



УДК 617-089.844
ББК 54.5

АНАЛИЗ ОСТЕОИНТЕГРАЦИИ ТИТАНОВЫХ ИМПЛАНТАТОВ ПРИ ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ СТИМУЛЯЦИИ ИХ ПОВЕРХНОСТНОГО ОСТЕОИНДУКТИВНОГО ЭФФЕКТА

Бачурин Алексей Владимирович

Аспирант кафедры биоинженерии и биоинформатики
Волгоградского государственного университета
bachurin.a.v@gmail.com
Проспект Университетский, 100, 400062 г. Волгоград, Российская Федерация

Аннотация. В эксперименте на 14 белых крысах проанализировали остеointегративные свойства титановых имплантатов при дополнительной стимуляции их поверхностного остеоиндуктивного эффекта хитозаном и гидроксиапатитом. В результате было установлено, что титановые имплантаты с предварительным нанесением хитозана на их биоактивные поверхности имеют дополнительный остеокондуктивный эффект. Что позволяет считать данный метод обработки имплантатов перед постановкой в костную ткань перспективным в плане более полноценной и стабильной остеointеграции.

Ключевые слова: кость, титановые имплантаты, остеointеграция, хитозан, гидроксиапатит.

Введение

Технологии восстановления дефектов костной ткани при помощи металлических биосовместимых имплантатов применяется уже достаточно давно. Опыт исследователей предыдущих лет расширил представления об остеointеграции, как обязательном процессе для обеспечения функционирования системы «кость – имплантат» и ремоделирования прилежащей кости как залога долговечности функционирования этой системы. Процессы, нарушающие ремоделирование кости после имплантации титановых протезов, существенно снижают эффективность их применения и повышают риск отторжения имплантата [5; 10]. Более того, в клинической практике переходят от безнагрузочного периода заживления к немедленной или ранней нагрузки имплантата [7]. Поскольку стабильность имплантата является ключевым моментом в определении ранних или немедленных нагрузок, остеoint-

теграция должна быть проведена по возможности в максимально короткий срок. Это подчеркивает важность не только качества самого имплантата, но и процесса ускорения остеointеграции [1; 4].

Благодаря своей химической стабильности и биологической совместимости титановые имплантаты широко распространились в клинической практике. Химическая стабильность обуславливается формированием оксидной пленки (TiO_2) на поверхности имплантата. При этом ее толщина может быть искусственно увеличена посредством метода, называемого анодным окислением [9]. В зависимости от экспериментальных условий, свойства этого окисного слоя могут быть изменены с точки зрения химического состава и его трехмерно-пористой структуры. Эти поверхностные особенности поддерживают потенциал, чтобы улучшить рост кости по поверхности внедрения [11].

В последнее время новым трендом в восстановительной хирургии является управляемая остеоинтеграция, которая достижима только при наличии современных материалов и технологий. Технически это достигается различными методами создания трехмерно-пористой поверхности (электродуговое или плазменное напыление, микровзрывная техника, коррозирование и др.). При этом в качестве поверхностного слоя (покрытия) могут выступать частицы того же сплава, оксиды титана, тантала, гидроксиапатит или иные вещества [1; 3; 11].

В настоящее время предпринимаются активные попытки усилить остеоинтеграцию за счет включения в состав покрытий имплантатов композитных биорезорбируемых материалов нового поколения. Одним из перспективных биоматериалов для этого оказался хитозан, обладающий рядом свойств, которые могут вывести его на передовые позиции в протезировании: он не токсичен, обладает биосовместимостью, биорезорбируемостью и умеренными антибактериальными свойствами [8]. Получают хитозан из хитина и возможности технологии его получения пока полностью не исчерпаны. Выраженные хондро- и остеоиндуктивные эффекты трехмерно организованного хитозана подтверждены многочисленными экспериментами [2, 6]. Технологические моменты создания подобных поверхностей, равно как и результаты их остеоинтеграции *in vivo* в настоящее время активно изучаются.

Цель работы – проанализировать остеоинтегративные свойства титановых имплантатов при дополнительной стимуляции их поверхностного остеоиндуктивного эффекта хитозаном и гидроксиапатитом.

Материалы и методы исследования

Протокол экспериментов соответствовал этическим нормам, изложенным в «Международном кодексе медицинской этики» (1994), «Правилах работ с использованием экспериментальных животных» (GLP), Хельсинской декларации (2000), Директивах Европейского сообщества 86/609 ЕЕС.

Исследование проводили на 14 лабораторных животных – самцах крысы линии Вистар массой 300–320 г. Под наркозом (Золетил в дозе 40 мг/кг массы внутривенно)

из разреза кожных покровов до 5 мм по наружной поверхности нижней трети бедра животных путем прокола осуществляли чрезмышечный доступ к эпифизу бедренной кости. С помощью сверла диаметром 1,7 мм формировали канал глубиной 3,0 мм. Через 4 недели животных выводили из эксперимента передозировкой Золетила (200 мг/кг массы).

