

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА КОМПОЗИЦИОННОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ БЕЛКОВО-МИНЕРАЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ И РЕКОМБИНАНТНОГО КОСТНОГО МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОГО БЕЛКА-2 В КАЧЕСТВЕ ПОКРЫТИЯ ТИТАНОВЫХ ИМПЛАНТАТОВ

М.З. Федорова¹, С.В. Надеждин¹, А.С. Семихин², М.А. Лазебная¹, Г.В. Храмов¹, Ю.Р. Колобов¹, А.В. Громов², М.С. Бартов², В.Г. Лунин², А.С. Карягина², Д.В. Гундеров³

¹ ГОУ ВПО «Белгородский государственный университет»,
ректор – д.с.н. профессор Л.Я. Дятченко
г. Белгород

² ГУ НИИ «Эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» РАМН,
директор – академик РАМН, профессор А.Л. Гинцбург
Москва

³ Уфимский государственный авиационно-технический университет,
ректор – д.т.н. профессор М.Б. Пузаиров
г. Уфа

Проведена оценка влияния композиционного материала на основе белково-минеральных компонентов, содержащего пролонгированную форму рекомбинантного костного морфогенетического белка-2 человека (rhBMP-2), и способа обработки поверхности титанового имплантата на репаративный остеогенез и адгезионную прочность контакта костной ткани с поверхностью имплантата. Нанесение на имплантаты композиционного препарата/покрытия способствовало значительному ускорению процессов регенерации костной ткани в месте введения имплантатов. Композиционное покрытие с пролонгированной формой rhBMP-2, способствовало увеличению адгезионных связей новообразованной костной ткани с поверхностью образцов по сравнению с покрытием, не содержащим рекомбинантного костного морфогенетического белка. Имплантаты с поверхностью, обработанной с помощью микродугового оксидирования, демонстрировали более высокие значения величины усилия отрыва имплантата от кости, чем модифицированные пескоструйной обработкой.

Ключевые слова: титановый имплантат, рекомбинантный костный морфогенетический белок-2 человека.

EXPERIMENTAL ESTIMATION OF COMPOSITE MATERIAL CONTAINING THE PROTEIN-MINERAL COMPONENTS AND RECOMBINANT BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-2 AS A COVERING OF TITANIUM IMPLANTS

M.Z. Fedorova, S.V. Nadezhdin, A.S. Semikhin, M.A. Lazebnaya, G.V. Khramov, Y.R. Kolobov, A.V. Gromov, M.S. Bartov, V.G. Lunin, A.S. Karyagina, D.V. Gunderov

The influence of both, the composite material based on the protein-mineral components including the prolonged form of the recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2) and the method of the titanium implant's surface treatment, on the reparative osteogenesis and adhesion strength of the bone tissue – implant's surface contact was evaluated. Covering of implants with the composite coating promotes significant acceleration of the bone tissue regeneration processes in the site of implants loading. The composition coating with prolonged form of the rhBMP-2 promoted increasing of the neogenic bone tissue's adhesion with the implants, as compared with the coating without recombinant human bone morphogenetic protein. The implants treated with microarc oxidation demonstrated higher values of the breakout force during the separation of the implants from the bone than the implants treated with sandblasting method.

Key words: titanium implant, recombinant bone morphogenetic human protein-2.

Введение

В настоящее время в зарубежных научных центрах проводятся широкомасштабные исследования, связанные с разработкой остеоиндуктивных материалов нового поколения на основе биологических или синтетических матриц и рекомбинантных костных морфогенетических белков человека (rhBMP). Костные морфогенетические белки (bone morphogenetic proteins, BMPs) явля-

ются важнейшими локальными факторами роста и регенерации костной ткани [8–10].

Согласно результатам расширенной клинической апробации, остеоиндуктивность композиционных материалов, содержащих рекомбинантные rhBMP, равняется остеоиндуктивности аутологичного костного материала или превосходит ее. Несмотря на положительные результаты исследования костных морфогенетических

белков, остается ряд нерешенных проблем: выбор эффективной технологии получения rhBMP, разработка пролонгированной формы препарата, выбор адекватного биodeградируемого носителя rhBMP.

