



ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ И ГИСТОМОРФОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОСТНОЙ ИНТЕГРАЦИИ ПОРИСТОГО NiTi, ИСПОЛЬЗУЕМОГО В КАЧЕСТВЕ ИМПЛАНТАТА ДЛЯ МЕЖТЕЛОВОГО СПОНДИЛОДЕЗА

Ф. Ликиби^{1,2}, С. Шафрент¹, М. Ассад³, Ч. Коуллард¹, Г. Шабо¹, Ч.-Х. Ривард^{1,2,3}

¹Hopital Sainte-Justine, Centre de Recherche, Montreal (QC), Canada

²Institut de Genie Biomedical, Ecole Polytechnique/Universite de Montreal, Montreal (QC), Canada

³Biorthex Inc., Montreal (QC), Canada

Имплантат для межтелового спондилодеза из пористого никелида титана (ПНТ) исследовался в эксперименте на овцах. Шестнадцать овцам было установлено по два имплантата: один ПНТ и один системы Bagby and Kuslich (BAK). Цель исследования состояла в оценке костной интеграции, костной проводимости и роста кости в присутствии этих двух имплантатов, подвергаемых одинаковым механическим нагрузкам. После имплантации овцы выводились из эксперимента тремя группами: через три, шесть и двенадцать месяцев. Для исследования брались срезы кейджей и прилегающих тканей позвоночника, которые подвергались качественному (микроскопическое и визуальное исследование) и количественному (гистоморфометрия) анализу. Результаты показали, что ПНТ выполнил свою задачу лучше, чем BAK. Строгий статистический анализ этих результатов подтвердил наблюдение. Эффективность имплантатов зависела от биофункциональности, связанной со структурой и формой имплантата. Однако биологическая совместимость обоих имплантатов была сопоставима.

Ключевые слова: пористый никелид титана, BAK-кейдж, межтеловой спондилодез.

An implant for intervertebral fusion made of porous nickel-titanium (PNT) was evaluated in the ewe. Sixteen ewes received each one two implants: the system «Bagby and Kuslich» (BAK) being used as control and the PNT. The objective was to evaluate the osteointegration, osteoconduction and bone growth in the presence of these two cages subjected to the same mechanical loads. After implantation, the sheeps were sacrificed by group to three different periods: three, six and twelve months, and the spines carrying the implant were taken. The qualitative (microscopic and visual observation) and quantitative (histomorphometry) histological analyses were carried out on histological slices of cages and adjacent tissues. The results indicated that the PNT, had performed better than the BAK. A rigorous statistical analysis of these results made it possible to confirm this observation. The performance of two implants seemed to be influenced by the biofonctionnality which is related to the structure and the shape of the implant. The biocompatibility of two implants seemed however comparable.

Key words: porous nickel-titanium, Bagby and Kuslich implant, interbody fusion.

Введение

В последнее десятилетие не снижается биомедицинский интерес, вызванный внедрением пористого никелида титана (ПНТ) в медицину российскими и китайскими специалистами [2, 4, 5, 11]. Ключевые факторы, определяющие этот интерес, связаны с его механическими свойствами (модуль эластичности близок к кости и ее абсорбционной способности), капил-

лярностью, биологической совместимостью и сообщающейся пористостью, которая обеспечивает проникновение ткани [1, 3, 6]. В данном исследовании ПНТ использовался в качестве имплантата для межтелового спондилодеза при лечении приобретенной нестабильности позвоночника. Капиллярность ПНТ обеспечивает его увлажнение при диффузии физиологических жидкостей, переносящих питательные вещества и метаболиты,

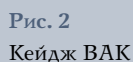
необходимые для питания костных клеток, мигрирующих из прилегающих позвонков в межпозвонковое пространство и в имплантат (костная интеграция). Эти костные клетки, мигрируя, могут быстро колонизировать (костная проводимость) доступное увлажненное пространство с питательными веществами, принесенными физиологическими жидкостями. Таким образом, результатом будет эффективное формирование кости вну-

В качестве модели использовалась овца. Отсутствие искривлений позвоночника (лордоза и кифоза), характерное для этого четвероногого животного, обеспечивает ему большую механическую вертикальную и горизонтальную устойчивость. Это позволяет удерживать позвоночник в горизонтальном положении без сгибания [8]. Четвероногое животное, таким образом, является превосходной моделью для исследования позвоночного столба.

