

© Коллектив авторов, 2013

УДК 616.714.2.001.6-001.5-089.843(021)

## ОСТЕОИНТЕГРАЦИЯ ИМПЛАНТАТОВ С БИОАКТИВНОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ, МОДИФИЦИРОВАННОЙ НАПЫЛЕНИЕМ ХИТОЗАНА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ У КРЫС

*В.В. Новочадов<sup>22</sup>, Н.М. Гайфуллин<sup>11</sup>, Д.А. Залевский<sup>33</sup>, П.С. Семенов<sup>22</sup>, В.И. Шемонаев<sup>33</sup>*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва (1)

Волгоградский государственный университет, г. Волгоград (2)

Волгоградский государственный медицинский университет, г. Волгоград (3)

**В экспериментах показано, что предварительное нанесение хитозана на биоактивные поверхности винтовых титановых имплантатов улучшает морфологические характеристики остеointegrации после имплантации в бедренную кость крыс. Выявлен дополнительный остеокондуктивный эффект мелкодисперсного хитозана, в результате вокруг имплантатов происходило более интенсивное и опережающее по срокам новообразование костной ткани в сочетании с морфологическими признаками выраженного ремоделирования и уплотнения окружающей костной ткани.**

**Ключевые слова:** *титановые имплантаты, хитозан, костная ткань, ремоделирование, эксперимент.*

Развитие новых технологий в области восстановления утраченных зубов уже немыслимо без элементов дентальной имплантации. Аналогично бурными темпами развивается восстановительная медицина опорных тканей, основанная на ранней металлоостеопластике с неудаляемыми (приживляемыми) конструкциями. С медико-биологических позиций, оба этих процесса имеют в своей основе управляемую остеointegrацию, которая достижима только при наличии современных материалов и технологий. Основу материалов для остеоимплантации на сегодня составляет титан, используются его сплавы с никелем, алюминием, ванадием, реже – с другими металлами [6, 8, 11].

Основополагающим подходом к повышению остеointegrативных свойств имплантатов является активная модификация поверхности протеза, обеспечивающая максимальную площадь контакта с прилегающей костной тканью и, одновременно, стимулирующая процесс ремо-

делирования этой кости, то есть обладающая остеокондуктивным эффектом [10, 12]. Технически это достигается разнообразными методами создания трехмерно-пористой поверхности (пескоструйной обработки, спекания, осаждения, электродугового или плазменного напыления, микровзрывной техникой, коррозированием и др.), а в качестве поверхностного слоя (покрытия) могут выступать частицы того же сплава, оксиды титана, тантала, гидроксипатит или иные вещества, миметичные минеральному матриксу кости [2, 3, 7, 11].

В последнее время выполнен существенный объем исследований, касающихся включения в состав покрытий имплантатов композитных биорезорбируемых материалов нового поколения. Одним из перспективных компонентов для этого оказался хитозан, который не токсичен, обладает полной биосовместимостью, биорезорбируемостью, и умеренными антибактериальными свойствами. В

эксперименте показаны выраженные хондро- и остеоиндуктивные эффекты трехмерно организованного хитозана [6, 8, 9].  
Технологические моменты создания подобных поверхностей, равно как и результаты их остеоинтеграции *in vivo* в настоящее время активно изучаются.

Цель работы – изучить в эксперименте возможность улучшения остеоинтеграции имплантатов за счет нанесения на их биоактивную поверхность мелкодисперсного пористого хитозана.

#### Материалы и методы

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 86/09 ЕЕС.

Материалом для исследований послужили образцы тканей бедренной кости 16 белых лабораторных крыс самцов массой от 180 до 240 г. У 12 животных под наркозом (Золетил в дозе 40 мг/кг массы внутривенно) формировали с помощью сверла каналы в области диафиза бедренной кости диаметром 1,5 мм и глубиной 5 мм с отклонением оси канала от вертикали на 30 градусов. 6 животным (10 каналов, группа ТИ<sub>0</sub>), помещены методом закручивания фрагменты титановых винтовых имплантатов MIS BioCom. У 6 крыс (10 каналов, группа ТИ<sub>х</sub>) 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 [5]. Динамику восстановительного процесса прослеживали через 4, 8 и 12 недель после операций, в качестве контроля были исследованы 8 образцов тканей бедренной кости четырех интактных крыс, находящихся все время эксперимента в стандартных условиях того же вивария. Животных выводили из эксперимента пероральной Золетила (200 мг/кг массы). Гистологические препараты приготавлива-

ли после фиксации в 10%-ном растворе нейтрального забуференного формалина после декальцинации в растворе ЭДТА, окрашивали гематоксилином и эозином, для выявления тканевого матрикса – толудиновым синим [4]. 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 ( $\text{мм}^3/\text{мм}^3$ ).