Целью исследования явилась оценка влияния композиционного материала на основе белково-минеральных компонентов, содержащего пролонгированную форму рекомбинантного костного морфогенетического белка-2 человека (rhBMP-2), и способа обработки поверхности титанового имплантата на репаративный остеогенез и адгезионную прочность контакта костной ткани с поверхностью имплантата.

Материал и методы

В экспериментах на лабораторных животных (крысы линии Wistar, массой 350–400 г в количестве 60 штук) с помощью внутрикостной имплантации модельных имплантатов из наноструктурного титана с поверхностью, обработанной методом пескоструйной обработки (ПСО) или микродугового оксидирования (МДО), исследовали композиционный белково-минеральный материал, содержащий rhBMP-2.

Компоненты композиционного материала покрытия. Рекомбинантный костный морфогенетический белок-2 человека был получен методами генной инженерии и микробиологического синтеза в НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. С целью исключения ускоренного вымывания белка из композиционного материала и пролонгирования остеорегенераторного действия при его имплантации rhBMP-2 инкапсулировали в желатиновые микросферы. Компонентом композиционного материала является также коллаген I типа животного происхождения (ООО «Имтек»), представляющий собой основной белковый компонент костной ткани. Составной частью композиционного материала является также наноразмерный кристаллический гидроксиапатит «БелОст», способ изготовления которого представляет собой оригинальный химический синтез из кальций-фосфатных ингредиентов высокой химической очистки, позволяющий получать кристаллы длиной не более 200 нм и шириной не более 30 нм [4]. Данные параметры кристаллов обеспечивают повышенную биоактивность препарата. В качестве контроля использовали композиционный материал, включающий нанокристаллический гидроксиапатит и коллаген, не содержащий rhBMP-2.

Характеристика основы имплантата. Композиционный материал наносился на модельные имплантаты в виде пластин 2,5×2,5×0,5 мм с отверстием 1 мм, которые были изготовлены методом электроэрозионной резки из прутков

титана марки «НС Grade-4». Используемый в работе титан имеет размер зерна около 200 нм и является перспективным материалом для медицинских имплантатов, так как обладает одновременно высокой прочностью (1250 МПа) и высокой биосовместимостью [2]. Поверхность пластин шлифовалась, после чего часть из них обрабатывали методом микродугового оксидирования (МДО) [5–7]. Полученная в результате обработки поверхность титана имела следующие характеристики: средний размер пор 0,5–5,0 мкм; сквозная (объемная) пористость – 10%; средняя толщина гидрофильного функционального слоя – 10 мкм. Поверхность другой части пластин была подвергнута одноэтапной пескоструйной обработке порошком электрокорунда № 32 с размером частиц песка ≈ 300 мкм. После ПСО поверхность имплантатов имела следующие параметры шероховатости: Ra = 1, Rz = 3, Rmax = 10 мкм.

Первой и второй группе животных имплантировали титановые пластины с поверхностью, обработанной ПСО, третьей и четвертой группе – с модифицированной методом МДО.

На все имплантаты наносили композиционное покрытие. Для придания поверхности титана адгезионных свойств пластины кратковременно (менее 1 минуты) погружали в нагретый до 60°C раствор 5% желатина (Sigma, США) и 5% высокомолекулярного декстрана (Sigma, США), после чего подсушивали в ламинарном укрытии при включенном воздушном потоке. Затем в условиях ламинарного укрытия на пластины наносили композиционное покрытие кратковременным погружением, в состав которого входили наноструктурный синтетический гидроксиапатит (БелОст) и ксеноколлаген I типа (ООО фирмы «Имтек») (группы 1 и 3). Пластины с нанесенным композиционным покрытием устанавливали на штативе и подсушивали в ламинарном укрытии при включенном воздушном потоке.

В группах 2 и 4 композиционное покрытие включало также пролонгированную форму белка rhBMP-2. Группы 5 и 6 – контрольные: использовались образцы титановых имплантатов, обработанные ПСО и МДО соответственно, не имеющие композиционного покрытия.

Титановые имплантаты инокулировали в трубчатую кость лабораторных животных с соблюдением всех правил асептики (рис. 1 а). Под эфирным наркозом открывали доступ к большеберцовой кости. Рассекали мышечный слой и надкостницу. На передней поверхности большеберцовой кости с помощью стерильного сверла бормашины (диаметром 1 мм) производили продольный пропил. В образовавшийся дефект

помещали имплантат, рану наглухо ушивали. В ходе экспериментальной работы все животные содержались в соответствии с «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей». После оперативного вмешательства крысам был обеспечен необходимый уход и постоянное наблюдение с оценкой общего состояния. Животных выводили из эксперимента на 30-е сутки. Костные фрагменты после забора фиксировали в 10% растворе формалина.

