

Методика пробоподготовки титансодержащих костно-имплантационных блоков для последующей оценки остеоинтеграции

Аннотация

Собакам замещали диафизарные дефекты костей голени ячеистым цилиндрическим биоактивным имплантатом из титанового сплава Ti6Al 4V. Костно-имплантационные блоки разрезали прецизионным отрезным станком. Использовали абразивные отрезные диски толщиной 0,76 мм (скорость вращения – 2000 об/мин; скорость подачи у образца № 1 – 12 мм/мин, № 2-4 – 5 мм/мин). При скорости подачи диска 12 мм/мин происходило термическое повреждение тканей. Из них в проекции полости дефекта 72,6 % было непригодно для гистологического исследования. При скорости подачи 5 мм/мин участки термического и значительного механического повреждения тканей не обнаружены. Выводы: на этапе пробоподготовки титансодержащих костно-имплантационных блоков для оценки остеоинтеграции степень сохранности тканей, при прочих равных условиях, зависит от скорости подачи режущего инструмента.

Введение

В настоящее время в травматологии и ортопедии достаточно перспективными являются технологии аддитивного (персонифицированного) производства костнозамещающих материалов и изделий [1]. Эффективность их использования, наряду с прочими факторами, предполагает формирование полной интеграции имплантата с костью, что в лучшей степени достигается при нанесении на изделия биоактивного покрытия [2], [3]. При тестировании ячеистых металлических структур отдельный интерес представляет морфофункциональное состояние тканей, образовавшихся непосредственно в ячейках имплантатов [4], [5]. Пробоподготовка подобного рода костно-имплантационных блоков для гистологического исследования предполагает их рассечение в продольном и поперечном направлениях. При этом качество поверхности среза и соответственно степень сохранности тканей могут зависеть от используемого оборудования, принадлежностей и режимов резки. Данное обстоятельство явилось обоснованием для выполнения соответствующих испытаний.

Цель исследования: подобрать оптимальные условия пробоподготовки титансодержащих костно-имплантационных блоков для последующей оценки процессов остеоинтеграции.

Материалы и методы

Осуществили продольные распилы костно-имплантационных блоков. Четыре образца (в последующем – № 1-4) были получены при выполнении экспериментов по замещению дефектов диафиза большеберцовой кости у собак с использованием ячеистого цилиндрического биоактивного имплантата для замещения циркулярных дефектов трубчатых костей [6]. Имплантаты были изготовлены для каждого животного индивидуально, по аддитивной технологии, из порошка титанового сплава Ti6Al 4V. Кальцийфосфатный слой наносили методом микродугового оксидирования на базе ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет».

Собак эвтаназировали через $(39,7 \pm 5,8)$ суток после операции, путем внутривенного введения летальных доз тиопентала натрия. Брали костно-имплантационные блоки, которые помещали в 10%-ный раствор нейтрального формалина на 10 суток. Высота каждого блока была не менее 40,0 мм. Затем их распиливали в продольном направлении абразивными отрезными дисками (диаметр – 178 мм, толщина – 0,76 мм) на прецизионном отрезном станке «IsoMet 4000» («Buehler», США). Скорость вращения дисков была 2000 об/мин при скорости подачи для образцов № 1 – 12 мм/мин, № 2-4 – 5 мм/мин. Резку выполняли за один проход с погружением диска в раствор Рингера, охлажденный до 4°C , подаваемый в зону резки со скоростью 3 л/мин. После выполнения распила режущий элемент (диск) заменяли новым.

Оценку поверхности срезов проводили визуально макроскопическим и микроанатомическим методами. Микроскопию образцов выполняли при помощи стереомикроскопа «AxioCam

ERC-5S» («Carl Zeiss», Германия). Электронные изображения поверхности распилов подвергали количественному анализу при помощи программы «Digimizer 4.5.2» («MedCalc Software bvba», Бельгия). Определяли общую площадь ($S_{общ}$, мкм²) пригодной, непригодной и частично пригодной для морфологического исследования костной ткани и тканей, образованных в ячейках имплантата. Проводили морфометрию артефактов в виде борозд, трещин и царапин. Оценивали их ширину (мкм) и протяженность. При наличии сосудов определяли их диаметр (мкм).