Перед операцией 16 самок выдерживались без пищи в течение 48 часов. Вводная анестезия выполнялась кетаминном (50 мг/мл; 0,12 мл/кг; 6 мг/кг; Ayest Laboratories; Guelph, ONE, Canada) и эквивалентным введением валиума (диазепам; 5 мг/мл; 0,6 мг/кг; Sabex Inc, Boucherville, QC, Канада) внутривенно, с использованием катетера диаметром 20G. Анестезия поддерживалась эндотрахеальной интубацией с галотаном (1,0–1,5 % в O₂; MTC Pharmaceuticals, Cambridge, ONE, Canada).

Доступ к поясничному отделу осуществлялся из левосторонней забрюшинной области в положении животного на правом боку. Продольный разрез длиной 10–15 см выполнялся на уровне поперечных отростков. Кровопотеря контролировалась электрокоагуляцией. Внешние брюшные мышцы отделялись от поперечных отростков, что позволяло обнажить поясничную мышцу. Имплантат из ПНТ (рис. 1) устанавливался через доступ для переднего поясничного межтелового спондилодеза с использованием модифицированного инструментария для заднего поясничного межтелового спондилодеза [9, 10].

В межпозвонковое пространство вводились направлятели (примерно в середину диска), и выполнялось первоначальное просверливание. Фреза и винторезная головка доводились до замыкательной пластины, после чего с усилием внедрялся имплантат из ПНТ. Система ВАК (рис. 2), изготовленная из чистого титана, использовалась в качестве контрольного имплантата. Чистый титан (Ti) и сплав Ti-6Al-4V считаются биосовместимыми металлами с хорошим сопротивлением коррозии [13–15, 20, 21]. Поскольку ВАК – непористый имплантат, то он требует использования костного аутоотрансплантата из гребня подвздошной кости. ВАК устанавливался по тому же протоколу, что и ПНТ, – путем ввинчивания в нужном положении. Каждой овце имплантировались оба вида имплантатов с чередованием уровней L₂–L₃ и L₄–L₅,



чтобы каждый имплантат подвергался одинаковой механической нагрузке. Контрольная группа состояла из неоперированных овец. Рана ушивалась послойно рассасывающимся материалом. Послеоперационный контроль расположения имплантатов в поясничном отделе позвоночника осуществлялся рентгенографически.

Овцы выводились из эксперимента группами: две группы по семь овец (шесть с имплантатами и одна контрольная) через три и шесть месяцев и третья из пяти овец (четыре с имплантатами и одна контрольная) через двенадцать месяцев. Для этих целей использовался Euthanal (0,1мг/кг; MTC Pharmaceuticals, Cambridge, ONE, Canada) и игла 20G.

Поясничный отдел (L₁–L₆) удалялся и немедленно фиксировался в нейтральном формалине (10 %). Препараты промывались и хранились в 70 % этаноле. Затем они обезжизивались последовательно в 80, 95 и 100 % этаноловых ваннах и очищались ксилолом. С помощью пилы Exakt (Exakt Technologies, Oklahoma City, OK, USA) делались срезы толщиной 70μм, содержащие металлический имплантат, костную и волокнистую ткани. Затем каждый срез окрашивался синим по Стевенелу (мягкие ткани) и по Ван-Гизону с пикрофуксином (кальцинированная костная ткань) [17, 18].

Макроскопический анализ. Полный макроскопический анализ гистологических срезов выполнялся с использованием цифровой камеры (Nikon Model E950). Непосредственный контакт костного матрикса с имплантатом являлся критерием полного костного сращения. Наличие твердой и мягкой ткани на периферии имплантата рассматривалось как неполное сращение, а присутствие в этой области только мягкой ткани – как отсутствие сращения.

