

УДК: 616.31-018:616.314-74/-77-022.532-092.9

О.Н. Мищенко

In-vivo оценка взаимодействия мягкой ткани с наноструктурированной поверхностью ZrO_2 и TiO_2

Запорожский государственный медицинский университет.
НПК «Zircon Prior.»

Цель: изучение взаимодействия мягких тканей с поверхностью сплавов ZrO_2 и TiO_2 , модифицированной методом лазерной абляции, после подкожной имплантации.

Материалы и методы: Эксперимент проводили на базе Сумского Государственного университета после утверждения комиссией по биомедицинской этике (№ 14/06 на 14/06/2015).

36 лабораторных крыс в возрасте 8–9 месяцев были рандомизированы в три серии – контрольную (немодифицированные образцы) и 2 экспериментальные (ZrO_2 и TiO_2). Имплантация сплавов проводилась подкожно на срок 10 и 30 дней, после чего проводилась растровая электронная микроскопия поверхности образцов.

Результаты. Использование лазерной абляции позволило сформировать наноструктурированную поверхность в виде продольных «бороздок». Использование разных режимов работы лазера позволило сформировать поверхность в 2-х размерных диапазонах – до 100 нм и более 100 нм. После десяти дней подкожной имплантации на поверхности контрольных образцов отсутствуют клеточные элементы и волокна. Это обусловлено отсутствием субстрата для адгезии, в первую очередь протеинов крови и межклеточной жидкости в первые часы после имплантации. Многочисленные исследования показывают, что наличие микро- и наноструктур на поверхности имплантатов усиливают адгезию белков, в том числе молекул клеточной адгезии и факторов роста, по сравнению с гладкой поверхностью. Наличие наноструктурных образований на поверхности образцов способствуют адгезии клеток, в первую очередь фибробластов и формированию соединительнотканного каркаса.

Выводы. Формирование на наноструктурированной поверхности образцов фибриллярных структур доказывает возможность прикрепления соединительной ткани к поверхности оксидной пленки материала.

Ключевые слова: имплантат, лазерная абляция, соединительная ткань, фибробласты.

Введение

Успех имплантации основывается на достижении адекватной регенерации тканей переимплантатной зоны, что обеспечивает дальнейшую стабильность и оптимальное функционирование имплантации. Во многом успешная регенерация зависит от природы биоматериала, его поверхности и биомеханических свойств конструкции имплантата. Тем не менее основным фактором полноценной интеграции имплантата в организм является способность его поверхности адсорбировать биомолекулы с дальнейшей адгезией афферентных клеток и формированием ткани, что имеет решающее значение для биосовместимости.

Процесс построения «взаимоотношений» между поверхностью имплантата и клетками ткани реципиента является многогранным. Многие факторы способствуют возникновению ответа организма на инвазию биоматериала. Различные типы клеток и молекул, составляющих «принимающую» ткань, вынуждены адаптироваться к химическому составу, геометрии и текстуре поверхности имплантата. Микрогеометрия поверхности значительно влияет на форму, ориентацию и характеристики роста клеток реципиентной зоны.

Известно, что гладкая поверхность имплантата способствует развитию фиброзной инкапсуляции, что ухудшает интеграцию имплантата.

Поверхность имплантата с различной степенью шероховатости применяют для лучшей стабилизации в костной ткани. Клетки костного формирования эффективнее адаптируются на сложных поверхностях, в то время как фибробласты предпочитают гладкую [1–13].

Некоторые данные свидетельствуют, что текстура поверхности влияет на клеточные ответы биологических медиаторов и дифференциацию клеток [14, 15].

В любом случае, интерфейс поверхности, не соответствующий «требованиям» тех или иных клеточных структур, может привести к случайной ориентации клеток, что станет причиной отсутствия требуемых реакций в переимплантатной зоне.

Исследование биологических процессов в области интерфейса имплантата и ткани показали, что наиболее эффективно процесс интеграции происходит в областях, исключающих воздействие внешних факторов, таких как микробная инвазия, физические и химические внешние факторы.