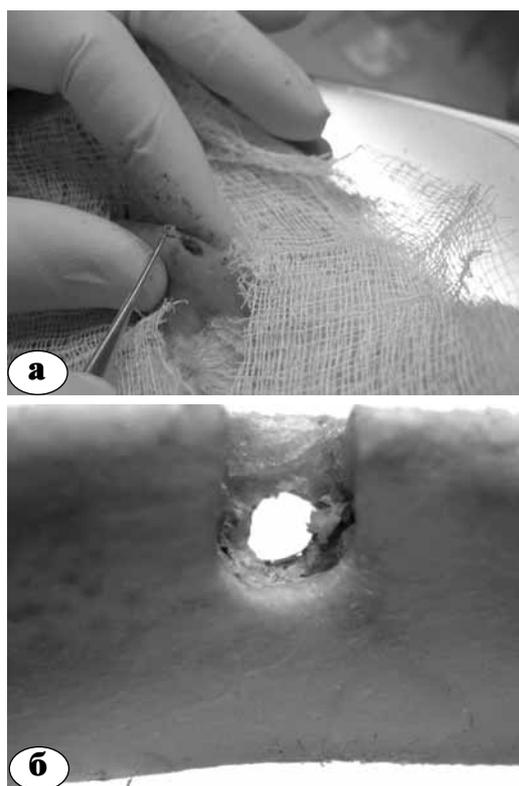


Рис. 1. Имплантация титановой пластины в большеберцовую кость крысы: а – имплантация; б – распил кости, подготовка к определению усилия отрыва имплантатов

Испытания на прочность сцепления. В зоне имплантации при помощи фрезы делали пропил по обе стороны от титановой пластины, освобождали отверстие от соединительных тканей и вдевали в него стальную проволоку карабина (рис. 1 б). Всю конструкцию помещали в зажимы машины для статических испытаний «Instron 5882» с целью оценки адгезионной прочности сцепления имплантата с костью. Измеряли усилие отрыва и рассчитывали адгезионную прочность:

$$P(\text{адг.}) = P_p / S,$$

где S – площадь сцепления, P_p – усилие отрыва.

Микроскопия и рентгеноспектральный микроанализ. На растровом электронном микроскопе (РЭМ) «Quanta 200 3D» в режиме высокого вакуума с напылением слоя углерода на извлеченные из кости имплантаты изучали топографию поверхности. Для дифференцировки компонентов костной ткани от материала покрытия проводили рентгеноспектральный микроанализ веществ, находящихся на поверхности имплантатов, при помощи системы EDS Genesis 2000 XMS 60 для сканирующих электронных микроскопов.

Фрагменты костей, оставшиеся после извлечения имплантатов, декальцинировали в 25% растворе Трилона Б и заливали в парафин. Изготавливали срезы и окрашивали их гематоксилином и эозином. Полученные гистологические препараты изучали при помощи аппаратно-программного комплекса Видео-Тест-Размер (Санкт-Петербург) по схеме, предложенной А.С. Григорьяном [3], с определением объемной доли рыхлой и грубоволокнистой соединительной ткани, хрящевой, ретикулофиброзной и пластинчатой костной тканей. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Исследование поверхности извлеченных на 30-е сутки из кости имплантатов контрольных групп 5 и 6, не имеющих композиционного покрытия, с помощью сканирующей электронной микроскопии показало, что на поверхности отмечается скопление структурных компонентов ретикулофиброзной костной ткани. Между коллагеновых волокон по всей пластинке располагаются остеогенные клетки (остеобласты) и макрофаги, что свидетельствует о начале формирования костной ткани (рис. 2, 3). Зрелой пластинчатой костной ткани на имплантатах выявлено не было. Относительная площадь рыхлой и грубоволокнистой соединительной ткани составила $35,0 \pm 0,2\%$, хрящевой ткани – $12 \pm 0,1\%$, ретикулофиброзной костной – $53,0 \pm 0,4\%$, пластинчатой костной нет. При подготовке образцов контрольной группы к проведению статических испытаний происходило выпадение титановых пластин из зоны имплантации, что свидетельствует о низкой силе сцепления имплантатов с костной тканью.