Статистический анализ. Для выявления статистически значимых различий между сращениями этих имплантатов были выполнены одномерные анализы с использованием точных критериев хи-квадрат и Фишера.

Микроскопный анализ. Структурное изменение и клеточная активность в имплантате и на его периферии оценивались с использованием трансмиссионной световой микроскопии (Leica DMLP).

Гистоморфометрическая оценка. Для гистоморфометрической оценки

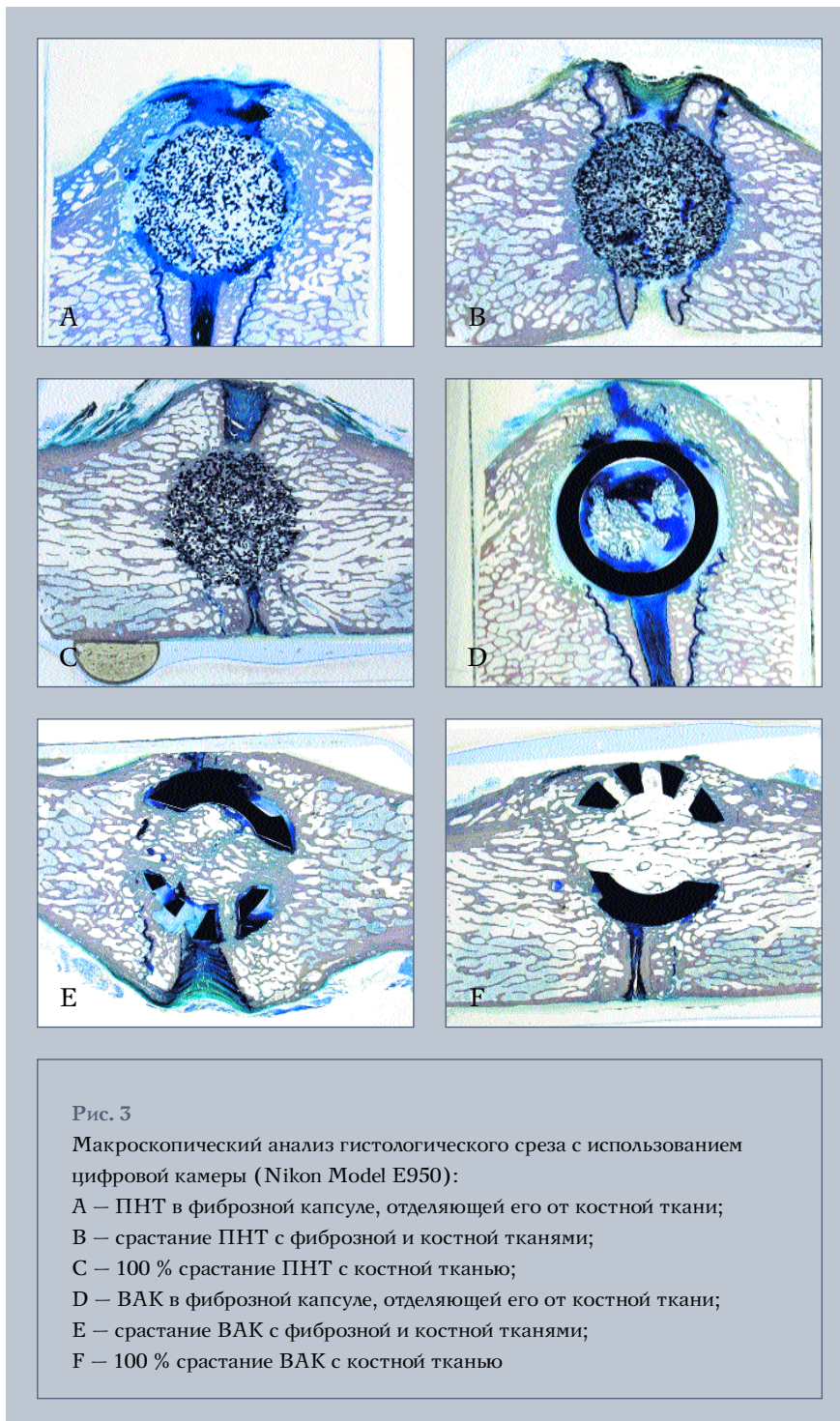
использовался метод, описанный Assad и др. [19]. Срезы изучались с использованием трансмиссионного светового микроскопа (Nikon Model Eclipse ME-600D) с цветной аналоговой камерой (Sony DXC-950P; Clemex Analysis Image) и программным обеспечением анализа изображения (Clemex VisionTM 3.0;