Полученные количественные данные подвергали статистической обработке с использованием программы «AtteStat 13.1» (Россия). Методом описательной статистики определяли средние значения (M) и стандартное отклонение (SD).

Все манипуляции на животных осуществляли в соответствии с требованиями СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» и Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей.

Результаты

При макроскопической и микроанатомической оценке продольного среза образца № 1 (скорость подачи отрезного диска – 12 мм/мин) наблюдали участки термического повреждения мягких и костной тканей черного или темно-бурого цвета. Они, как правило, локализовались в области контакта тканевых компонентов с периферической поверхностью имплантата и с его стенками в проекции полости дефекта (рис. 1а).

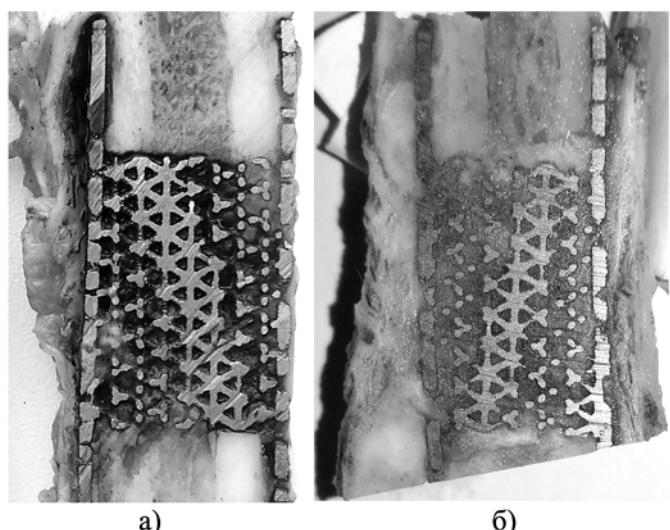


Рис. 1. Фотографии поверхностей продольных срезов костно-имплантационных блоков при скорости подачи отрезного диска: а) 12 мм/мин; б) 5 мм/мин

Выявляли зоны с отслоением тканей от титансодержащей подложки (рис. 2а). Определяли наличие перфорационных борозд различной протяженности и глубины как на металлической основе, так и на поверхности коркового слоя концов отломков (рис. 2б). Их ширина в среднем составляла ($253,2 \pm 78,8$) мкм. В некоторых участках ткани были частично или полностью деструктурированы в результате белковой денатурации, в других – обуглены или полностью выгорали (рис. 2в). На поверхности среза полости дефекта ($S_{\text{общ}} = 461,3$ мм²) была представлена стенками имплантата и тканями, заполняющими его ячейки. Определили, что пригодные для последующего исследования зоны, без признаков термического повреждения (цвет приближен к тканям костномозговых каналов отломков), чаще локализовались вблизи контакта костных отломков с торцевыми поверхностями изделия и занимали $S_{\text{общ}} = 44,9$ мм². Непригодными для исследования считали участки черного или темно-бурого цвета ($S_{\text{общ}} = 174,0$ мм²) с полностью выгоревшими либо подвергшимися значительному термическому воздействию тканями. К частично пригодным отнесли полости ячеек, в которых наблюдали деструктурированные участки лишь на границе контакта образованного субстрата с металлической стенкой ($S_{\text{общ}} = 20,7$ мм²).

Учитывая полученный неудовлетворительный результат в первом случае, для выполнения последующих резов (образцы № 2-4) уменьшили скорость подачи отрезного диска до 5 мм/мин. В этих наблюдениях также выявляли наличие неглубоких перфорационных бороздок и царапин шириной ($36,9 \pm 14,9$) мкм на поверхности корковых пластинок концов отломков и на металлической основе. Однако количество таких бороздок было гораздо меньше, чем у костно-имплантационного блока № 1. Определили, что поверхность срезов была ровной, гладкой. Все ячейки были заполнены новообразованным тканевым субстратом (рис. 1б). Не обнаруживали признаки термического повреждения и отслаивания тканей от стенок имплантатов как по периферии, так и в полостях ячеек

(рис. 3а, б). При больших увеличениях в полостях некоторых ячеек, расположенных ближе к периферии, определяли наличие мелких кровеносных сосудов диаметром ($76,5 \pm 27,1$) мкм (рис. 3в). Сосуды более крупного калибра, диаметром ($161,3 \pm 16,2$) мкм, врастали в полость дефекта со стороны костномозговых каналов отломков.

