

УДК 616.314-76:616.716.8-089

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАТИВНОСТЬ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ, РЕНТГЕНОЛОГИЧЕСКИХ И БИОМЕХАНИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ ОСТЕОИНТЕГРАЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

*В.И. Шемонаев<sup>1</sup>, В.В. Новочадов<sup>2</sup>, А.Ю.Алексеев<sup>2</sup>*<sup>1</sup> Волгоградский государственный медицинский университет (400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов,1),<sup>2</sup> Волгоградский государственный университет (400062, г. Волгоград, Университетский пр-т, 100)**Ключевые слова:** дентальная имплантация, экспериментальная модель.

### Сравнительная информативность морфологических, рентгенологических и биомеханических критериев остеointegrации в эксперименте

В.И. Шемонаев, В.В. Новочадов, А.Ю.Алексеев  
Волгоградский государственный медицинский университет (400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов,1), Волгоградский государственный университет (400062, г. Волгоград, Университетский пр-т, 100)

**Background.** Потребности стоматологической практики и прогресс медицинского материаловедения определяют высокую интенсивность экспериментальных исследований новых материалов и технологий в области дентальной имплантологии.

**Methods.** В эксперименте с постановкой винтовых титановых имплантатов в бедренные кости крыс через 4, 8 и 12 недель были изучены рентгенологические, механические и морфологические характеристики зоны остеointegrации.

**Results.** На рентгенограммах на 4-й неделе эксперимента была видна кольцевидная зона остеointegrации. При морфологическом исследовании здесь обнаруживался тонкий слой рыхлой соединительной ткани с очагами остеогенеза. К 12-й неделе остеointegrация была завершенной: вокруг титановых имплантатов обнаруживали плотный ламеллярный футляр с островками губчатой кости.

**Conclusion.** Общая положительная динамика остеointegrации и подтверждение остеокондуктивного эффекта свидетельствовали в пользу адекватности выбранной экспериментальной модели. Малое число корреляций между отдельными показателями методик исследования явилось основанием для рекомендации их использования только в комплексе: рентгенологическое исследование с радиальной денситометрией зоны остеointegrации, механическое аппаратное исследование подвижности имплантата и классическое морфологическое исследование, дополненное анализом зонального распределения плотности органического матрикса в зоне остеointegrации.

**Keywords:** дентальная имплантация, экспериментальная модель.

Pacific Medical Journal, 2014, No. 3, p. 00–00.

Потребности стоматологической практики и прогресс медицинского материаловедения определяют высокую интенсивность экспериментальных исследований новых материалов и технологий в области дентальной имплантологии. Основной биологический процесс, оптимизация которого рассматривается в рамках доказательства эффективности нового материала в данной области, – остеointegrация [4, 9]. Для ее обеспечения имплантаты изготавливаются из биосовместимых материалов (титана, циркония, сплавов на их основе), модифицируются для создания трехмерной биоактивной поверхности [2, 3, 11],

варьируется форма изделий, подключаются факторы роста и другие стимулы [5–8].

Благодаря прогрессу виртуального скрининга, модельных опытов и работ с клеточными культурами, экспериментальные исследования *in vivo* могут выполняться на весьма ограниченном числе животных, а перед экспериментатором ставятся принципиально новые задачи по количественной оценке динамики остеointegrации, сопоставлению ее с динамикой у материала сравнения, изменениях при динамических нагрузках или использовании целенаправленных управляющих воздействий. Бедренные кости грызунов гораздо чаще, судя по базе данных PubMed, используются для изучения остеointegrации дентальных имплантатов, чем челюсти или другие кости более крупных животных, совсем недавно считавшихся основными объектами для подобных экспериментов. Комплекс методов, необходимых на доклиническом этапе исследования новых материалов и технологий для дентальной имплантации, находится на стадии формирования. Наиболее информативным на сегодняшний момент считают сочетание рентгеноденситометрических, гистологических и механических (динамометрических) методик [8], но их сравнительная информативность требует дополнительного анализа.