При создании целого ряда имплантаций, как то: стоматологическая имплантация, экзотрансплантация конечностей, проблема отсутствия выраженного барьера между внутренней и внешней средой организма остается по-прежнему нерешенной. В этом аспекте следует рассмотреть клеточный состав кожи или слизистой на этапе регенерации и первичного ответа на имплантационную инвазию. Первичный мягкотканый регенерат представлен следующими молекулярными формами коллагена:

1. Фибрилла (нативная). Нерастворимая форма полимеризации молекул коллагена толщиной 14–300 нм и периодичностью 64–70 нм. В ней различают субфибриллы 5–10 нм, редко – протофибриллы или филаменты 1,5–3 нм.
2. Микрофибрилла. Изолированные тонкие структуры толщиной 10–20 нм без поперечной исчерченности.
3. Волокно. Пучки фибрилл, чаще однонаправленных, толщиной 0,5–10 мкм (видны в световом микроскопе).
4. Пучок волокон. Пучки параллельных или переплетающихся волокон толщиной до 150 мкм. [16].

Важное достоинство фибробластов в том, что они не имеют на своей поверхности так называемых антигенов системы HLA, которые в основном и определяют отторжение иммунной системой организма чужеродных тканей.

По нашему мнению, микрогеометрия поверхности имплантата наряду с другими факторами может влиять на форму, ориентацию и характеристики роста культивируемых клеток. В связи с этим диапазон размеров в текстуре поверхности имплантата должен быть сопоставим с размерами клеток реципиентной зоны на различных этапах роста и созревания.

Цель работы – изучение взаимодействия мягких тканей с поверхностью сплавов ZrO_2 и TiO_2 , модифицированной методом лазерной абляции, после подкожной имплантации.

Материалы и методы

Эксперимент проводили на базе Сумского государственного университета после утверждения комиссией по биомедицинской этике (№ 14/06 на 14.6.2015).

36 лабораторных крыс в возрасте 8–9 месяцев были рандомизированы в три серии – контроль и две экспериментальных серии. Животных содержали в виварии при температуре $22 \pm 2^\circ C$ со сменой циклов день/ночь в режиме 12/12 часов. Пищу и воду животные получали по желанию. Содержание животных и проведение эксперимента соответствовало директиве 2010/63 / ЕС Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010 года о защите животных, используемых для научных целей.

Распределение животных в зависимости от типа сплава и размера поверхности представлено в таблице 1.

Процедура имплантации: после общей анестезии (кетамин 10 мг на 1 г массы животного) и катетеризации периферической вены мы брили спину животных в межлопаточной области. Операционное поле обрабатывали раствором 70 % этанола, после чего проводили продольный разрез. Разделяли подкожные ткани выше левой лопатки и помещали трансплантат (диаметром 5 и толщиной 1 мм) под кожу на расстоянии 1,0 см от разреза. Перед имплантацией все трансплантаты стерилизовали в 70 % этаноле в течение 30 мин. Рана закрывалась швами и накладывалась асептическая повязка.

После операции все животные содержались в отдельных клетках для предотвращения дополнительного травматизма. Животные были выведены из эксперимента путем передозировки наркоза (кетамин 70 мг на 1 кг массы животного) через десять дней после имплантации.

Для изучения образцов использовалась сканирующая электронная микроскопия.

Образцы были удалены с осторожностью, чтобы предотвратить повреждение тканей, покрывающих имплантаты. Все образцы были помещены в 5 % формальдегида в течение одного часа, обезвожены в этаноле и

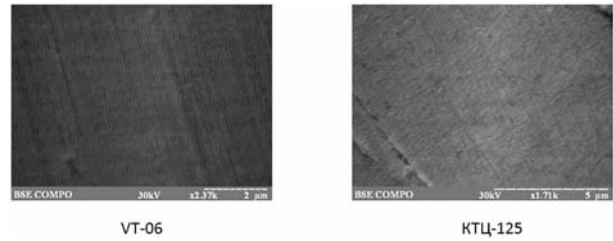


Рис. 1.1.

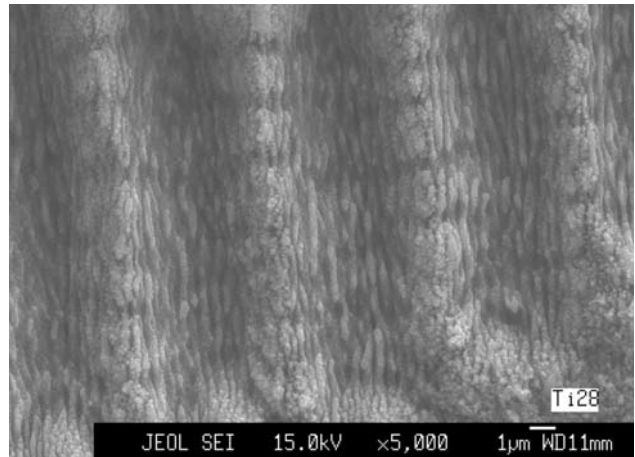


Рис. 1.2. VT-06.