Иммуногистохимическое исследование включало в себя определение процента клеток, экспрессирующих ядерный антиген пролиферации PCNA (готовые для использования наборы фирмы Dako Cytomation, Дания). После выявления маркеров макрофагов/остеокластов CD-68 и клеток остеогенного ряда – остеоонектина (наборы Novocastra, Великобритания), подсчитывали численную плотность этих клеток в костной ткани. Результаты выражали в  $1/\text{мкм}^3$ . Для видео документирования и количественного морфологического анализа был использован компьютерный комплекс «Видеотест – Морфо» 3.0 (Россия), программное обеспечение которого позволяло в полуавтоматическом режиме определить величины вышеперечисленных показателей.

Обработку количественных данных проводили непосредственно из общей матрицы данных Excel 7.0 (Microsoft, USA) с привлечением возможностей программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA) с учетом общепринятых требований для медико-биологических исследований. Для анализа различий между выборками использовали критерий Манна-Уитни.

#### Результаты и их обсуждение

На 4-й неделе эксперимента при гистологическом исследовании костной ткани вокруг имплантатов, не обработанных хитозаном, 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.

В 8-недельный срок костная ткань вокруг имплантатов в группе  $T_{00}$  представляла собой смешанный регенерат, представленный соединительной и грубоволокнистой костной тканью с концентрическим направлением волокон вокруг имплантата. На границе с окружающей губчатой костью данная ткань все более напоминала по строению плотную костную ткань, в самой губчатой кости сохранялись признаки ремоделирования. Форма и характер границы с полостью после удаления имплантата свидетельствовал о высокой степени остеоинтеграции. Вокруг имплантатов в группе  $T_{XX}$  сохранялись признаки смешанного остеогенеза. Собственно фиброзная ткань была тонкой, а основная масса зоны остеоинтеграции, представлена плотным футляром из молодой костной ткани, окружающей имплантат. Гранулы хитозана были резорбированы полностью. Прилежащая губчатая кость находилась в состоянии интенсивного ремоделирования с явным увеличением объема новообразованной костной ткани.

К 12-й неделе вокруг титановых имплантатов в группе  $T_{00}$  наблюдали завершение формирования ламеллярной пластинки, лишь местами перемежающейся трабекулярной костной тканью. Толщина переходной фиброзной зоны между костью и

имплантатом не превышала 120 мкм. Признаки интенсивного ремоделирования окружающей губчатой кости практически отсутствовали. В группе с введением имплантатов, обработанных хитозаном, обнаруживали тонкую фиброзную зону, окруженную плотным костным веществом ламеллярного строения. Граница отделения от имплантата имела признаки его высокой степени остеоинтеграции. Прилежащая губчатая ткань также содержала более плотную упаковку грубых костных балок, чем на отдалении от имплантата. В этой костной ткани сохранялись признаки интенсивного ремоделирования.

Данные количественного анализа приведены в таблицах 1 и 2. Как видно из этих данных, обработка поверхностей имплантата хитозаном сопровождалась достоверным увеличением толщины кортикальной пластинки бедренной кости вблизи зоны приживления. В более ранние сроки выявлялся достоверный прирост объемной доли губчатой кости (8-я неделя), поверхностной плотности ее трабекул и соединительной плотности (4-неделя). В этой группе, в сравнении с  $T_{00}$  была на всех сроках эксперимента большей толщина зоны остеоинтеграции и доля костной ткани в этой зоне.

