу відповідність механічних параметрів сплаву кістковій тканині. Застосування гідроксиапатитного покриття створює умови для формування кісткової тканини навколо протезу і як наслідок цього – кращу фіксацію імплантату. Це зменшує кількість та інтенсивність механічних сигналів в процесі навантаження кінцівки і зменшує активність ремоделювання у порівнянні з «чистими» сплавами. Не зважаючи на це, ефект стресового зміщення присутній і при використанні гідроксиапатитного покриття сплаву КТЦ,

що виявляється у формуванні мікротріщин трабекул та кісткових пластинок навіть у віддалених ділянках кістки.

$\beta$  (Ti-Zr), на відміну від попередніх має найменший модуль пружності, який наближається до кісткової тканини [4]. Тому імплантація даного сплаву призводить лише до появи мікротріщин в періімплантаційній зоні через півроку після операції. Нанесення гідроксиапатитного покриття покращує інтеграцію імплантату та зменшує кількість мікротріщин, які візуалізуються лише в деяких препаратах в періімплантаційній зоні.

Растрова електронна мікроскопія виявила зменшення кальцію та фосфору в усіх ділянках стегнової кістки після формування дірчастого дефекту. Найбільші зміни спостерігаються в дис-

тальному епіфізі за рахунок утворення нової кісткової тканини. Остання має меншу ступінь мінералізації, яка досягає рівня інтактних тварин лише через півроку. В інших відділах кістки різниця з інтактними тваринами є менш значимою.

При імплантації металевих протезів відбувається достовірне зменшення вмісту кальцію в усіх серіях. При цьому рівень фосфору майже не змінюється. Найбільш значиме зменшення основного елементу кісткової тканин відбувається в періімплантаційній зоні, найменше – в проксимальному епіфізі. Рівень зменшення вмісту кальцію є майже однаковим в усіх експериментальних серіях. Проте, при використанні протезів з гідроксиапатитним покриттям частка втраченого кальцію є меншою у порівнянні з непокритими імплантатами (рис. 2).