Цель работы – сопоставление морфологических, рентгеноденситометрических и динамометрических критериев остеointegrации титановых дентальных имплантатов в эксперименте.

**Материал и методы.** Работа выполнена на белых лабораторных крысах-самцах линии Wistar массой от 180 до 240 г в соответствии с этическими нормами, изложенными в действующих «Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных» и «Директиве 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях». У 12 животных под наркозом (золетил, 40 мг/кг массы внутривенно) с помощью сверла формировали каналы в области диафиза бедренных костей (у всех – слева, через 4 недели у 7 из них – справа) диаметром 1,5 мм и глубиной 5 мм с отклонением оси канала от вертикали на 30°. В каналы методом закручивания были помещены фрагменты титановых винтовых имплантатов MIS BioCom (Израиль). Динамику восстановительного процесса прослеживали через 4, 8 и 12 недель после операции, в качестве контроля исследовали 6 образцов тканей

Шемонаев Виктор Иванович – канд. мед. наук, доцент, заведующий кафедрой ортопедической стоматологии ВолГМУ; e-mail: shemonaevvi@yandex.ru

бедренной кости интактных крыс, находившихся в стандартных условиях того же вивария. Животных выводили из эксперимента передозировкой золетила (200 мг/кг массы).

Рентгенографию отпрепарированных бедренных костей проводили с помощью портативного мобильного цифрового рентгеновского комплекса для стоматологии Orthophos XG 5 DX (Sirona). Динамометрические испытания включали в себя определение нагрузок, необходимых для вертикального смещения имплантата на 100 мкм вглубь (push-out), наружу (pull-out) и для начала выкручивания (removal torque) [8]. Для измерений использовали микродинамометры Г-0,5 и Г-5,0 производства ПГК «Гранат» (СПб., Россия) и насадки, обеспечивающие лазерно-оптический контроль смещения точки отслеживания на наружной поверхности имплантата. Все величины приводили к расчетной площади остеоинтеграции имплантата (0,488 см<sup>2</sup>).

Для изготовления гистологических препаратов материал фиксировали в 10 %-ном забуференном нейтральном формалине, декальцинацию проводили в растворе Cal-Ex (Fisher Scientific) [10]. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Готовые препараты анализировали с использованием микроскопа Leica DM 6000B и цифровой камеры Leica DFC 50C. Используя программу свободного доступа ImageJ (США), определяли объемную долю прилегающей губчатой кости, среднюю толщину костных трабекул, толщину зоны остеоинтеграции и объемную долю костной ткани в этой зоне. Для рентгеноденситометрии и оценки зонального распределения оптических плотностей на гистологических препаратах использовали оригинальную программу Radiana.

Обработку количественных данных выполняли непосредственно из общей матрицы данных Excel 7.0 с привлечением программы Statistica 6.0, учетом общепринятых требований для медико-биологических исследований. Рассчитывали средние величины и их ошибки, для анализа различий между выборками использовали критерий Манна–Уитни; проводили анализ корреляций.

**Результаты исследования.** На позитивных рентгенограммах между отчетливой контрастной границей имплантата и структурой губчатой кости на 4-й неделе эксперимента была видна более светлая кольцевидная зона остеоинтеграции (рис. 1, а), отсутствующая в более поздние сроки. При морфологическом исследовании вокруг имплантатов обнаруживался тонкий слой рыхлой соединительной ткани, богатой сосудами, с очагами остеогенеза. В прилегающей костной ткани выявлялись небольшие участки остеокластической резорбции и,