Доля PCNA-позитивных клеток в зоне остеоинтеграции возрастала к 4-й неделе эксперимента в 2,4 раза вне зависимости от использования хитозана. В последующем эта величина уменьшалась примерно в равной степени в обеих группах, превышая значение показателя в контрольной группе на 8 неделе в 1,61,7 раза.

Регистрировалось дружественное увеличение численной плотности остеобластов, остеоцитов и остеокластов с максимумом на 4-й неделе эксперимента и без существенных различий между группами  $T_0$  и  $T_{XX}$ . Единственным достоверным различием было сохранение относительно большего числа клеток остеогенного ряда в группе  $T_{XX}$  на 12-й неделе эксперимента.

Таблица 1

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

Показатель	Группа	Контроль	Сроки эксперимента		
			4 недели	8 недель	12 недель
Толщина кортикального слоя кости, мкм	$T_d$	1237±79	1105±66,2	1345±83,1	1361±90,4
	$T_{IX}$		1195±73,2	1688±89,5*#	1675±96,1*#
Объемная доля губчатой кости, мм <sup>3</sup> /мм <sup>3</sup>	$T_d$	0,46±0,03	0,41±0,03	0,47±0,04	0,63±0,05*
	$T_{IX}$		0,45±0,04	0,59±0,05*#	0,66±0,05*
Толщина костных трабекул, мкм	$T_d$	272±3,0	249±13,3	268±14,4	292±14,5
	$T_{IX}$		312±17,0*#	355±20,7*#	347±18,8*#
Соединительная плотность, 1/мм <sup>3</sup>	$T_d$	2,41±0,16	1,99±0,12*	2,50±0,17	3,01±0,20*
	$T_{IX}$		2,44±0,15*	2,91±0,21*#	4,38±0,29*#
Толщина зоны остеointеграции, мкм	$T_d$	-	150±0,8	244±19,0	310±25,2
	$T_{IX}$		255±15,1#	412±28,3#	408±27,5#
Доля костной ткани в зоне остеointеграции, мм <sup>3</sup> /мм <sup>3</sup>	$T_d$	-	0,27±0,05	0,38±0,06	0,61±0,09
	$T_{IX}$		0,45±0,11#	0,60±0,09#	0,69±0,10

\* – достоверные различия с величиной показателя в контрольной группе;  
# – достоверные различия между показателями в группах  $T_{II}$  и  $T_{II} + X$ .

Таблица 2

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

Группа	Серия	Контроль	Сроки эксперимента		
			4 недели	8 недель	12 недель
PCNA-позитивные клетки, %	$T_d$	3,74±0,26	9,08±0,34*	8,33±0,40*	6,24±0,26*
	$T_{IX}$		9,11±0,37*	7,45±0,31*	6,53±0,28*
Остеоциты и остеобласты, 1/мм <sup>3</sup>	$T_d$	3740±95	7615±303*	7482±288*	4923±196*
	$T_{IX}$		7344±292*	7163±269*	6024±244*#
Остеокласты, 1/мм <sup>3</sup>	$T_d$	456±27,3	1145±73,1*	1234±80,2*	671±49,3*
	$T_{IX}$		918±60,2*#	864±52,3*	561±43,7*

\* – достоверные различия с величиной показателя в контрольной группе;  
# – достоверные различия между показателями в группах  $T_{II}$  и  $T_{II} + X$ .

По современным представлениям, остеointеграция включает целый ряд событий, в том числе активацию ряда белковых каскадов, аппозицию клеток, инвазию сосудов, формирование кости *de novo* и ее созревания, чтобы достичь в итоге первичной и вторичной стабильности внутрикостных имплантатов. Этот процесс успешно ускоряется путем изменения шероховатости поверхности имплантата и разработки биомиметического интерфейса [8]. Имеющиеся доклинические и клинические оценки биомеханических свойств продемонстрировали различные зависимости от структурных параметров имплантатов и периимплантационных тканей с показателями функциональной интеграции структур имплантата [1, 8]. В наших опытах выявлен дополнительный остеокондуктивный эф-

фект хитозана к достаточно выраженному эффекту, который доказан для биоактивной поверхности винтовых титановых имплантатов [10, 12]. По-видимому, дальнейшее улучшение остеointеграции таких имплантатов возможно только за счет местной доставки к остеointеграционной зоне специфических факторов роста и дифференцировки клеток.