Clemex Image Analysis). Обработка состояла в предварительном выборе определенного цвета для каждой зоны (структуры): кальцинированной костной ткани, мягкой ткани, металла – кости, металла – мягкой ткани. Компьютер давал процентное содержание каждого цвета, представляющего ту или иную структуру. Для определения различий между двумя имплантатами был выполнен статистический анализ с использованием критерия Стьюдента.

Результаты

Макроскопический анализ (рис. 3) показал, что большинство имплантатов из ПНТ (15/16, 93,7 %, табл. 1) демонстрируют костную интеграцию и прямой контакт с костным матриксом, тогда как только 3 из 16 титановых имплантатов (18,75 %, табл.1) имели полное костное сращение. Продолжительность имплантации также, видимо, оказывала воздействие на интеграцию. Соединение ПНТ с костью к 3 и 6 мес. было лучшим, чем соединение ВАК ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, табл. 1); к 12 мес. это различие не было статистически значимым. Гистоморфометрический анализ (табл. 2) подтвердил результаты макроскопических наблюдений. Различие в количестве прилежащей костной ткани у двух имплантатов статистически значимо во времени ($p \leq 0,01$, табл. 2). Различие в интеграции кости у двух имплантатов статистически значимо в 6 и 12 мес., тогда как для срока в 3 мес. разницы не наблюдалось.

По периферии имплантата из ПНТ микроскопический анализ выявил присутствие либо остеобластов, либо волокон мягких тканей (рис. 4). Последние были ориентированы перпендикулярно к поверхности независимо от срока имплантации (рис. 4М). Остеобласты активно синтезировали костный матрикс. Имплантаты ВАК были окружены мягкой тканью, хондроцитами и остеокластами. В 3 мес. волокна ткани располагались параллельно поверхности имплантата ВАК (рис. 4N). Начиная с 6 мес. (рис. 4O), их ориентация медленно менялась на перпендикулярную. Эта переориента-



ция заканчивалась через 12 мес. после наложения инструментария (рис. 4Р), что приводило к эффективной остеоинтеграции.

Обсуждение

Гистологический анализ дал возможность проверить вышеуказанные предположения на тканевом и клеточном уровнях. В присутствии ПНТ формирование кости было весьма

эффективно уже к 3 мес. (рис. 4Г, Н), и вокруг ПНТ не обнаруживалось активной зоны резорбции, когда мягкая ткань была все еще объемной (рис. 3А и 4Г). Это свидетельствует о том, что в условиях устойчивости и биосовместимости остеокластическая резорб-