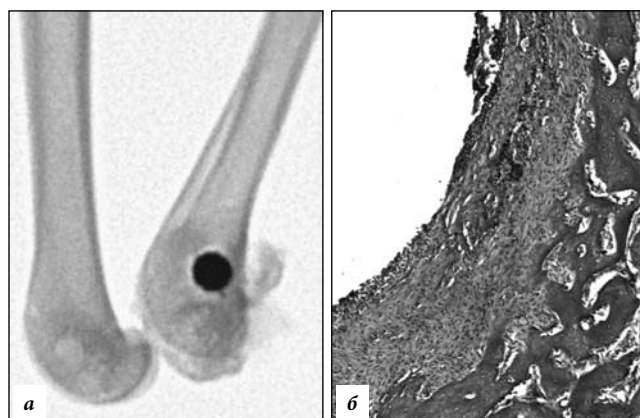


Рис. 1. Титановый имплантат, установленный в бедренную кость крысы, 4-я неделя эксперимента:

хорошо видимая область остеоинтеграции на позитивном рентгеновском изображении (а) и гистологическом препарате (б); окружающая губчатая кость заметно плотнее и имеет отчетливую балочную структуру; а –  $\times 5$ , б –  $\times 80$ .

одновременно, цепочки остеобластов по краям балок, что свидетельствовало об активной перестройке (рис. 1, б).

В 8-недельный срок зона вокруг имплантатов представляла собой смешанный регенерат с преобладанием костной ткани, а прилегающая кость заметно уплотнялась. Форма и характер границы с полостью после удаления имплантата свидетельствовали о высокой степени остеоинтеграции. К 12-й неделе остеоинтеграция была завершённой, вокруг титановых имплантатов обнаруживали плотный ламеллярный футляр с островками губчатой кости, признаков интенсивного ремоделирования не наблюдалось.

Морфометрия подтверждала, что процесс остеоинтеграции сопровождался увеличением толщины зоны интеграции с 4-й по 12-ю неделю почти вдвое и доли костной ткани в ее составе – в 2,27 раза. В прилегающей губчатой кости толщина костных трабекул увеличивалась за это время в 1,17 раза, а доля костной ткани – в 1,53 раза, и величины этого показателя в зоне остеоинтеграции и прилегающей губчатой кости выравнивались между собой (табл. 1).

Таблица 1

Показатели морфометрии тканей, прилегающих к винтовым титановым имплантатам при постановке в бедренные кости крыс ( $M \pm m$ )

Показатель	Контроль (n=6)	Срок эксперимента, недель		
		4 (n=6)	8 (n=7)	12 (n=6)
Зона остеоинтеграции				
Толщина зоны, мкм	–	150,0±10,8	244,0±19,0	310,0±25,2 <sup>1</sup>
Доля костной ткани, %	–	26,7±5,1	38,2±6,3	60,6±8,9 <sup>1</sup>
Прилегающая губчатая кость				
Толщина трабекул, мкм	272,0±13,0	249,0±13,3	268,0±14,4	292,0±14,5 <sup>1</sup>
Доля костной ткани, %	45,8±3,1	40,9±2,8	46,8±3,9	62,6±5,1 <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Разница с показателем на 4-й неделе статистически значима.

<sup>2</sup> Разница с контролем статистически значима.

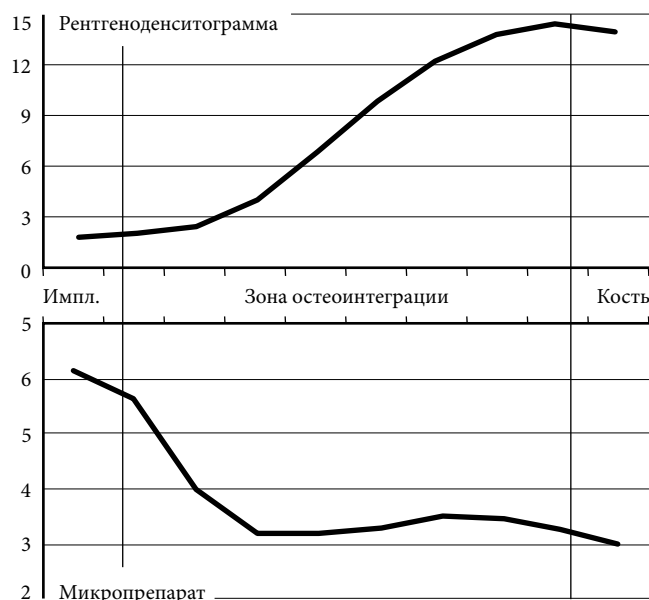


Рис. 2. Радиальная рентгеноденситограмма и радиальный профиль плотности органического матрикса кости при анализе гистологического изображения:

шаги программы Radiana синхронизированы на реальных препаратах (примерно 20 мкм), интегральная яркость в RGB-формате выражена в условных единицах.

Таблица 2

Показатели микродинамометрии винтовых титановых имплантатов при постановке в бедренные кости крыс ( $M \pm m$ )

Показатель, Н/см <sup>2</sup>	Срок эксперимента, неделя		
	4 (n=6)	8 (n=7)	12 (n=6)
Push-out	0,09±0,02	0,58±0,08 <sup>1</sup>	0,79±0,11 <sup>1</sup>
Pull-out	0,11±0,02	0,51±0,07 <sup>1</sup>	0,61±0,09 <sup>1</sup>
Removal torque	1,12±0,15	4,40±0,53 <sup>1</sup>	6,24±0,75 <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Разница с показателем на 4-й неделе статистически значима.

При исследовании рентгеноденситограмм (отражающих, прежде всего, содержание минерального матрикса кости) и радиальных оптограмм гистологических срезов (отражающих содержание органического костного матрикса), выявлены реципрокные различия. Хорошо видно, что содержание минерального матрикса постепенно нарастало от имплантата к прилежащей кости, тогда как содержание органического матрикса было максимальным возле биоактивной поверхности имплантата (рис. 2).

По данным механических тестов, в динамике происходило увеличение показателей интеграции имплантата и кости: вертикальная нагрузка, необходимая для сдвига вглубь, увеличивалась в 8,8 раза, наружу – в 5,5 раза, необходимое начальное усилие выкручивания возрастало в 5,6 раза (табл. 2).

Корреляционный анализ, проведенный для всех показателей в 19 исследованных случаях имплантации совместно, выявил только три значимых корреляции: две положительные для доли костной ткани в зоне остеоинтеграции – с показателем средней плотности

при радиальной рентгеноденситометрии ( $r=0,61$ ) и с начальным усилием выкручивания ( $r=0,70$ ), и отрицательную между толщиной зоны остеоинтеграции и показателем средней плотности при анализе гистологического изображения ( $r=-0,63$ ).

**Обсуждение полученных данных.** По современным представлениям, остеоинтеграция включает целый ряд событий, за каждое из которых отвечает специализированная клеточная популяция при участии определенного набора управляющих воздействий [1, 4]. Этот процесс успешно стимулируется путем создания биоактивной поверхности имплантата и разработки биомиметического интерфейса, которые обуславливают остеоиндуктивный эффект [8, 11]. Имеющиеся в литературе сведения подтверждают относительную независимость показателей, получаемых в экспериментах при рентгенологическом, гистологическом и механическом исследовании тканей в области внутрикостных имплантатов [1, 8, 9]. Мы также получили весьма небольшое количество корреляционных связей между этими показателями.

Таким образом, при использовании винтовых титановых имплантатов с биоактивными поверхностями в эксперименте удалось воссоздать и подтвердить основные этапы эффективной остеоинтеграции. Использование комбинации нескольких независимых методик оценки остеоинтеграции объективно необходимо для изучения эффективности новых материалов для дентальной имплантации на доклиническом этапе, поскольку они с различных сторон характеризуют этот сложноорганизованный многостадийный процесс. С этой целью может быть использован протокол, включающий: рентгенологическое исследование с радиальной денситометрией зоны остеоинтеграции, механическое аппаратное исследование подвижности имплантата на полупрепарированном объекте, классическое морфологическое исследование, дополненное анализом зонального распределения плотности органического матрикса в зоне остеоинтеграции.

