



МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КОСТНОГО ДЕФЕКТА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ИМПЛАНТА ТИТАНА, ОБРАБОТАННОГО ПЕСКОСТРУЙНЫМ МЕТОДОМ С РАЗЛИЧНЫМИ КОМПОЗИТНЫМИ ПОКРЫТИЯМИ В ДИНАМИКЕ ПЕРВОГО МЕСЯЦА РЕГЕНЕРАЦИИ¹

**Л.А. Павлова
Т.В. Павлова
А.В. Нестеров
Д.А. Колесников
И.Ю. Гончаров
М.Г. Жерновой**

*Белгородский
государственный
университет*

e-mail: lpavlova@bsu.edu.ru

Проведен морфологический дизайн в динамике костного дефекта, при оперативном использовании имплантата из наноструктурированного титана с применением биокомпозитов, содержащих BMP-2. Представлены данные 1 месяца. С помощью данных световой, атомно-силовой и сканирующей электронной микроскопии показаны значимые отличия при использовании остеоиндуктивных факторов роста. Изменения касаются динамики покрытия зарастания костного дефекта и структурирования вновьобразованной ткани. Работа является продолжением исследований.

Ключевые слова: имплант, регенерация, морфогенетические белки.

Реструктуризация костной ткани в связи как высокой травматизацией населения в эпоху технологического процесса, так и замещения костного дефекта, являющегося результатом операций (опухоли различных органов и тканей, в том числе и костной, геморрагический инсульт), хронические инфекции (туберкулезный остеомиелит) являются одной из актуальнейших проблем в создании наноимплантов [1, 2, 7]. Одним из направлений исследований при этом является создание технологии композитного покрытия, максимально близкого по характеристикам к параметрам человеческой кости для заполнения дефектов костной ткани и создания биоактивных покрытий имплантов, обеспечивающий снижение сроков послеоперационной реабилитации больных и неотторгаемость имплантов [3, 5, 6]. Революционным стало создание компонентов, обеспечивающих привлечение к месту введения препарата (имплантата с покрытием) клеток организма, ускоряющих процесс регенерации тканей и приживания имплантата. Среди них особое место занимает BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein-2) – остеоиндуктивный фактор, инициирующий превращение стволовых клеток в остеопрогенетические клетки [4].

Целью нашего исследования является изучение морфологической картины костного дефекта, при оперативном использовании имплантата из наноструктурированного титана с применением биокомпозитов, содержащих BMP-2.

Материалы и методы.

Эксперимент выполняли на 135 крысах-самцах линии "Вистар" массой 200-250 г, которые были разделены на 5 групп (табл. 1). В качестве имплантата использовались диски из наноструктурного титана Grey, пескоструйная обработка, наносились покрытия 1(1-желатин, декстран, DEAE-декстрана), 2 покрытия (1-желатин, декстран, DEAE-декстрана, 2-гидроксиапатит, коллаген, декстрана) с применением различных типов обработки и наносимых покрытий.

В контрольных группах животные оперировались без введения имплантата. В условиях общего обезболивания ингаляцией паров эфира, производился линейный разрез кожи и апоневроза. Теменные кости скелетированы распатором. Выполнялась трепанация. В костный дефект укладывался имплант без жесткой фиксации. Рана ушивалась наглухо. Животных выводили из опыта через 7, 14, 30 дней посредством декапитации в условиях передозировки эфирного наркоза. При аутопсии проводилось макроскопическое описание и фотографирование. Для ультрамикроскопического ис-

¹ Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования научным оборудованием БелГУ, Гранд ФЦП №02. 552. 11. 70. 32.

следования из черепа вырезались прооперированные участки 0,5х0,5х0,25 см, которые затем фиксировали в смеси. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином и подвергали исследованию в световом микроскопе «ТОПИС - Т» СЕТИ, при помощи цветной одноматричной видеокамеры BAUMER1, программы обработки изображения «Видео – Тест - Размер».

Таблица 1

Дизайн исследования

N гр.	Вид обработки	Экспозиция (нед.)		
		1	2	4
		Кол-во животных		
1	Ложнооперированные животные (контрольная группа)	5	5	5
2	Пескоструйная обработка титана	10	10	10
3	Пескоструйная обработка титана, 1 слой покрытия	10	10	10
4	Пескоструйная обработка, 2 слоя покрытия	10	10	10
5	Пескоструйная обработка, 2 слоя покрытия с факторами роста BMP-2	10	10	10

Для сканирующей электронной микроскопии биоптаты помещали в фиксирующую смесь, а затем просматривали в растровом микроскопе FE1 Quanta 200 3D, а также FE1 Quanta 600 FEG. Элементный анализ был сделан с использованием детектора для регистрации спектров характеристического рентгеновского излучения фирмы EРAХ, детекторы интегрированы с растровым электронным микроскопом Quanta 600 FEG. Атомно-силовая микроскопия после предварительной обработки осуществлялась в зондовой лаборатории Ntegra Aura.