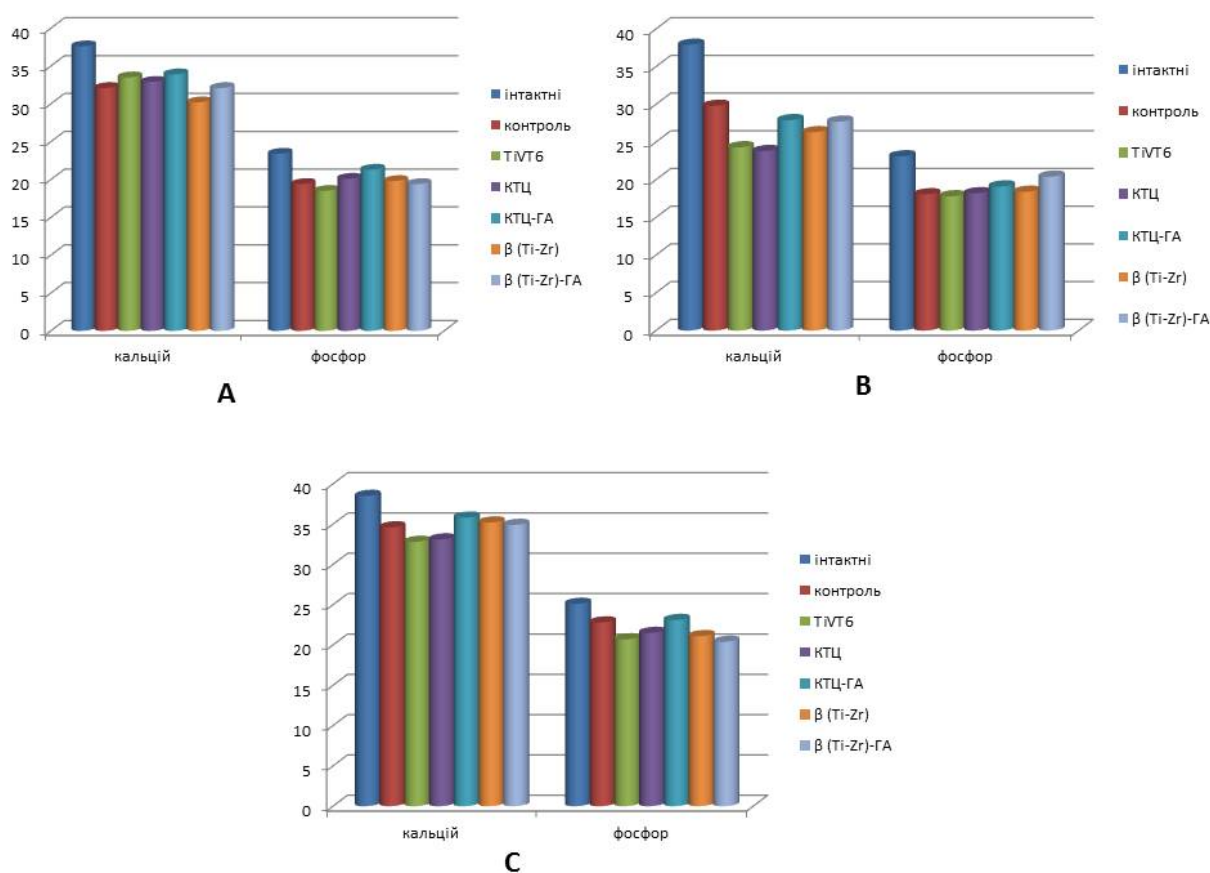


Рис. 2. Вміст кальцію та фосфору в діяфізі (А), дистальному (В) та проксимальному (С) епіфізах стегнових кісток тварин інтактною, контрольною та експериментальною серії через місяць спостереження.

Через 3 та 6 місяців відбувається відновлення рівню основних елементів кістки, проте в періімплантаційній зоні навколо сплавів TiVT6 та KTЦ-125 спостерігається їх частковий дефіцит.

Іншим механізмом зменшення кількості кальцію є його заміщення на іони металів, які входять до складу імплантатів. В експерименті доведено, що починаючи з першого місяця спостереження відмічається поява титану, ванадію, ніо-

бію та цирконію, які входять до складу імплантатів. Вивільнення металів, за даними літератури відбувається за рахунок процесів електрохімічного розчинення та механічного зносу [6]. Перший процес відбувається за рахунок контакту поверхні сплаву з іонами водню та ферментами, які вивільняються кістковими клітинами [8]. Знос імплантату можливий за умов його недостатньої фіксації та розвитку гіпермобільності

[4]. Найбільший відсоток вивільнення металів фіксується при імплантації сплаву TiVT6 та КТЦ-125. При цьому в різних концентраціях іони металів фіксуються як в періімплантаційній зоні, так і у віддалених ділянках кістки, що свідчить про їх міграцію в процесі перебудови кісткового матриксу.

Покриття сплаву КТЦ-125 гідроксиапатитом призводить до зменшення його корозії та вивільнення іонів цирконію та ніобію в оточуючі тканини.  $\beta$  (Ti-Zr) сплав є стійкий до корозії і кількість іонів металів в оточуючих тканинах є мінімальною, а використання гідроксиапатитного покриття створює додатковий бар'єр, який попереджає ранню ерозію сплаву.

#### Висновки

1. Імплантація в дистальний епіфіз сплаву TiVT6 та КТЦ-125 призводить до утворення сполучної тканини навколо простезу та активації процесів ремоделювання як в періімплантаційній зоні, так і на віддалених ділянках. Через 3 та 6 місяців після імплантації спостерігається наявність ознак ефекту стресового зміщення у вигляді мікротріщин та мікропереломів в усіх досліджуваних ділянках.

2. Введення в дистальний епіфіз сплаву  $\beta$ -(Ti-Zr), який має низький модуль пружності, наближений до кісткової тканини призводить до ранньої регресії сполучної тканини навколо імплантату, що підвищує його інтеграцію. Зменшення градієнту міцності в системі «імплантат-кісткова» тканина призводить до розвитку мінімальних змін структури та хімічного складу кістки в усі терміни спостереження.

3. Використання гідроксиапатиту в якості покриття металевих імплантатів запобігає утворенню сполучної капсули та стимулює розвиток кісткової тканини навколо простезу, що забезпечує його оптимальну фіксацію. Оптимізація процесів остеоінтеграції призводить до зменшення активності процесів ремоделювання та втрати кальцію. Гідроксиапатитне покриття  $\beta$ -(Ti-Zr) сплаву забезпечує відсутність ефекту стресового зміщення та розвиток мікрошкоджень кісткової тканини.