У животных в опытных группах 1–4, которым имплантировали модельные имплантаты с композиционным покрытием, не содержащим (группы 1 и 3) и содержащим (группы 2 и 4) rhBMP-2, на 30-е сутки в месте введения имплантатов формировалась зрелая костная ткань (рис. 4).

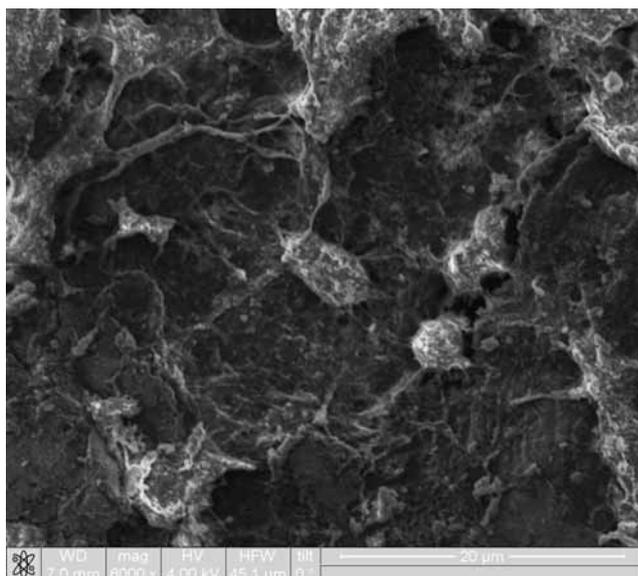


Рис. 2. Имплантат контрольной группы, извлеченный на 30-е сутки после имплантации. На поверхности – пучки коллагеновых волокон, остеогенные клетки и макрофаг. Ув. $\times 6000$

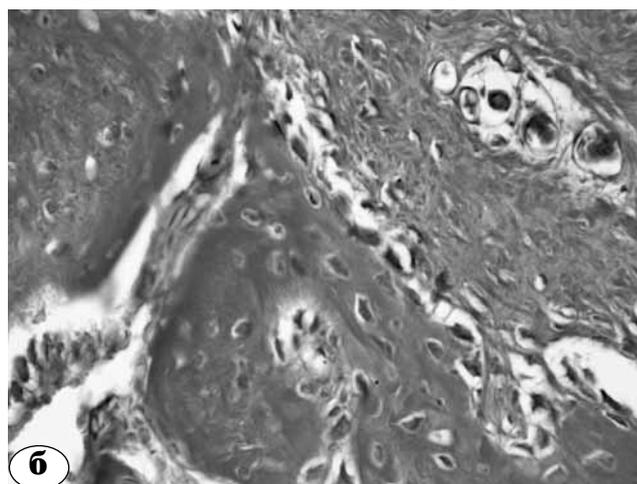
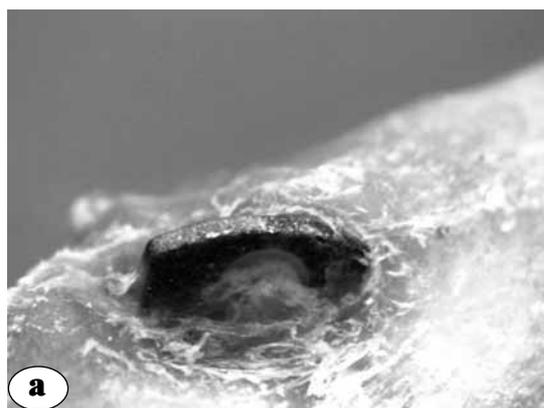


Рис. 3. Участок инокуляции имплантата контрольной группы: а – макрофотограмма, вид имплантата и области дефекта без композиционного покрытия; б – микрофотограмма зон рыхлой волокнистой соединительной ткани и ретикулофиброзной костной ткани. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 40$