Животных разделили на две группы, в каждой по 5 крыс. В первой группе животных в канал вводили цилиндрический имплантат длиной 3 мм и диаметром 1.8 мм с комплексным трехмерным капиллярно-пористым (далее – ТКП) и гидроксиапатитным покрытием. Во второй группе дефекты были закрыты с помощью аналогичных имплантатов, предварительно обработанных с помощью катодного напыления мелкодисперсным гранулированным пористым хитозаном, полученным в лаборатории кафедры биоинженерии и биоинформатики Волгоградского государственного университета. Через несколько часов после операции животные могли активно передвигаться по клетке, а через несколько дней полностью опирались на оперированную конечность. В качестве контроля были исследованы 6 образцов тканей бедренной кости четырех интактных крыс, находящихся все время эксперимента в стандартных условиях того же вивария.

Для морфологического исследования забирали костный фрагмент в объеме нижней трети бедра. Материал фиксировали в 10 % забуференном нейтральном формалине в течение 24 часов, промывали 6 часов в проточной водопроводной воде комнатной температуры. Декальцинацию проводили в аналоге коммерческого препарата «Cal-Ex®» (Fisher Scientific), который представлял собой водный раствор 1,35 N соляной кислоты и 0,003 M ЭДТА полная декальцинация наступала через 15–20 часов. Промывкой в проточной воде до нейтральной реакции промывочных вод добивались полной отмычки материала от декальцинирующей жидкости. После быстрой проводки материала по спиртам и полного обезвоживания, последний через ксилол заключали в парафин. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, трехцветным методом по Масо-

ну, после чего заключали в канадский бальзам. Готовые препараты анализировали с использованием микроскопа БИМАМ Р-13 (Ломо, Россия) с фотокамерой ТК-С620Е (JVC, Japan). Морфометрический анализ проводили с применением программного обеспечения «ImageJ» (Vendor, США).

Помимо качественной характеристики описания дополняли расчетом количественных показателей структурной организации кости и тканей вокруг имплантата. Определяли толщину кортикального слоя кости (мкм), объемную долю губчатой кости ($\text{мм}^3/\text{мм}^3$), среднюю толщину костных трабекул (мкм), соединительную плотность ($1/\text{мм}^3$), толщину зоны остеоинтеграции (мкм) и долю костной ткани в этой зоне ($\text{мм}^3/\text{мм}^3$).

Обработку количественных данных проводили непосредственно из общей матрицы данных Excel (Microsoft, USA) с привлечением возможностей программ Statistica (StatSoft Inc., USA) с учетом общепринятых требований для медико-биологических исследований. Для анализа различий между выборками использовали критерий Манна-Уитни.

Результаты и обсуждения

На 4-й неделе эксперимента при гистологическом исследовании костной ткани вокруг имплантатов как в первой группе (применение гидроксиапатитного покрытия), так и во второй (обработанных хитозаном)

слой формирующейся фиброзной ткани содержал в себе множество остеогенных и хондрогенных участков. Граница ткани после удаления имплантата была неправильной формы с частичным отрывом тканей, что свидетельствовало о хорошей интеграции имплантата. Восстановление и ремоделирование окружающей костной ткани происходило достаточно интенсивно. В первой группе обнаруживался тонкий слой рыхлой соединительной ткани, богатой сосудами с очагами остеогенной ткани. В прилежащей костной ткани выявлялись небольшие участки остеокластической резорбции и, одновременно, цепочки остеобластов по краям костных балок, что свидетельствовало об активной перестройке костной ткани. Вокруг имплантатов, обработанных хитозаном, слой формирующейся фиброзной ткани содержал в себе множество остеогенных и хондрогенных участков. Гранулы хитозана были частично резорбированы. Граница ткани после удаления имплантата была неправильной формы с частичным отрывом тканей, что свидетельствовало о хорошей интеграции имплантата. Восстановление и ремоделирование окружающей костной ткани происходило очень интенсивно.

Данные количественного анализа экспрессии маркеров клеточной пролиферации через 4 недели после имплантации приведены в табл. 1.

Таблица 1

Экспрессия маркеров клеточной пролиферации, клеток остеогенного ряда и остеокластов в костной ткани, прилегающей к титановым имплантатам через 4 недели после имплантации ($M \pm m$)

Показатель	Группы		
	Контрольная	Имплантат с гидроксиапатитом	Имплантат с хитозаном
Толщина кортикального слоя кости, мкм	1237±79	1105±66,2	1195±73,2
Объемная доля губчатой кости, $\text{мм}^3/\text{мм}^3$	0,46±0,03	0,41±0,04	0,45±0,04
Толщина костных трабекул, мкм	272±13,0	312±17,0*	312±17,0*
Соединительная плотность, $1/\text{мм}^3$	2,41±0,16	1,99±0,12*	2,44±0,15*#
Толщина зоны остеоинтеграции, мкм	-	150±10,8	255±15,1#
Доля костной ткани в зоне остеоинтеграции, $\text{мм}^3/\text{мм}^3$	-	0,27±0,05	0,45±0,11#

Примечание. * – достоверные различия с величиной показателя в контрольной группе; # – достоверные различия между показателями в группах с имплантацией.