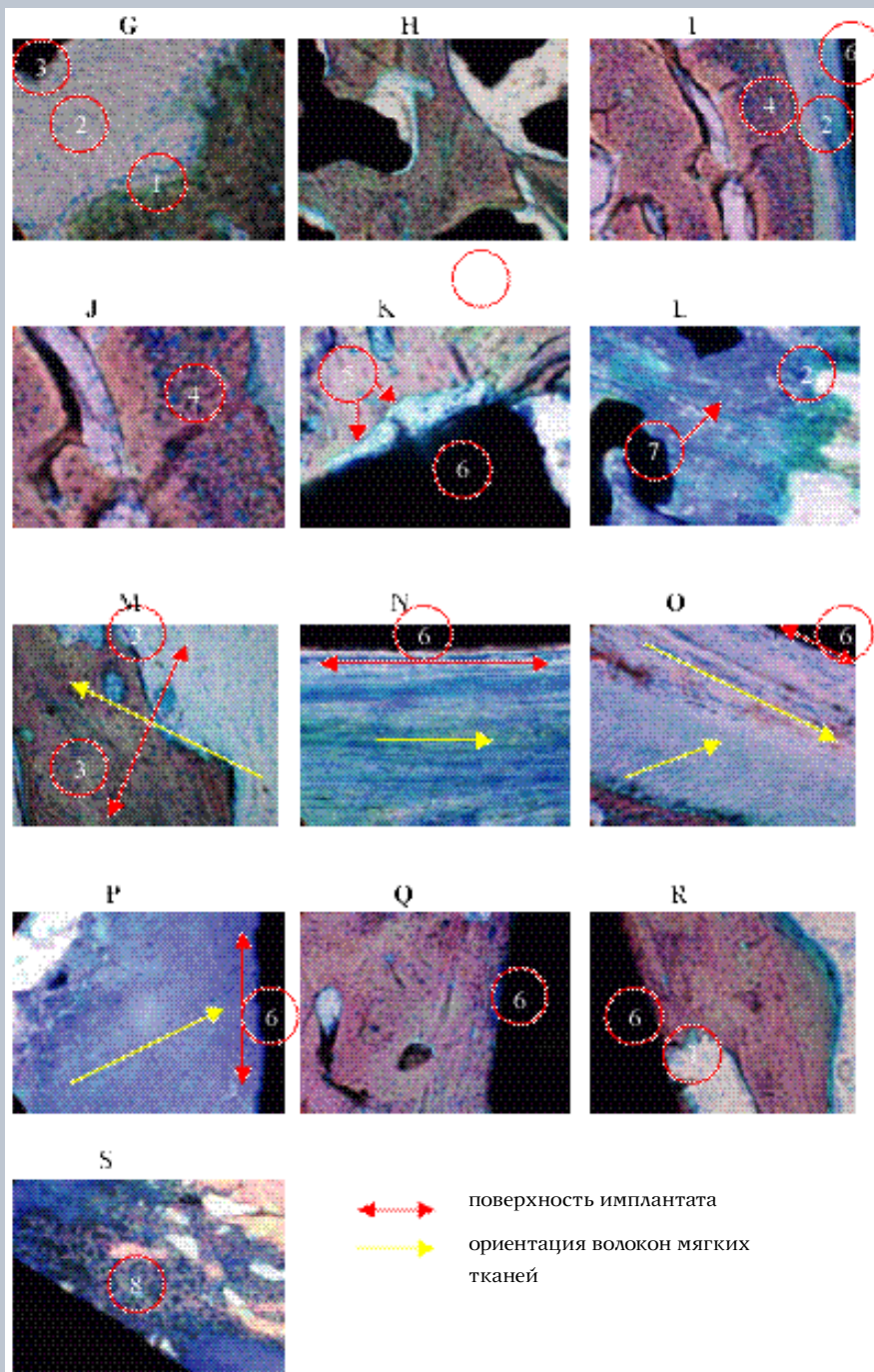


Рис. 4

Микроскопический анализ структурного изменения и клеточной активности в имплантате и по его периферии:
 Г — рост мягкой и костной тканей по периферии ПНТ;
 Н — рост и прилегание костной ткани при ПНТ;
 I, J — незрелая костная ткань вокруг ВАК;
 К, L — абсорбция кости вокруг ВАК;
 М — перпендикулярная ориентация волокон мягкой ткани по периферии ПНТ;
 N, O, P — ориентация волокон мягкой ткани по периферии ВАК через 3, 6 и 12 мес. соответственно;
 Q, R — костная фиксация ВАК и рост костной ткани через 12 мес. при ВАК;
 S — эндохондральная оссификация при ВАК;
 1 — остеобласты (синие зерна) в активном состоянии, расположенные по периферии кости;
 2 — мягкая ткань;
 3 — ПНТ;
 4 — незрелая костная ткань;
 5 — зона остеокластической резорбции;
 6 — ВАК;
 7 — остеокласты, абсорбирующие кость, контактирующую с ВАК;
 8 — эндохондральная оссификация, контактирующая с ВАК