**Выводы**

Полученные результаты экспериментального исследования свидетельствуют о том, что при постановке в кость лабораторных животных винтовых титановых имплантатов с предварительным нанесением хитозана на их биоактивные поверхности, наблюдается дополнительный остеокондуктивный эффект, в результате чего улучшаются морфологические показатели остеин-

теграции. Наблюдается 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.

#### Литература

1. Аврунин А.С. Динамическая оценка остеоцитарного ремоделирования костной ткани при использовании неинвазивного метода / А.С. Аврунин // Морфология. — 2009. — №2. — С. 66-73
2. ВЧ-магнетронные кальций-фосфатные покрытия на материалах медицинских имплантатов / Р.А. Сурменев [и др.] // Изв. Томского политехнического университета. — 2009. — Т. 315, №2. — С. 138-141.
3. Использование атомарно-слоевого осаждения диоксида титана для придания биоактивных свойств поверхности титановых имплантатов / А.П. Алехин А.П. [и др.] // Институт стоматологии. — 2010. — №2. — С. 68-69.
4. Коржевский Д.Э. Основы гистологической техники / Д.Э. Коржевский, А.В. Гиляров. — СПб.: СпецЛит, 2010. — 95 с.
5. Лябин, М.П. Совершенствование технологии получения хитозана / М.П. Лябин, П.С. Семенов // Вестник Волгоградского гос. ун-та. Сер.: Естественные науки. — 2011. — Вып. 2. — С. 17-22.
6. Модификация поверхностей внутрикостных имплантатов: современные исследования и нанотехнологии / В.И. Калита [и др.] // Вестник Волгоградского гос. мед. ун-та. — 2009. — №4. — С. 17-22.
7. Сравнительная оценка остеоинтеграции винтовых конических и цилиндрических титановых имплантатов, обработанных методом микродугового оксидирования / А.Н. Митрошин [и др.] // Фундаментальные исследования. — 2011. — №9. — СС447-451.
8. Chang, P.-C. Evaluation of functional dynamics during osseointegration and regeneration associated with oral implants: a review / P.-C. Chang, N.P. Lang, W.V. Giannobile // Clin. Oral Implants Res. — 2010. — Vol. 21, №1 — P. 1-12.
9. Contact angle, protein adsorption and osteoblast precursor cell attachment to chitosan coatings bonded to titanium / J.D. Bumgardner [et al.] // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. — 2003. — Vol. 14. — P. 1401-1499.
10. Histomorphometric analysis of the osseointegration of four different implant surfaces in the femoral epiphyses of rabbits / L. Le Guehennec [et al.] // Clin. Oral Implants Res. — 2008. — Vol. 19, №1 — P. 1103-1110.
11. Nanoscale surface modifications of medically-relevant metals: state-of-the art and perspectives / F. Variola [et al.] // Nanoscale. — 2011. — Vol. 3, №2 — P. 335-353.
12. Sanz, R.A. Experimental study of bone response to a new surface treatment of endosseous titanium implants / R.A. Sanz, D. F. Oyarzun, I. Diaz // J. Oral Impl. — 2006. — P. 64-67.

**THE CHITOSAN-COATED IMPLANTS  
WITH BIOACTIVE SURFACE DEMONSTRATE IMPROVED CHARACTERISTICS  
OF OSSEOINTEGRATION IN RATS**

*V.V. Novochadov, N.M. Gaifullin, D.A. Zalewski, P.S. Semenov, V.I. Shemonaev*

**The application of chitosan on bioactive surface of the screw titanium implants was shown to improve the morphological characteristics of osseointegration after implantation into the rat femoral bone. The additional osteoconductive effect of the fine-dispersed chitosan appeared in more intensive and rapid osteogenesis around implants, and the more expressed remodeling and thickening of the surrounding trabecular bone.**

Новочадов Валерий Валерьевич — д-р мед. наук, проф., заведующий кафедрой биоинженерии и биоинформатики Волгоградского государственного университета
400059, г. Волгоград, ул. 64-й Армии, д. 4А
Тел.: (88442) 44-72-97.
E-mail: biobio@volsu.ru