Известно, что в клинической практике качество подготовки поверхности кости может определять исход лечения. Это связано с тем, что в процессе сверления либо распила костная ткань подвергается воздействию высоких температур, которые могут являться причиной возникновения остеонекроза на границе имплантат-кость. Пороговым значением принято считать температуру нагрева костной ткани не выше 47 °С [7]. Отмечено, что снизить степень подобного негативного влияния возможно путем внешнего орошения охлаждающими растворами. Не последнюю роль играет качество режущего края у ортопедического инструментария и правильно подобранные режимы резки [8]-[10].

Очевидно, что такие проблемы могут возникать и в условиях экспериментальных испытаний новых технологий. Это относится не только к процессу выполнения хирургических манипуляций, но также имеет значение при подготовке анатомических препаратов, в том числе металлоконтактирующих костно-имплантационных блоков для гистологического исследования. Их рассечение неизбежно будет сопровождаться повышенным выделением тепла. Неадекватно подобранные режимы резки могут привести к термическому повреждению тканевых структур, состояние которых может стать непригодным для выполнения гистологических, биохимических, биомеханических и прочих исследований.

Работы, в которых есть сведения об используемом способе проподготовки опорных тканей и костно-имплантационных блоков при проведении доклинических испытаний, немногочисленны. В них, как правило, указывается вид оборудования и инструментария и мало внимания уделяется режимам обра-

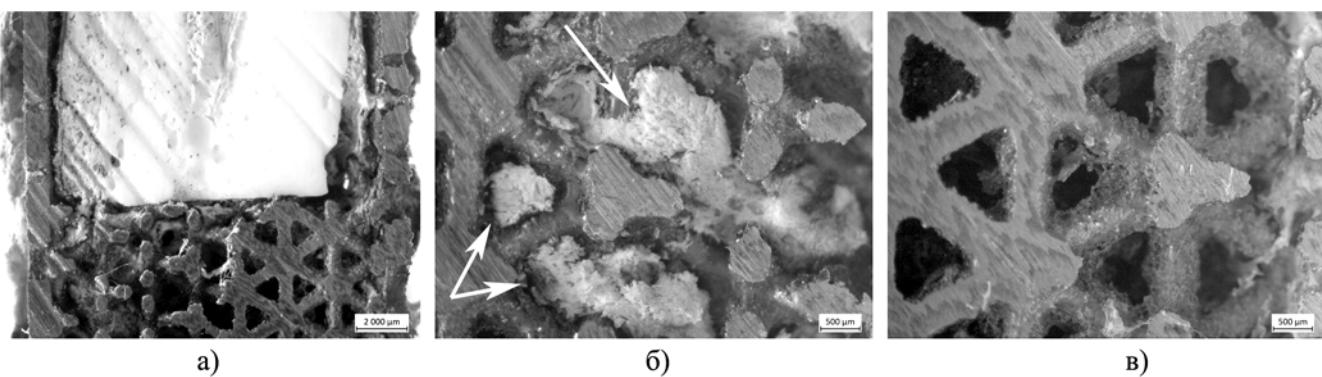


Рис. 2. Выраженность артефактов в костно-имплантационном блоке при скорости подачи диска 12 мм/мин:
а) различные варианты термического повреждения тканей; б) тканевой субстрат в срединной части блока (одна стрелка – неповрежденный участок; двойная стрелка – краевое обгорание); в) участок имплантата с выгоревшим тканевым субстратом в дистальной части образца [увеличение: а) 6,5x; б) и в) 20x]