#### Перспективи подальших досліджень

Подальші дослідження будуть направлені на вивчення процесів ремоделювання кісткової тканини в залежності від типу металевого сплаву.

#### Літературні джерела References

1. Frost HM. The Utah paradigm of skeletal physiology: an overview of its insights for bone, cartilage and collagenous tissue organs. *J Bone Miner Metab.* 2000;18(6):305-16. PMID: 11052462.

2. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont.* 2004 Sep-Oct;17(5):536-43. PMID: 15543910.

3. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 2008 Apr;20(2):86-100. PMID: 18162407; PMCID: PMC2327202.

4. Joshi MG, Advani SG, Miller F, Santare MH. Analysis of a femoral hip prosthesis designed to reduce stress shielding. *J Biomech.* 2000 Dec;33(12):1655-62. PMID: 11006390.

5. Bai X, More K, Rouleau CM, Rabiei A. Functionally graded hydroxyapatite coatings doped with antibacterial components. *Acta Biomater.* 2010 Jun;6(6):2264-73. doi: 10.1016/j.actbio.2009.12.002. PMID: 19969112.

6. de Jonge LT, van den Beucken JJ, Leeuwenburgh SC, Hamers AA, Wolke JG, Jansen JA. In vitro responses to electrosprayed alkaline phosphatase/calcium phosphate composite coatings. *Acta Biomater.* 2009 Sep;5(7):2773-82. doi: 10.1016/j.actbio.2009.03.019. PMID: 19376000.

7. Dinda GP, Shin J, Mazumder J. Pulsed laser deposition of hydroxyapatite thin films on Ti-6Al-

4V: effect of heat treatment on structure and properties. *Acta Biomater.* 2009 Jun;5(5):1821-30. doi: 10.1016/j.actbio.2009.01.027. PMID: 19269271.

8. Lamers E, Walboomers XF, Domanski M, te Riet J, van Delft FC, Luttge R, Winnubst LA, Gardeniers HJ, Jansen JA. The influence of nanoscale grooved substrates on osteoblast behavior and extracellular matrix deposition. *Biomaterials.* 2010 Apr;31(12):3307-16. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.034. PMID: 20122723.

9. Mendonça G, Mendonça DB, Aragão FJ, Cooper LF. Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography. *Biomaterials.* 2008 Oct;29(28):3822-35. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.05.012. PMID: 18617258.

10. Ramakrishna S, Mayer J, Wintermantel E, Leong KW. Biomedical applications of polymer-composite materials: A review. *Compos Sci Technol.* 2001;61:1189-224.

11. Schliephake H, Scharnweber D. Chemical and biological functionalization of titanium for dental implants. *J Mater Chem.* 2008;18:2404-14.

12. Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorf J, Cochran DL, Boyan BD. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A.* 2005 Jul 1;74(1):49-58. PMID: 15924300.

**Зайцева Н.В. Структура и химический состав бедренной кости при имплантации металлических сплавов различного состава**

**Реферат.** Целью исследования было изучение структуры и химического состава травмированной кости методом растровой электронной микроскопии в различные сроки после имплантации металлических сплавов. Доказано, что имплантация в дистальный эпифиз сплава TiVT6 и КТЦ-125 приводит к образованию соединительной ткани вокруг простеза и активации процессов ремоделирования. Введение в дистальный эпифиз сплава  $\beta$ - (Ti-Zr) приводит к ранней регрессии соединительной ткани вокруг имплантата и развитию минимальных изменений структуры и химического состава кости во все сроки наблюдения. Использование гидроксиапатита в качестве покрытия металлических имплантатов предотвращает образование соединительной капсулы и стимулирует развитие костной ткани вокруг простеза, что обеспечивает его оптимальную фиксацию. Оптимизация процессов остеоинтеграции приводит к уменьшению активности процессов ремоделирования и потери кальция. Гидроксиапатитное покрытие  $\beta$ - (Ti-Zr) сплава обеспечивает отсутствие эффекта стрессового смещения и развитие микроповреждений костной ткани.

**Ключевые слова:** металлические сплавы, остеоинтеграция, растровая электронная микроскопия, химический состав.