#### Литература

1. Аврунин А.С., Тихилов Р.М. Остеоцитарное ремоделирование костной ткани: история вопроса, морфологические маркеры // Морфология. 2011. № 1. С. 86–94.
2. Алехин А.П., Маркеев А.М., Гудкова С.А. [и др.] Использование атомарно-слоевого осаждения диоксида титана для придания биоактивных свойств поверхности титановых имплантатов // Институт стоматологии. 2010. № 2. С. 68–69.
3. Калита В.И., Маланин Д.А., Мамаева В.А. [и др.] Модификация поверхностей внутрикостных имплантатов: современные исследования и нанотехнологии // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2009. № 4. С. 17–22.
4. Кулаков А.А., Григорьян А.С., Архипов А.В. Влияние различных способов модификации поверхности дентальных имплантатов на их интеграционный потенциал // Стоматология. 2012. № 6. С. 75–77.
5. Новочадов В.В., Гайфуллин Н.М., Залевский Д.А. и др. Остеоинтеграция имплантатов с биоактивной поверхностью, модифицированной напылением хитозана в эксперименте

- у крыс // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. 2013. № 2. С. 30–35.
6. Рева Г.В., Толмачев В.Е., Первов Ю.Ю., Опыт проведения дентальной имплантации у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта на фоне контроля местного иммунного гомеостаза // Фундаментальные исследования. 2013. № 5. С. 129–134.
7. Югай Ю.В., Толмачев В.Е., Маркелова Е.В., Голицына А.А. Оценка цитокинового профиля у пациентов до и после дентальной имплантации // Тихоокеанский медицинский журнал. 2013. № 1. С. 31–33.
8. Chang, P.-C., Lang N.P., Giannobile W.V. Evaluation of functional dynamics during osseointegration and regeneration associated with oral implants: a review // Clin. Oral Implants Res. 2010. Vol. 21, No. 1. P. 1–12.
9. Elias C.N., Ruellas A.C.-O., Fernandes D.J. Orthodontic implants: concepts for the orthodontic practitioner // Int. J. Dent. 2012. 549761. doi: 10.1155/2012/549761.
10. Handbook of histology methods for bone and cartilage / ed. by Y.H. An, K.L. Martin. – N.-Y.: Humana Press, 2003. 587 p.
11. Stanford C.M. Surface modification of biomedical and dental implants and the processes of inflammation, wound healing and bone formation // Int. J. Mol. Sci. 2010. Vol. 11, No. 1. P. 354–369.

Поступила в редакцию 31.03.2014.

#### **Сравнительная информативность морфологических, рентгенологических и биомеханических критериев остеоинтеграции в эксперименте**

В.И. Шемонаев<sup>1</sup>, В.В. Новочадов<sup>2</sup>, А.Ю. Алексеенко<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Волгоградский государственный медицинский университет (400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов,1), <sup>2</sup> Волгоградский государственный университет (400062, г. Волгоград, Университетский пр-т, 100).

**Резюме.** В эксперименте с постановкой винтовых титановых имплантатов в бедренные кости крыс через 4, 8 и 12 недель были изучены рентгенологические, механические и морфологические характеристики зоны остеоинтеграции. Общая положительная динамика остеоинтеграции и подтверждение остеоиндуктивного эффекта свидетельствовали в пользу адекватности выбранной экспериментальной модели. Малое число корреляций между отдельными показателями методик исследования явилось основанием для рекомендации их использования только в комплексе: рентгенологическое исследование с радиальной денситометрией зоны остеоинтеграции, механическое аппаратное исследование подвижности имплантата и классическое морфологическое исследование, дополненное анализом зонального распределения плотности органического матрикса в зоне остеоинтеграции.

**Ключевые слова:** дентальная имплантация, экспериментальная модель.