Таблица 1
Статистические различия между ВАК и ПНТ

Тип сращения	Всего		3 мес.		6 мес.		12 мес.	
	ПНТ	ВАК	ПНТ	ВАК	ПНТ	ВАК	ПНТ	ВАК
Кость — имплантат	15 (93,7%)	3 (18,75%)	5 (83,3%)	0 (0 %)	6 (100%)	0 (0 %)	4 (100 %)	3 (75 %)
Волокнистая ткань — имплантат	1 (6,3 %)	13 (81,25%)	1 (16,6%)	6 (100 %)	0 (0 %)	6 (100 %)	0 (0 %)	1 (25 %)
Статистика	PJ0,01*		PJ0,05**		PJ0,01**		—	

*критерий Стьюдента; **точные критерии Фишера.

Таблица 2
Статистический анализ контакта с костным матриксом и остеоинтеграции имплантатов ВАК и ПНТ

Срок	Контакт с костным матриксом			Остеоинтеграция, %		
	ПНТ μ(DS)	ВАК μ(DS)	P	ПНТ μ(DS)	ВАК μ(DS)	P
3 мес.	10,24 (9,1)	3,49 (2,24)	≤0,01*	21,18 (15,67)	22,1 (11,67)	—
6 мес.	25,69 (11,47)	1 (1,26)	≤0,01*	33,14 (15)	22,8 (13,17)	≤0,05*
12 мес.	26,9 (9,6)	5,21 (5,5)	≤0,01*	38,8 (10,11)	25 (6,6)	P≤0,01*

*критерий Стьюдента.

ция прекратилась. Вокруг ВАК резорбция кости происходила очень активно (рис. 4К и Л). На рис. 4И и J видна беспорядочная пролиферация костного матрикса, формирующего вокруг ВАК плохо организованную кость в тех зонах, где резорбция отсутствовала. Также наблюдалась очень высокая концентрация клеток, которые, судя по их большим размерам, видимо, являются хондроцитами, возможно смешанными с очень незначительным количеством остеоцитов. Наличие плохо организованной и незрелой кости, возможно, связано с окостенением мягкой ткани путем эндохондральной оссификации (рис. 4S).

В случае с ПНТ ситуация хорошо развивалась во времени, и к 6 мес. сращение кости и имплантата было почти полным. Уже к 3 мес. кость, контактирующая с имплантатом, была хорошо организована и имела пластинчатый характер (рис. 4Н). В слу-

чае с ВАК формирование той кости, которая наблюдается в 12 мес., видимо, начинается через 6 мес. после имплантации. При контакте с ВАК кость приобретает пластинчатую структуру к 12 мес. (рис. 4Q и R).

Несколько факторов, большинство из которых связано с особенностями поверхности, повлияло на эффективность функционирования этих двух моделей имплантатов. Жесткость ПНТ (модуль эластичности = 1,13 GPa) близка к жесткости кости (приблизительно 15 GPa), что обеспечивало хорошее распределение нагрузки [24, 25]. Значительно более высокая, чем у кости, жесткость титана (модуль эластичности = 110 GPa), видимо, вызвала неустойчивость и, таким образом, отсутствие окрашенности участков активного остеолиза вокруг имплантата и аккумуляцию мягкой ткани. Пористость, видимо, явилась решающим фактором эффективности функционирования ПНТ, обеспечивая его

интеграцию и быстрое врастание костной ткани. Другое свойство ПНТ, которое в большой степени способствовало его эффективности, – капиллярность. Физические характеристики поверхностей имплантата, видимо, влияли также и на волокна мягких тканей. Вокруг ПНТ эти волокна были направлены перпендикулярно имплантату (рис. 4М) во все периоды оценки, тогда как волокна вокруг ВАК имели разную ориентацию в зависимости от срока. В 3 мес. они располагались параллельно имплантату, в 6 мес. начали менять ориентацию, которая к 12 мес. стала полностью перпендикулярной имплантату (рис. 4N, O и P), что совпадало с эффективным началом остеоинтеграции ВАК.