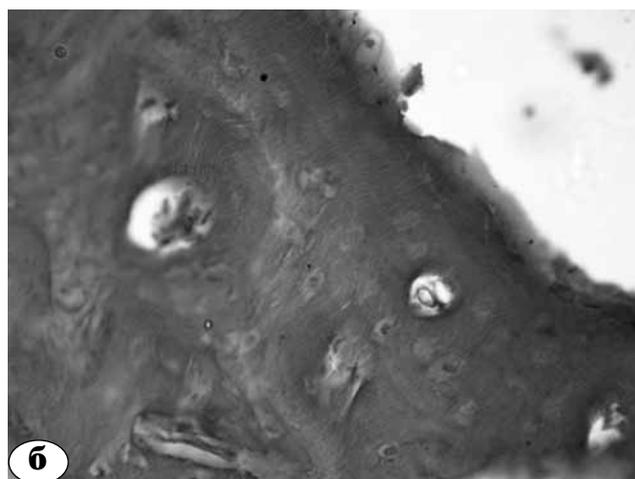
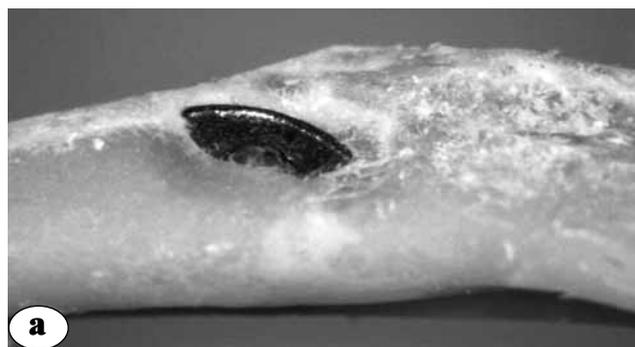


Рис. 4. Участок инокуляции имплантата с композиционным покрытием, содержащим rhBMP-2: а – макрофотограмма, вид имплантата и области дефекта; б – микрофотограмма новообразованной тонковолокнистой костной ткани в зоне дефекта. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 40$

В ходе проведенных испытаний по измерению усилия отрыва модельных имплантатов с поверхностью, обработанной ПСО (группы 1 и 2), установлено, что образцы имеют меньшую адгезионную прочность по сравнению с имплантатами, поверхность которых подготовлена при помощи метода МДО (группы 3 и 4). Детальное исследование имплантатов, обработанных методом МДО при помощи РЭМ, показало, что на поверхности присутствуют участки, выглядящие как гладкие сколы вокруг пор титанового имплантата, образовавшиеся в результате отрыва костной ткани от покрытия имплантата в ходе статических испытаний, что, вероятно, свидетельствует о плотном врастании новообразованной костной ткани в поры имплантата. На поверхности имплантатов, обработанных ПСО, аналогичные структуры отсутствовали. На поверхности пластин в группах 1–4 выявлены структуры с преобладанием пластинчатой костной ткани над ретикулофиброзной (грубоволокнистой) (рис. 5). Объемная доля ретикулофиброзной костной ткани данных образцов составила $32,0 \pm 0,2\%$, пластинчатой костной – $68,0 \pm 0,4\%$, рыхлой и грубоволокнистой соединительной ткани не обнаружено.

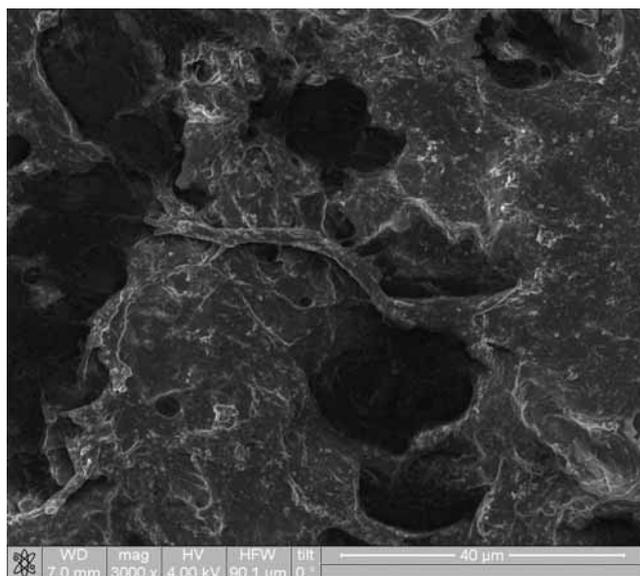


Рис. 5. Поверхность имплантата из группы 4 с пучком коллагеновых фибрилл. Ув. ×3000

Силовые статические испытания показали, что вне зависимости от метода обработки поверхности пластины на 30-е сутки имплантации нанесение композиционного покрытия способствует получению высоких значений усилия отрыва имплантата от костной ткани (табл. 1). Введение в состав композиционного покрытия пролонгированной формы белка ghBMP-2 способствует увеличению силы сцепления костной ткани с поверхностью имплантата на 12% при обработке поверхности ПСО и на 9,5% при использовании метода МДО.