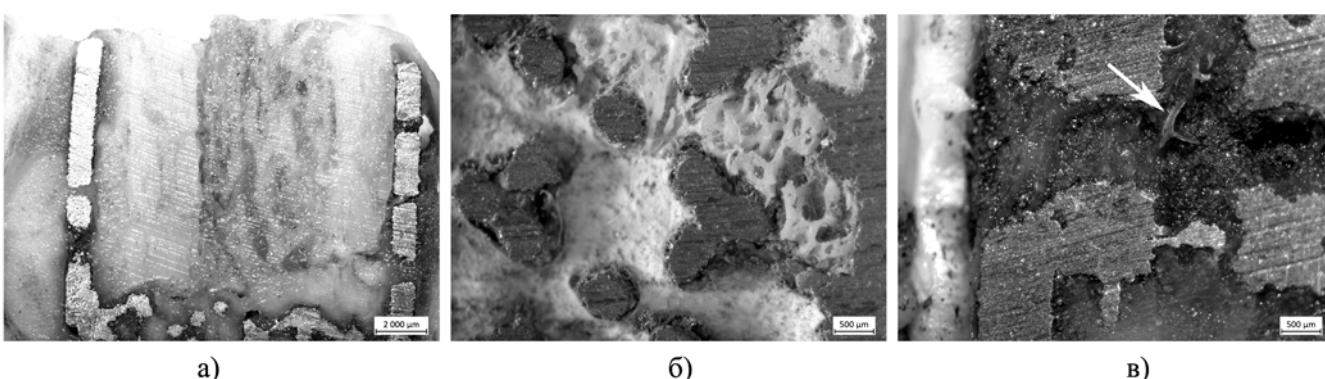


Рис. 3. Структуры костно-имплантационного блока при скорости подачи диска 5 мм/мин: а) сохранность тканей костного отломка в контакте с металлом; б) интеграция тканевого субстрата с металлической поверхностью в ячейках имплантата; в) микрососуд (стрелка) в тканевом субстрате, заполняющем ячейки имплантата [увеличение: а) 6,5x; б) и в) 20x]

ботки [11]-[13]. Некоторые исследователи вели поиск оптимальных режимов, в частности для сверления кости. Эти исследования показали, что превышение пороговых температурных значений может произойти в случаях использования сверл диаметром 4,5 мм и высоких скоростей вращения (от 1140 об/мин и выше). При диаметре 2,5...3,2 мм и тех же скоростях, даже без охлаждения, критического повышения температуры кости не происходит. Также отмечается, что снижению теплового эффекта способствует увеличение скорости подачи сверла [14].

В выполненнном исследовании получили обратные результаты, анализ которых показал, что при меньшей скорости подачи (5 мм/мин) не происходило термического повреждения тканей как по периферии, так и внутри ячеек. Данный режим не оказал негативного влияния даже на состояние мелких новообразованных сосудов. Напротив, увеличение скорости подачи диска в два раза (до 12 мм/мин) привело к негативным последствиям. Значительная по площади поверхность тканей, особенно в полостях ячеек, была подвергнута тепловому воздействию; из них 72,6 % были непригодны для дальнейшего гистологического исследования. На долю частично пригодных пришлось 8,6 %, а термически неповрежденными оказались лишь 18,7 % тканей. Очевидно, что такое неудовлетворительное качество поверхности срезов является неприемлемым для получения объективной оценки эффективности тестируемого изделия, особенно в аспекте изучения процессов остеointеграции.

Заключение

Таким образом, сделали заключение о том, что на этапе пробоподготовки титанодержащих костно-имплантационных блоков, в том числе для оценки остеоинтеграции, степень сохранности тканей, при прочих равных условиях, зависит от скорости подачи режущего инструмента. Это необходимо учитывать при проведении соответствующих доклинических испытаний.

Работа проведена в рамках программы НИР государственного задания, выполняемого в текущем периоде.

Список литературы:

1. Котельников Г.П., Колсанов А.В., Николаенко А.Н., Волова Л.Т., Россинская В.В., Болтовская В.В., Попов Н.В., Щербовских А.Е., Приходько С.А. Тестирование аддитивных материалов на культурах клеток фибробластов человека // Клин. и эксперимент. хир. журн. им. акад. Б.В. Петровского. 2018. Т. 6. № 2. С. 67-73.
2. Вишневский А.А., Казбанов В.В., Баталов М.С. Перспективы применения титановых имплантатов с заданными осзтогенными свойствами // Хирургия позвоночника. 2016. Т. 13. № 1. С. 50-58.
3. Кацуро В.А., Фомина М.А., Родионов И.В., Фомин А.А. Нанопористая структура покрытий, сформированных газотермическим напылением электрокорунда и последующим микродуговым оксидированием на имплантатах из титанового сплава ВТ6 // Медицинская техника. 2016. № 1. С. 38-41.
4. Кононович Н.А., Попков А.В., Попков Д.А., Шастов А.Л. Рентгенологическая динамика костеобразования при замещении диафизарных дефектов костей голени биоактивным ячеистым имплантатом // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2018. Т. 236. № 4. С. 105-111.
5. Василюк В.П., Штраубе Г.И., Четверных В.А. Оптимизация хирургического лечения частичных и полных дефектов челюстей с применением ячеистых структур из титана в эксперименте // Современные проблемы науки и образования. 2017. № 3. С. 24.
6. Попков А.В., Попков Д.А., Твердохлебов С.И., Кононович Н.А. Ячеистый цилиндрический биоактивный имплантат для замещения циркулярных дефектов трубчатых костей / Патент 171823 Рос. Федерации: МПК: A61F 2/28; зая-