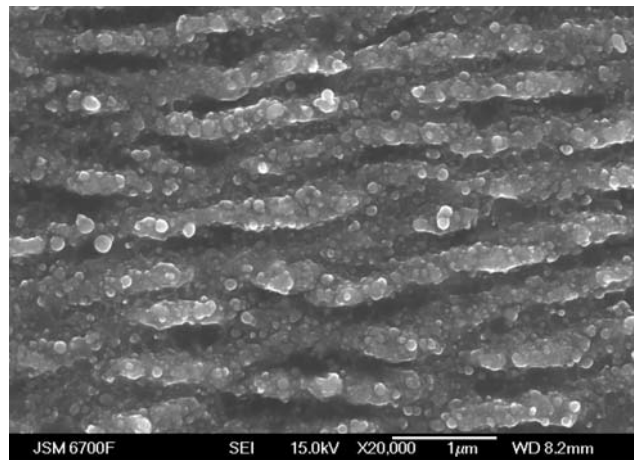


Рис. 1.3. КТЦ-125.

Рис. 1.1., 1.2., 1.3. Поверхность сплавов после лазерной абляции. Растровая электронная микроскопия.

Таблица 1

Распределение животных в зависимости от вида сплава и размера поверхности

Серия	Тип сплава	Размер поверхности	Кол-во животных
Контроль	VT-06	Гладкая поверхность (класс полировки 11–15)	6
	КТЦ-125		6
Серия 1-а	VT-06	48,25±5,6 нм	6
Серия 1-б	VT-06	102,8±6,2 нм	6
Серия 2-а	КТЦ-125	42,5±3,8 нм	6
Серия 2-б	КТЦ-125	121,47±7,9 нм	6

Клеточный состав поверхности имплантата в зависимости от размеров поверхности

Серия	Тип сплава	Размер поверхности	Количество клеток на 1 мм ² поверхности		
			эритроциты	лейкоциты	фибробласты
Контроль	VT-06	Гладкая поверхность (класс полировки 11–15)	-	-	-
	КТЦ-125		-	-	-
Серия 1-а	VT-06	48,25±5,6 нм	11,5±2,9	3,6±1,2	7,4±0,6
Серия 1-б	VT-06	102,8±6,2 нм	12,7±1,2	2,8±0,4	4,6±0,9*
Серия 2-а	КТЦ-125	42,5±3,8 нм	13,3±4,3	2,1±0,5	8,8±0,4
Серия 2-б	КТЦ-125	121,47±7,9	13,9±2,0	3,1±0,7	5,5±1,3*

* – $p \leq 0,05$ по сравнению с предыдущей группой животных.

высушены в вакууме. Чтобы избежать накопления заряда поверхности, все образцы были покрыты тонким (30–50 нм) слоем серебра в вакуумной установке «ВУП-5М» (SELMI, Украина). Сканирующую электронную микроскопию проводили с использованием электронного микроскопа «РЕММА102» (SELMI, Украина). Для анализа результатов эксперимента использовали следующий алгоритм:

1. Наличие клеток и волокон на поверхности образца и их распределение;
2. Количество клеток на 1 мм² поверхности образца;
3. Размер волокон.

Результаты и обсуждение

Использование лазерной абляции позволило сформировать наноструктурированную поверхность в виде продольных «бороздок» (рис. 1). Как видно из рисунка, на поверхности образцов наблюдается равномерное распределение бороздок, при этом поверхность титанового сплава имеет выраженную исчерченность, в то время как на поверхности сплава циркония наблюдаются ровные участки. Данный факт является основанием для дальнейших экспериментов по выбору режимов работы с циркониевыми сплавами для обеспечения оптимального распределения наноразмерных структур. Использование разных режимов работы лазера позволило сформировать поверхность в двух размерных диапазонах – до 100 нм и более 100 нм. Точные размеры поверхности приведены в разделе «Материалы и методы». Необходимость выбора двух диапазонов шероховатости обусловлена отсутствием данных об оптимальных размерах, необходимых для адгезии протеинов и клеток на поверхности имплантата.