Результаты исследования

При макровизуализации опытных и контрольных групп животных нет заметного флогогенного эффекта, что разрезы в месте оперативного доступа заживали путем первичного натяжения. В опытных группах на 7 день макроскопически заметно выражены ангиодистонические проявления: усиление сосудистого рисунка, гиперемия в зоне имплант-ткань. Замечено выраженное полнокровие сосудов твердой мозговой оболочки по всему периметру. Инфильтративно распространена рыхлая соединительная ткань по периферии импланта на отдельных образцах.

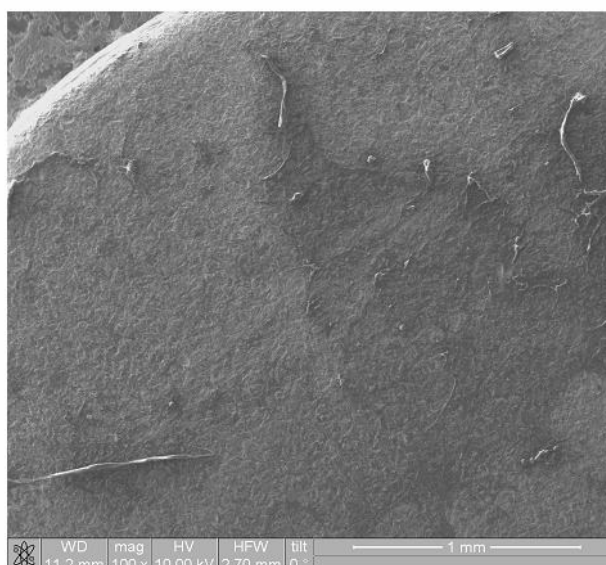


Рис. 1. Ультрамикроскопическая картина изменений костного дефекта во 2 опытной группе (применение нанотитана, обработанного методом пескоструйной обработки). РЭМ×100. Наблюдается увеличение клеточной активности по периферии костного дефекта. На поверхности импланта – отдельные группы тканевых элементов

Следует отметить у животных при оперативном вмешательстве в опытной группе более четко выраженный сосудистый рисунок, чем у ложнопрооперированных животных. При исследовании опытных образцов отмечена различная выраженность репаративных процессов в исследуемых группах. Однако выраженность контактных изменений была наименьшей во 2 опытной группе. На образцах 3 опытной группы количество и степень заполнения рыхлой соединительной ткани заметно выше. Часть образцов полностью скрыта под слоем вновь образованной молодой соединительной ткани. При исследовании 4 группы картина морфологической активности в участках взаимодействия имплант-ткань и наружной поверхности образцов была промежуточной между 2 и остальными группами (см. рис. 1).

Морфологическая макрокартина на образцах 5 группы уже к 1 неделе экспозиции отражала наиболее оптически заметные изменения, на 2 неделе экспозиции мы наблюдали микрокартину увеличения количества соединительнотканых элементов и клеток крови, с явным расширением зоны функциональной активности ткани за пределы контакта с опытным образцом. В группе с использованием 2 слоев покрытия с факторами роста BMP-2 при светооптическом изучении нами было отмечено значительно лучшая регенерация костной ткани, чем в аналогичной группе без покрытия. (рис. 2).