Таблица 1
Показатели статических испытаний модельных имплантатов с композиционным покрытием

| Показатель | Группа | | | |
|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Усилие отрыва, N | 20,9±0,6 [#] | 23,0±0,8 [*] | 21,0±0,2 [#] | 25,3±0,6 [*] |
| Площадь сцепления, мм ² | 15,2±0,3 | 14,8±0,1 | 14,2±0,5 | 15,6±0,8 |
| Адгезионная прочность, МПа | 1,38 | 1,55 | 1,48 | 1,62 |

* – достоверность различий между группами 1 и 3 (без добавления BMP-2 в покрытие) и между группами 2 и 4 (содержащими в составе композиционного покрытия BMP-2); # – достоверность различий между группой 1 (подготовка поверхности ПСО) и группой 3 (подготовка поверхности методом МДО) ($p < 0,01$).

При помощи рентгеноспектрального микроанализа был определен макроэлементный состав ткани на поверхности извлеченных из зоны дефекта имплантатов: весовой процент (wt %) кальция в исследуемом веществе составил 16,57%, фосфора – 9,77%. Это соответствует данным о соотношении кальция и фосфора в костной ткани при нормальных физиологических условиях [1].

Нанесение на имплантаты композиционного препарата/покрытия способствовало значительному ускорению процессов регенерации костной ткани в месте введения имплантатов. На 30-е сутки в области введения имплантатов без покрытия регистрировались начальные признаки костеобразования: на поверхности имплантата отмечалось скопление ретикулофиброзной костной ткани, между коллагеновых волокон располагались остеогенные клетки (остеобласты) и макрофаги. При покрытии имплантатов композиционным препаратом, включающим нанокристаллический гидроксиапатит и ксеноколлаген 1 типа с добавлением или без добавления фактора роста костной ткани ghBMP-2, на 30-е сутки происходило формирование зрелой костной ткани в виде ретикулофиброзной (грубоволокнистой) и пластинчатой костной ткани. Разница в морфологической картине соответствовала прочности соединения имплантата с окружающей тканью: контрольные имплантаты, введенные без покрытия, не удерживались в кости животного при подготовке к статическим испытаниям, в то время как имплантаты с покрытием при статических испытаниях демонстрировали высокие значения усилия отрыва: 21–25 Н. Прочность врастания в кость модельных имплантатов с покрытием была столь высока, что при незастегнутом карабине происходило разгибание его толстой проволоки, но не отрыв имплантата.

Композиционное покрытие, содержащее костный морфогенетический белок ghBMP-2, на 30-суточной экспозиции не оказывало существенного влияния на морфогенез костной ткани по сравнению с покрытием, не содержащим ghBMP-2, но на 9,5–12,0% увеличивало адгезионные свойства новообразованной кости и остеоинтеграцию титанового имплантата, оцениваемую по величине усилия отрыва имплантата от кости.

Сила адгезии определялась не только содержанием в покрытии имплантатов ghBMP-2, но и способом обработки поверхности титана: метод микродугового оксидирования демонстрировал более высокие значения величины усилия отрыва имплантата от кости, чем пескоструйная обработка, поэтому данный метод является более предпочтительным способом при установке имплантатов на длительные сроки.

Выводы

1. Нанесение на имплантаты композиционного препарата/покрытия способствовало значительному ускорению процессов регенерации костной ткани в месте введения имплантатов.

2. Композиционное покрытие с пролонгированной формой rhBMP-2 способствовало увеличению адгезионных связей новообразованной костной ткани с поверхностью образцов по сравнению с имплантатами, не содержащими рекомбинантного костного морфогенетического белка.