После десяти дней подкожной имплантации на поверхности контрольных образцов отсутствуют клеточные элементы и волокна. Это обусловлено отсутствием субстрата для адгезии в первую очередь протеинов крови и межклеточной жидкости в первые часы после имплантации. Многочисленные исследования показали, что наличие микро- и наноструктур на поверхности имплантатов усиливают адгезию белков, в том числе молекул клеточной адгезии и факторов роста, по сравнению с гладкой поверхностью.

В отличие от контроля поверхность экспериментальных образцов полностью покрыта волокнами, формирующими сложные трехмерные структуры. На поверхности волокон визуализируются клетки – эритроциты, лейкоциты и фибробласты. Морфометрия препаратов не выявила достоверных отличий в плотности клеток между сплавами VT-06 и КТЦ-125, при этом наблюдается достоверная разница между группами с различными размерами поверхности (табл. 2).

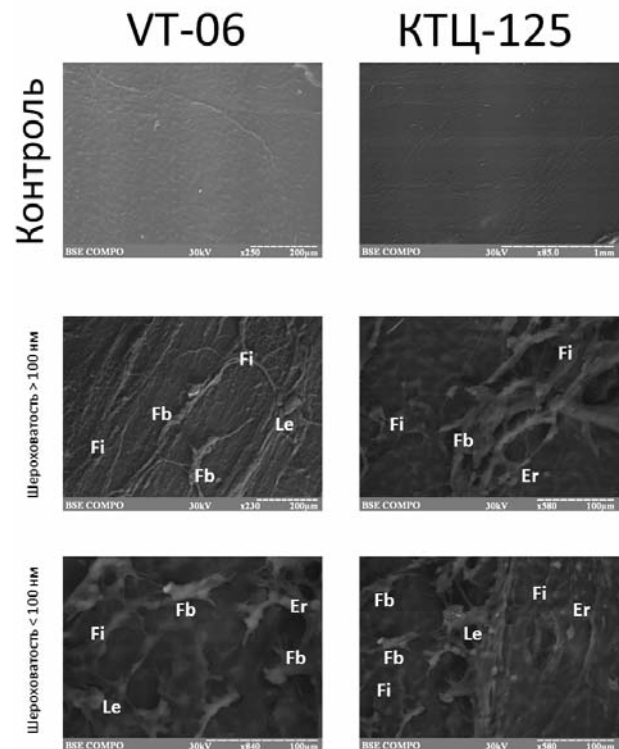


Рис. 2. Растровая электронная микроскопия поверхности сплавов VT-06 и КТЦ-125 через десять дней после подкожной имплантации.

Модифицированная поверхность покрыта развитой сетью соединительнотканых волокон (Fi), на поверхности которых визуализируются эритроциты (Er), лейкоциты (Le) и фибробласты (Fb). Отростки последних анастомозируют с поверхностью сплавов и покрывающими их волокнами.

Количество эритроцитов на поверхности образцов колеблется в диапазоне от 11,5±2,9 до 13,9±2,0 клетки на мм², эритроцитов – от 2,1±0,5 до 3,6±1,2. При этом достоверная разница между группами не наблюдается. Фибробласты, как основной клеточный субстрат соединительной ткани по данным эксперимента, являются чувствительными к изменению размера поверхности. Как видно из таблицы, количество клеток на образцах с модифицированной поверхностью менее 100 нм практически в два раза больше по сравнению с поверхностью, имеющей шероховатость более 100 нм. Некоторые исследователи показывают, что остеобласты имеют

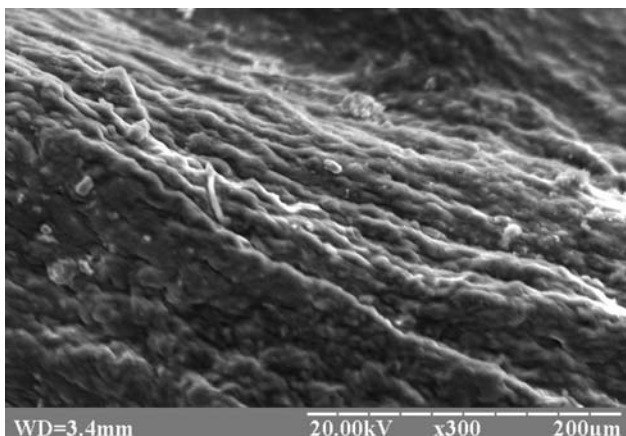


Рис. 3.1. Растровая электронная микроскопия поверхности сплавов VT-06 и KTC-125 через тридцать дней после подкожной имплантации.