Как видно из этих данных, обработка поверхностей имплантата гидроксиапатитом сопровождалась достоверным увеличением толщины кортикальной пластинки бедренной кости вблизи зоны приживления. Выявлялся достоверный прирост объемной доли губчатой кости, поверхностной плотности ее трабекул и соединительной плотности. Регистрировалось содружественное увеличение численной плотности остеобластов, остеоцитов и остеокластов. В нашем опыте выявлен дополнительный остеокондуктивный эффект хитозана к достаточно выраженному эффекту, который доказан для биоактивной поверхности титановых имплантатов, покрытых гидроксиапатитом. По-видимому, дальнейшее улучшение остеоинтеграции таких имплантатов возможно только за счет местной доставки к остеоинтеграционной зоне специфических факторов роста и дифференцировки клеток.

Выводы

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при постановке в кость лабораторных животных титановых имплантатов с предварительным нанесением хитозана на их биоактивные поверхности, наблюдается дополнительный остеокондуктивный эффект, более интенсивное и опережающее по срокам новообразование костной ткани в остеоинтеграционной зоне в сочетании с морфологическими признаками выраженного ремоделирования и уплотнения окружающей костной ткани. Это позволяет считать данный метод обработки имплантатов перед постановкой в костную ткань перспективным, в плане более полноценной и стабильной остеоинтеграции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Калита, В. И. Модификация поверхностей внутрикостных имплантатов: современные исследова-

ния и нанотехнологии / В. И. Калита // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2009. – №4 (32). – С. 17–23.

2. Лябин, М. П. Совершенствование технологии получения хитозана / М. П. Лябин // Вестник Волгоградского государственного университета. Серия 11: Естественные науки. – 2011. – №2 (2). С. 17–22.

3. Митрошин, А. Н. Сравнительная оценка остеоинтеграции винтовых конических и цилиндрических титановых имплантатов, обработанных методом микродугового оксидирования / А. Н. Митрошин // Фундаментальные исследования. – 2011. – №9. – С. 447–451.

4. Новочадов, В. В. Остеоинтеграция имплантатов с биоактивной поверхностью, модифицированной напылением хитозана в эксперименте у крыс / В. В. Новочадов // Российский медико-биологический вестник им. академика И. П. Павлова. – 2013. – №2. – С. 30–35.

5. Новочадов, В. В. Ремоделирование костной ткани в условиях эндогенной интоксикации / В. В. Новочадов // Вестник Волгоградского государственного университета. Серия 11, Естественные науки. – 2012. – № 2 (4). – С. 19–28.

6. Chang, P. C. Evaluation of functional dynamics during osseointegration and regeneration associated with oral implants: a review / P. Chang // Clin. Oral Implants Res. – 2010. – № 21 (1). – P. 1–12.

7. Esposito, M. Interventions for replacing missing teeth: different times for loading dental implants / M. Esposito // Cochrane Database Syst. Rev. – 2009. – № 21.

8. Gaifullin, N. M. Recombinant bone morphogenetic protein 2 stimulates the remodeling chitosan-based porous scaffold into hyaline-like cartilage: study in heterotopic implantation / N. M. Gaifullin // European Journal of Molecular Biotechnology. – 2013. – № 1 (1). – P. 11–14.

9. Kim, K. Electrochemical surface modification of titanium in dentistry / K. Kim // J. Dent. Mater. – 2009. – № 28. P. 20–36.

10. Paquette, D. Risk factors for endosseous dental implant failure / D. Paquette // Dent. Clin. North Am. – 2006. – № 50. – P. 361–374

11. Variola, F. Nanoscale surface modifications of medically-relevant metals: state-of-the art and perspectives / F. Variola // Nanoscale. – 2011. – № 3 (2). – P. 335–353.

**ANALYSIS OF TITANIUM IMPLANTS OSSEOINTEGRATION
WITH ADDITIONAL STIMULATION OF THEIR OSTEOINDUCTIVE
SURFACE EFFECT**

Bachurin Aleksey Vladimirovich

Postgraduate Student, Bioengineering and Bioinformatics Department,
Volgograd State University
bachurin.a.v@gmail.com
Prospect Universitetsky, 100, 400062 Volgograd, Russian Federation

Abstract. The experiment was carried out on 14 rats; the author tried to analyze osteointegration properties of titanium implants with additional stimulation of their surface osteoinductive effect with chitosan and hydroxyapatite. The result showed that titanium implants with a preliminary application of chitosan on their bioactive surfaces have additional osteoconductive effect. That allows considering this method of implants treatment before placing them into bone promising in terms of more fulfilling and stable osteointegration.

Key words: bone, titanium implants, osseointegration, chitosan, hydroxyapatite.