витель и патентообладатель ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России. № 2016152351; заявл. 28.12.2016; опубл. 16.06.2017. Бюл. № 17.

7. Li X., Zhu W., Wang J., Deng Y. Optimization of bone drilling process based on finite element analysis // Applied Thermal Engineering. 2016. Vol. 108. PP. 211-220.
8. Hsiung J.C., Kung H.K., Chen H.S. Application of Cryogenic Treatment to Enhance the Property of a Bone Saw Blade // Life Science Journal. 2014. Vol. 11. № 10. PP. 1160-1165.
9. Lee Ju Eun, Chavez C.L., Park J. Parameters affecting mechanical and thermal responses in bone drilling: A review // Journal of Biomechanics. 2018. Vol. 71. № 11. PP. 4-21.
10. Wallace R.J., Spadaccino A., Leung A., Pan Z., Ganilova O., Muir A., Lucas M., Simpson A.H.R.W. A Comparison of Past, Present and Future Bone Surgery Tools // International Journal of Orthopaedics. 2015. Vol. 2. № 3. PP. 266-269.
11. Маланин А.Д., Жуликов А.Л., Новочадов В.В. Морфологическая характеристика регенераторов после холодноплазменной обработки экспериментальных неполнослойных повреждений гиалинового хряща // Вестник ВолГУ. Серия 11. 2011. № 2 (2). С. 8-15.
12. Celarek A., Kraus T., Tschech E.K., Fischerauer S.F., Stanzl-Tschech S., Uggowitzer P.J., Weinberg A.M. PHB, crystalline and amorphous magnesium alloys: Promising candidates for bioresorbable osteosynthesis implants? // Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl. 2012. Aug. 1. Vol. 32 (6). PP. 1503-1510.
13. Eshet Y., Mann R.R., Anatov A., Yacoby T., Gefen A., Jerby E. Microwave Drilling of Bones // IEEE Transactions on Biomedical Engineering. 2006. Vol. 53. № 6. PP. 1174-1182.
14. Augustin G., Davila S., Udilljak T., Staroveski T., Brezak D., Babic S. Temperature changes during cortical bone drilling with a newly designed step drill and an internally cooled drill // International Orthopaedics. 2012. Vol. 36. № 7. PP. 1449-1456.

Наталья Андреевна Кононович,
канд. вет. наук, вед. научный сотрудник,
экспериментальная лаборатория,
ФГБУ «Российский научный центр
«Восстановительная травматология и ортопедия»
им. акад. Г.А. Илизарова» Министерства
здравоохранения Российской Федерации,
г. Курган,

Юрий Юрьевич Литвинов,
зам. руководителя Научно-исследовательского
и учебно-методического центра биомедицинских технологий,
ст. научный сотрудник,
отдел специальных работ,
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский
институт лекарственных и ароматических
растений» Минобрнауки России,
г. Москва,

Елена Николаевна Горбач,
канд. биолог. наук, вед. научный сотрудник,
лаборатория морфологии,
Арнольд Васильевич Попков,
д-р мед. наук, профессор,
гл. научный сотрудник,
лаборатория коррекции деформаций и удлинения конечностей,
ФГБУ «Российский научный центр
«Восстановительная травматология и ортопедия»
им. акад. Г.А. Илизарова» Министерства
здравоохранения Российской Федерации,
г. Курган,

Виталий Викторович Краснов,
д-р биолог. наук, зам. руководителя,
зав. отделом медико-биологических проблем,
НИЦ БМТ ФГБНУ ВИЛАР,
г. Москва,

e-mail: n.a.kononovich@mail.ru