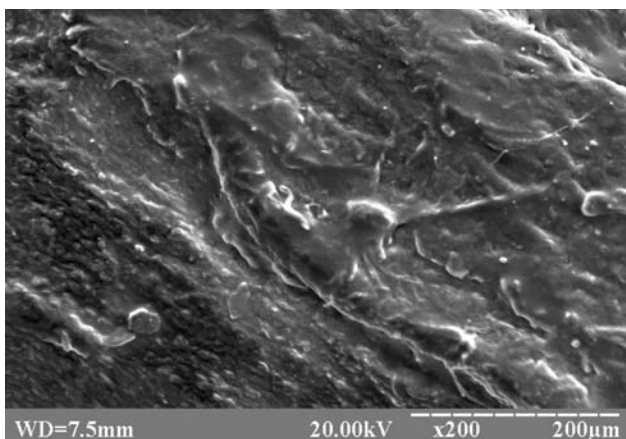


Рис. 3.2. Растровая электронная микроскопия поверхности сплавов VT-06 и KTC-125 через тридцать дней после подкожной имплантации.

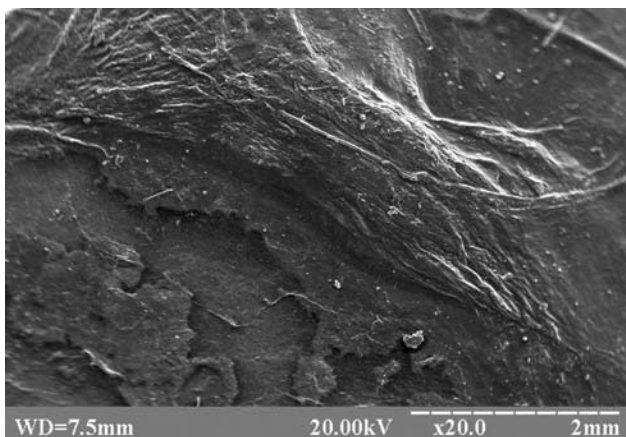


Рис. 3.3. Растровая электронная микроскопия поверхности сплавов VT-06 и KTC-125 через тридцать дней после подкожной имплантации.

большее сродство к микроструктурированной шероховатости, в то время как пролиферация фибробластов интенсивнее происходит на гладкой поверхности [17]. В то же время отсутствуют данные о реакции фибробластов на наноструктурированную поверхность различного диапазона размеров. Наш эксперимент показал преимущество поверхности с размерами менее 100 нм для адгезии фибробластов, что можно использовать для повышения функциональности поверхности имплантатов.

Как видно из рис. 2, на поверхности наноструктурированных образцов формируется сеть волокон с размерами $2,5 \pm 0,3$ мкм, которые формируют фибриллярные структуры толщиной до 20–30 мкм. Различий в топографии волокон и их размеров в зависимости от структуры поверхности и вида сплава не обнаружили.

Механизм, который лежит в основе улучшения адгезии клеток на поверхности имплантатов, может состоять в следующем: в течение первых минут после имплантации на поверхности образцов с измененной топографией происходит абсорбция протеинов и органических молекул, таких как АДФ, АТФ, серотонин, фибриноген, фибронектин, фактор Виллибранта и факторы роста, которые способствуют дальнейшей адгезии клеток на поверхности образца [18, 19]. Возможно, поверхность с меньшим размером шероховатости адгезирует большее количество факторов роста и клеточной адгезии, что способствует активации пролиферации фибробластов. Очень важным моментом является отсутствие разницы между клеточным составом на поверхности титанового и циркониевого сплава, что дает возможность сделать вывод о первичном влиянии наноструктур на процессы адгезии протеинов и клеток.

На рис. 3.1., 3.2., 3.3. – общий вид поверхности.

Вся поверхность металла покрыта фиброзной тканью. При большем увеличении – пучки волокон, а также клетки с отростками, которые находятся на поверхности волокон.

Разницы между сплавами нет.