Объем кости в ПНТ составлял 21,4 % объема его пор. Поскольку ПНТ использовался без костного трансплантата, то очевидно, что эта масса кости была вновь сформирована из прилежающих позвонков. Этот объем по-

стоянно возрастал до 32,9 % к 6 мес. и до 37,61 % к 12 мес. (табл. 2). Объем кости в ВАК эволюционировал по-другому: с 22,7 % в 3 мес. он снизился до 21,7 % к 6 мес. и, наконец, достиг 25,4 % к 12 мес. (табл. 2).

Напомним, что ВАК использовался с костным трансплантатом, который на первом этапе обеспечивал преимущество в объеме костного материала. Уменьшение этого объема в период от 3 до 6 мес. можно объяснить некрозом трансплантата и отсутствием остеоинтеграции. Увеличение объема к 12 мес. можно отнести за счет формирования кости. Сращение кости и ВАК, отмеченное через 12 мес. в 75 % случаев, позволяет предположить, что формирование кости произошло за счет прилегающих позвонков.

Исключительная эффективность ПНТ выражалась в количестве прилегающей костной ткани (табл. 2): 11 % к 3 мес., 25,09 % к 6 мес. и 24, 87 %

к 12 мес. Эту нисходящую тенденцию, отмеченную в 12 месяцев, можно объяснить, помимо прочих причин, перепланированием кости при некрозе остецитов, вызванном хирургической травматической ишемией.

Количество костной ткани, прилегающей к ВАК, составило 3,31 % в 3 мес., 1,07 % в 6 мес. и 5,08 % в 12 мес. (табл. 2). Контакт между костным трансплантатом и ВАК, созданный хирургическим путем, видимо, был потерян, а контакт с новой костью формировался не так быстро, как у пористого NiTi.

Заключение

Это исследование показало биофункциональные особенности ВАК, связанные с его нестабильностью в месте имплантации. Нестабильный имплантат может мигрировать во всех направлениях и вызывать такие ос-

ложнения, как сосудистые нарушения, компрессию нервной ткани, остеолит и воспаление. Зона некроза и не снабжаемая кровью волокнистая ткань образуют область, в которой организм не оказывает эффективно-го сопротивления развитию инфекции. Сосудистые повреждения, вызванные миграцией имплантата, также становятся источниками инфекций, разносимых кровью. Стабильность ПНТ в месте имплантации и его быстрое сращение с костью оставляют меньше места для аккумуляции волокнистой ткани. На эффективность каждого имплантата повлияли также его структура и форма.