3. Имплантаты с поверхностью, обработанной с помощью микродугового оксидирования, демонстрировали более высокие значения величины усилия отрыва имплантата от кости, чем модифицированные пескоструйной обработкой. Данный метод является перспективным способом обработки поверхности имплантатов при их установке на длительный срок.

Литература

- Боровский, Е.В. Биология полости рта / Е.В. Боровский, В.К. Леонтьев. — М.: Изд-во НГМА, 2001. — 304 с.
- Валиев, Р.З. Наноструктурный титан для биомедицинских применений: новые разработки и перспективы коммерциализации / Р.З. Валиев [и др.] // Российские нанотехнологии. — 2008. — Т. 3, № 9 — 10. — С. 80 — 89.
- Григорян, А.С. Проблемы интеграции имплантатов в костную ткань (теоретические аспекты) / А.С. Григорян. — М.: Техносфера, 2007. — 128 с.
- Пат. 2342938 РФ. Способ получения наноразмерного гидроксилатапатита / Иванов М.Б., Волковник Н.Н., Колобов Ю.Р., Бузов А.А., Чуев В.П.; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО «Белгородский государственный университет». — № 2007130861/15; заявл. 14.08.2007; опубл. 10.01.09, Бюл. № 1.
- Karlov, A.V. Definition of silver concentration in calcium phosphate coatings on titanium implants ensuring balancing of bactericidity and cytotoxicity / A.V. Karlov, V.P. Shakhov, Yu.R. Kolobov // Key Engineering Materials. — 2001. — Vol. 194. — P. 207 — 210.
- Kolobov, Yu.R. Structure and properties of oxide coating applied on the orthopaedic titanium alloys by microarc oxidation / Yu.R. Kolobov, A.V. Karlov, L.S. Bushnev, E.E. Sagimbaev // Acta Orthopædica Scand. — 1998. — Vol. 69. — P. 48 — 50.
- Kolobov, Yu.R. Nanotechnologies for the formation of medical implants based on titanium alloys with bioactive coatings / Yu.R. Kolobov // Nanotechnologies in Russia. — 2009. — Vol. 4. — P. 758 — 775.
- Shimaoka, H. Recombinant growth/differentiation factor-5 (GDF-5) stimulates osteogenic differentiation of marrow mesenchymal stem cells in porous hydroxyapatite ceramic / H. Shimaoka [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. — 2004. — Vol. 68. — P. 168 — 176.
- Tsuruga, E. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis / E. Tsuruga [et al.] // J. Biochem. — 1997. — Vol. 121. — P. 317 — 324.
- Wang, Y.J. Collagen-hydroxyapatite microspheres as carriers for bone morphogenic protein-4 / Y.J. Wang [et al.] // Artif. Organs. — 2003. — Vol. 27. — P. 162 — 168.

Исследование выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования научным оборудованием Белгородского государственного университета «Диагностика структуры и свойств наноматериалов». Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» Федерального агентства по науке и инновациям Российской Федерации (госконтракт № 02.522.12.2007 от 30 апреля 2008 г.).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Федорова Марина Зотовна — д.б.н. профессор, старший научный сотрудник НОиИЦ «Наноструктурные материалы и нанотехнологии»;

Надеждин Сергей Викторович — к.б.н. научный сотрудник НОиИЦ «Наноструктурные материалы и нанотехнологии»
E-mail: nadezhdin@bsu.edu.ru;

Семихин Александр Сергеевич — к.б.н. научный сотрудник лаборатории биологически активных наноструктур;

Лазебная Мария Алексеевна — научный сотрудник НОиИЦ «Наноструктурные материалы и нанотехнологии»;

Храмов Георгий Викторович — инженер НОиИЦ «Наноструктурные материалы и нанотехнологии»;

Колобов Юрий Романович — д.ф.-м.н. профессор, доктор НОиИЦ «Наноструктурные материалы и нанотехнологии»;

Громов Александр Викторович — младший научный сотрудник лаборатории биологически активных наноструктур;

Бартов Михаил Сергеевич — младший научный сотрудник лаборатории биологически активных наноструктур;

Лунин Владимир Глебович — к.б.н. руководитель лаборатории биологически активных наноструктур;

Курягина Анна Станиславовна — д.б.н. главный научный сотрудник лаборатории биологически активных наноструктур;

Гундеров Дмитрий Валерьевич — к.ф.-м.н. заместитель директора Института перспективных материалов.