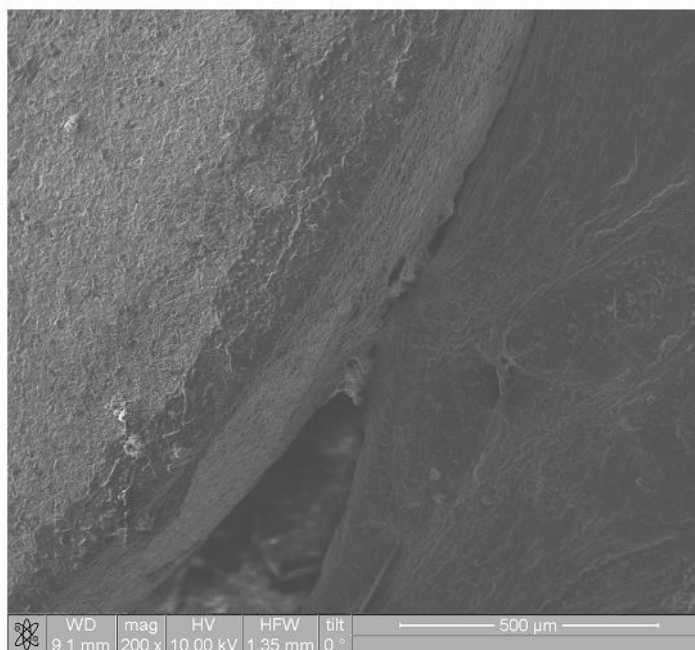


Рис. 2. Ультрамикроскопическая картина изменений костного дефекта в 5 опытной группе (применение нанотитана, обработанного методом пескоструйной обработки, с 2 слоями композиционного покрытия, в один из которых внедрены морфогенетические белки).

Видна заметно более развитая и дифференцированная клеточная сеть. РЭМ×200

При этом к 2-м неделям формировалась хорошо выраженная фиброзная капсула между имплантом и костной тканью. Сама зона регенерации костной ткани над имплантом была увеличена в размерах. Имплант, хотя и имел на этом сроке рыхлое соединение, но не выпадал при выделении фрагмента кости. Над имплантом определялась преимущественно грануляционная ткань и начинающими формироваться волокнами.

При изучении 4-недельной экспозиции образцов нами были описаны следующие процессы. Во 2 группе отмечены процессы несколько большего присутствия рыхлой соединительной ткани по сравнению с контрольной группой. При этом выраженность клеточных реакций по сравнению с другими опытными группами была наи-

меньшей. Наблюдалось частичное заполнение дефекта между сохранившейся костной тканью и внедренным имплантантом аргирофильными и коллагеновыми волокнами.

При изучении морфологической картины в 3 опытной группе обращает на себя внимание 50-60% заполнение поверхности импланта снаружи рыхлой соединительной тканью, мощным слоем коллагеновых и эластических фибрилл и коллагеновых и эластичных волокон. Хорошо просматривается клеточная реакция в виде межклеточного вещества, в котором заключены производящие его клетки, фибробласты с отходящими от них коллагеновыми волокнами, клетки крови белого и красного рядов. Определяются лишь незначительные участки либо с оголением импланта, либо фрагменты, закрытые аргирофильными волокнами.

При электронномикроскопическом анализе данных, полученных в зондовой лаборатории, наиболее выраженным были изменения, произошедшие в 5 группе. Здесь замечено до 60-70% (на отдельных образцах) заполнение поверхности импланта вновьобразованной тканью снаружи мощным слоем коллагеновых и эластичных волокон. Хорошо просматриваются фибробласты с отходящими от них коллагеновыми волокнами. Определяются лишь незначительные участки либо с оголением импланта, либо фрагменты, закрытые аргирофильными волокнами. Относительно структуры ее можно отметить значительную высоту (не менее 10 нм) (рис. 3).

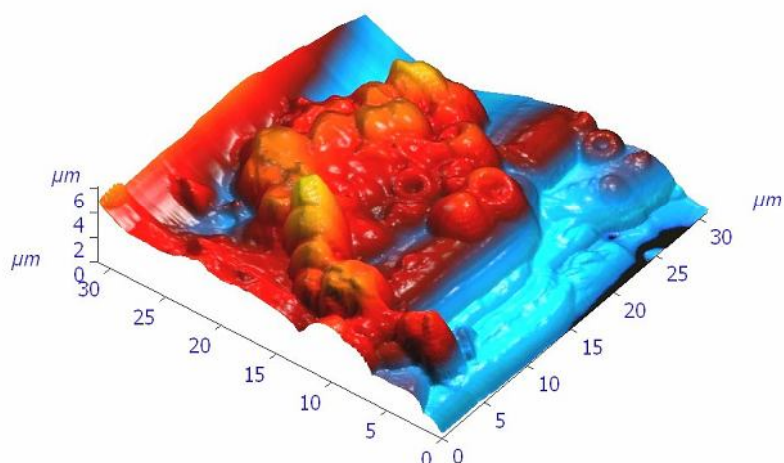


Рис. 3. Морфологическая картина импланта, пескоструйная обработка, нанесенными 2 слоями покрытия (1-желатин, декстран, DEAE-декстрана, 2-гидроксиапатит, желатин, декстрана) с факторами роста BMP-2. 4 недели экспозиции.
Зондовая лаборатория

Помимо этого, нами показано, что уже к этому сроку отдельные фибробласты и коллагеновые волокна на фоне нежных аргирофильных волокон покрывают сам имплант. Следует отметить, что сама ткань, формирующая купол, достигает по своей высоте 90-120 микрон и хорошо контурирована. Сама ткань с четко визуализированными волокнами (рис. 3). Следует отметить четковыраженную фиброзную капсулу, величиной 70-80 микрон, соединяющую имплант с костной тканью (рис. 4).