Литература

1. Shabalovskaya SA. On the nature of the biocompatibility and on medical applications of NiTi shape memory and superelastic alloys. *Biomed Mater Eng* 6: 267–289; 1996.
2. Gunter VE. Superelastic shape memory implants in maxillofacial surgery. *Traumatology, Orthopaedics and Neurosurgery*. Tomsk, Russia; 1995.
3. Perrkins J, Hodgson D. The two-way shape memory alloys, dans *Shape memory in engineering aspects of shape memory alloys*. Melton KN, Stockel D, Wayman CM, Duenrig TW, Butterworth-heinemann, London, UK: 195–206; 1990.
4. Brailovski V, Trochu F. Review of shape memory alloys medical applications in Russia. *Biomed Mater Eng* 6: 291–298; 1996.
5. Kuo PPF, Yang PJ, Zhang YF, Yang HB, Yu YF, Dai KR, Hong WQ, Ke MZ, Cai TD, Tao JC. The use of nickel-titanium alloy in orthopaedic surgery in China. *Orthopaedics* 12: 111–116; 1989.
6. Hernandez R, Polizu S, Turenne S, Yahia IH. Characteristics of porous nickel-titanium alloys for medical applications. *Biomed Mater Eng* 12: 37–45; 2002.
7. Gotthardt R, Lehnert T. Alliages a memoire de forme, dans *Materiaux emergents*. Vol. 19. Janot C, Iischner B. Presses polytechniques universitaires romandes, Suisse; 2001.
8. Smit TH. The use of quadruped as an in vivo model for the study of the spine - biomechanical considerations. *Eur Spine J* 11: 137–144; 2002.
9. Karpinski MR, Szymanska M. Posterior lumbar interbody fusion and cages. *Chir Narzadow Ruchu Ortop Pol* 64: 463–470; 1999.
10. Sandhu HS, Turner S, Kabo MJ, Kanim LEA, Liu D, Nourparvar A, Delamarter RB, Dawson EG. Distractive properties of a threaded interbody fusion device. *Spine* 21: 1201–1210; 1996.
11. Lu S. Medical applications of NiTi alloys in China, dans *Shape Memory in Engineering Aspects of Shape Memory Alloys*. Melton KN, Stockel D, Wayman CM, Duenrig TW, Butterworth-Heinemann, London, UK: 445–446; 1990.
12. Steffen T, Tsantrizos A, Fruth I, Aebi M. Cages: designs and concepts. *Eur Spine J* 9: S89–S94; 2000.
13. Kim TI, Han JH, Lee IS, Lee KH, Shin MC, Choi BB. New titanium alloys for biomaterials: a study of mechanical and corrosion properties and cytotoxicity. *Biomed Mater Eng* 7: 253–263; 1997.
14. Khan MA, Williams RL, Williams DF. Conjoint corrosion and wear in titanium alloys. *Biomaterials* 20: 765–772; 1999.
15. Yoda S, Sakurai Y, Endo A, Miyata T, Otake K, Yanagishita H, Tsuchiya T. TiO₂ montmorillonite composites via supercritical intercalation. *Chem Commun* 14: 1526–1527; 2002.
16. Hodges CD, Humphreys SC, Eck JC, Murphy RB. Intraoperative loosening of Bagby and Kuslich Cages during anterior lumbar interbody fusion. *J Spinal Disorders* 13: 535–537; 2000.
17. Meraw SJ, Reeve CM, Wollan PC. Use of alendronate in peri-implant defect regeneration. *J Periodontol* 70: 151–158; 1999.
18. Froum S, Cho SC, Rosenberg E, Rohrer M, Tarnow D. Histological comparison of healing extraction sockets implanted with bioactive glass or demineralized freeze-dried bone allograft: a pilot study. *J Periodontol* 73: 94–102; 2002.

19. **Assad M, Jarzem P, Leroux MA, Coillard C, Charette S, Rivard CH.** Porous nitinol for lumbar intervertebral fusion in a sheep model: part 1. Histomorphometric and radiological analysis. *J Biomed Mater Res* 64B: 107–120; 2003.
20. **Carvalho LC, Konig JB.** Histological findings of bone remodelling around smooth dental titanium implants inserted in rabbit's tibiae. *Ann Anat* 184: 359–362; 2002.
21. **Schroeder A, van der Zypen E, Stich H, Sutter F.** The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. *J Maxillofac Surg* 9: 15–25; 1981.
22. **Kuslich SD, Ulstrom CL, Griffith SL, Ahern JW, Dowdle JD.** The Bagby and Kuslich method of lumbar interbody fusion. History, techniques, and 2-years follow-up results of a United States prospective, multicenter trial. *Spine* 23: 1267–79; 1998.
23. **Bagby G.** The Bagby and Kuslich (BAK) method of lumbar interbody fusion. *Spine* 24: 1857; 1999.
24. **Gautier E, Perren SM, Cordey J.** Strain distribution in the plated and unplated sheep tibia: an in vivo experiment. *Injury* 31: C37–44; 2000.
25. **Glassman AH, Crowninshield RD, Schenck R, Herberts P.** A low stiffness composite biologically fixed prosthesis. *Clin Orthop* 393: 128–36; 2001.

Адрес для переписки:
Prof. Charles H. Rivard M.D.
Hopital Sainte-Justine
3175 Chemin Cote Ste-Catherine
Montreal, Canada