При РЭМ изучении в группе с применением импланта титана, подвергнутого пескоструйной обработке, наблюдалась следующая морфологическая картина. В конце 1 недели отмечено 30-40% заполнение поверхности импланта снаружи рыхлой соединительной тканью, выражен и при этом структурирован слой преимущественно коллагеновых и эластичных волокон. Наблюдалась положительная реакция межклеточного вещества, клеточные элементы воспалительной реакции преимущественно эритроцитарного, а также лейкоцитарного ряда, фибробласты с отходящими от них коллагеновыми волокнами. Определялись фрагменты либо с

хорошо просматривающейся структурой импланта, либо участки, заполненные аргирофильными волокнами (рис. 4).

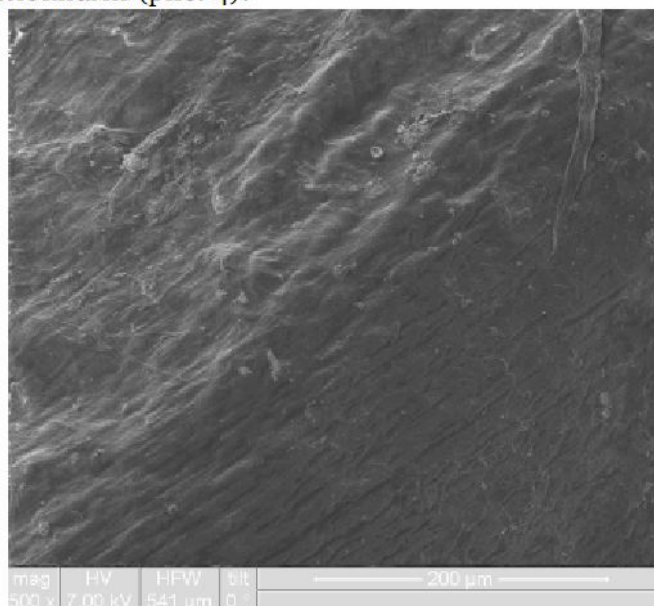


Рис. 4. Наноструктурированный титан, обработанный методом пескоструйной обработки, 4 недели экспозиции.

Участок костной ткани в месте оперативной установки импланта. РЭМ. Ув × 500

Электронномикроскопически на этапе 4-х недельной экспозиции нами наблюдается бурный рост ашпозиционный рост остеида, новообразованной некальцифицированной костной ткани. Основную поверхность его составляет грубоволокнистая костная ткань, коллагеновые волокна располагаются рыхло, местами беспорядочно. Кроме того, отмечаются пластинки пластинчатой костной ткани: коллагеновые волокна располагаются параллельными рядами (костная пластинка), но ориентация волокон в соседних рядах различна. Количество трабекул в этом месте увеличивается, сохраняя в глубине жизнеспособные остециты.

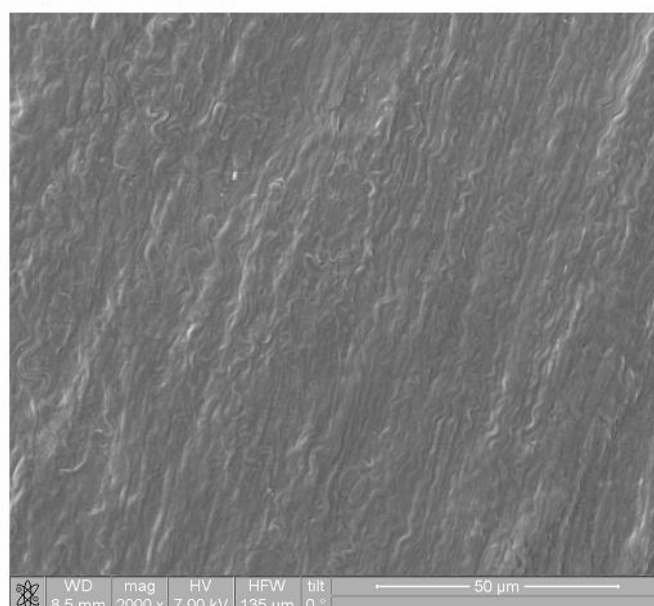


Рис. 5. Наноструктурированный титан, обработанный методом пескоструйной обработки, покрытый 2 слоями, с ВМР-2, 4 недели экспозиции. РЭМ. Ув × 2000



Наблюдается процесс утолщения трабекул и уменьшения площади полостей губчатой сети. Слои костной ткани, образующиеся на этом этапе экспозиции, имеют свои каналы, соединенные с лежащими ниже слоями.

При РЭМ изучении в 5 опытной группе наблюдалась следующая морфологическая картина. Отмечено значительное 40-50% заполнение поверхности импланта снаружи рыхлой, местами плотной соединительной тканью. Определяются фибробласты с отходящими от них коллагеновыми волокнами, образующими мощный структурированный слой коллагеновых и эластичных волокон. Наблюдается положительная реакция межклеточного вещества, клеточные элементы воспалительной реакции преимущественно эритроцитарного, а также лейкоцитарного ряда, элементы ревазуляризации. Определяются лишь незначительные участки либо с оголением импланта, либо фрагменты, закрытые аргирофильными волокнами (рис.5).

Идея использования биоконпозитов с добавлением BMP-2 фактора на основе технически чистого титана Grey в наноструктурном состоянии оказалась очень эффективной, поскольку титан в полной мере соответствует требованиям биологической совместимости, а наносимые покрытия придают импланту биоактивные свойства.

Литература

1. Chang Y.L. Biomechanical and morphometric analysis of hydroxyapatite – coated implants with varying crystallinity / Y.L. Chang, D. Lew, J.P. Park, J.C. Keller // J. Oral maxillofac. Surg. – 1993. – Vol.57, №9. – P.1096-1108.
2. Cehreli C. Force transmission of one- and two-piece morse-taper oral implants: a nonlinear finite element analysis / C. Cehreli, V. Akca, H. Ipekcioglu // Clin. Oral. Implants. Res. – 2004. – Vol.15, N 4. – P.481-489.
3. McDermott J. Complications of dental implants: identification, frequency, and associated risk factors / J. McDermott, S.K. Chuang, Dodson T.B // Int. J. Oral Maxillofac. Impl. – 2003. – Vol.18, N. 6. – P.848-855.
4. Martini D. Detachment of titanium and fluorohydroxyapatite particles in unloaded endosseous implants / D. Martini, M. Fini, M. Franchi et al // Biomaterials-2003 Vol.24, № 7-P.1309-1316.
5. Muller F. What are the prevalence and incidence of tooth loss in the adult and elderly population in Europe? / F. Muller, M. Naharro, G.E. Carlsson // Clin. Oral. Implants Res. – 2007. – Vol.18 (Suppl), N 3. – P.46-49.
6. Muehe R. Erfolgraten implantatgetragener Restaurationen beim teilbezahnten Patienten-Teil II / R. Muehe, A. Krause, J.R. Strub / R. Muehe, A. Krassse, J.R. Strub. // Schweiz-Monatsschr-Zahnmed. – 2003. – Vol. 113, N 4. – P.404-410.
7. Mouhyi J. Temperature increases during surface decoutamination of titanium implants using CO2 laser / J. Mouhyi, L. Sennerby, S. Nammour et al // Clin. Oral Implants Res. – 1999. – Vol.10, №1. – P.54-61.

MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF BONE DEFECT AT USE OF THE NANOSTRUCTURAL TITAN WITH VARIOUS COMPOSITE COVERINGS IN DYNAMICS DURING THE FIRST MONTH OF REGENERATION

L.A. Pavlova
T.P. Pavlova
A.V. Nesterov
D.A. Kolesnikov
I.Y. Goncharov
M.G. Zhernovoi

Belgorod State University

e-mail: : lpavlova@bsu.edu.ru

The morphological design in dynamics of bone defect was made at operative use implant from the nanostructural titan with application of the biocomposites containing BMP-2. Data of 1 month observation are presented. By means of light, atomic-power and scanning electronic microscopy significant differences are shown when osteoinductive factors of growth were used. Changes concerned dynamics of coverings of bone defect and structurization of new tissue.

Key words: implant, regeneration, bone morphogenetic protein-2.