Выводы

1. Изменение размера шероховатости поверхности сплава в диапазоне от 50 до 300 нм позволяет увеличить плотность фибробластов на единицу площади после десяти дней подкожной имплантации. При этом поверхность немодифицированных сплавов свободна от клеточных и фибриллярных структур.
2. Тип сплава не является фактором, определяющим адгезию волокон и пролиферацию клеток, в то время как формирование нанощероховатости позволяет формировать соединительнотканый каркас на поверхности имплантата.
3. Формирование на наноструктурированной поверхности образцов фибриллярных структур толщиной до 20–30 мкм доказывает возможность соединительнотканной интеграции с поверхностью оксидной пленки материала.
4. Полученные после тридцати дней эксперимента данные позволяют сделать заключение о возможности стойкой интеграции мягких тканей в структуру имплантата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Albrektsson T., Hansson H.A., Ivarsson B. Interface analysis of titanium and zirconium bone implants // *Biomaterials*. – 1985; 6: 97–101.
2. Albrektsson T., Hansson H.A. An ultrastructural characterization of the interface between bone and sputtered titanium or stainless steel surfaces // *Biomaterials*. – 1986;

7: 201–205.

3. Albrektsson T., Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1—review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them // *Int. J. Prosthodont.* – 2004; 17: 536–543.

4. Albrektsson T., Wennerberg A. The impact of oral implants – Past and future, 1966–2042 // J. Can. Dent. Assoc. – 2005; 71: 327.
5. Buser D., Schenk R.K., Steinemann S., Fiorellini J.P., Fox C.H., Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs // J. Biomed. Mater. Res. – 1991; 25: 889–902.
6. Haddad R.J. Jr., Cook S.D., Thomas K.A. Biological fixation of porous-coated implants // J. Bone Joint Surg. Am. – 1987; 69: 1459–1466.
7. Linder L., Carlsson A., Marsal L., Bjursten L.M., Branemark P.I. Clinical aspects of osseointegration in joint replacement. A histological study of titanium implants // J. Bone Joint Surg. Br. – 1988; 70: 550–555.
8. Ricci J.L., Gona A.G., Alexander H. In vitro tendon cell growth rates on a synthetic fiber scaffold material and on standard culture plates // J. Biomed. Mater. Res. – 1991; 25: 651–666.
9. Thomas K.A., Kay J.F., Cook S.D., Jarcho M. The effect of surface macrotexture and hydroxylapatite coating on the mechanical strengths and histologic profiles of titanium implant materials // J. Biomed. Mater. Res. – 1987; 21: 1395–1414.
10. Schwartz Z., Nasazky E., Boyan B.D. Surface microtopography regulates osteointegration: The role of implant surface microtopography in osteointegration // Alpha Omegan. – 2005; 98: 9–19.
11. Wennerberg A., Hallgren C., Johansson C., Danelli S. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses // Clin. Oral Implants. Res. – 1998; 9: 11–19.
12. Zhao G., Schwartz Z., Wieland M., Rupp F., Geis-Gerstorf J., Cochran D.L., Boyan B.D. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure // J. Biomed. Mater. Res. – 2005; 74: 49–58.
13. Zinger O., Zhao G., Schwartz Z., Simpson J., Wieland M., Landolt D., Boyan B. Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features // Biomaterials. – 2005; 26: 1837–1847.
14. Batzer R., Liu Y., Cochran D.L., Szmuckler-Moncler S., Dean D.D., Boyan B.D., Schwartz Z. Prostaglandins mediate the effects of titanium surface roughness on MG63 osteoblastlike cells and alter cell responsiveness to 1 alpha, 25-(OH)2D3 // J. Biomed. Mater. Res. – 1998; 41: 489–496.
15. Kieswetter K., Schwartz Z., Hummert T.W., Cochran D.L., Simpson J., Dean D.D., Boyan B.D. Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells // J. Biomed. Mater. Res. – 1996; 32: 55–63.
16. В.В. Серов, А.Б. Шехтер. Соединительная ткань. (функциональная морфология и общая патология). – Москва: Медицина, 1981.
17. Tobias P., Kunzler, Tanja Drobek, Martin Schuler, Nicholas . Spencer Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients // Biomaterials 28 (2007). – P. 2175–2182.
18. Park J.Y., Gemmell C.H., Davies J.E. Platelet interactions with titanium: modulation of platelet activity by surface topography // Biomaterials. – 2001; 22: 2671–82.
19. Kikuchi L., Park J.Y., Victor C., Davies J.E. Platelet interactions with calcium-phosphate-coated surfaces // Biomaterials. – 2005; 26: 5285–95.

In-vivo оцінка взаємодії м'якої тканини з наноструктурованою поверхнею ZrO₂ та TiO₂

О.Н. Мищенко

Мета: вивчення взаємодії м'яких тканин з поверхнею сплавів ZrO₂ та TiO₂, модифікованої методом лазерної абляції, після підшкірної імплантації.

Матеріали та методи. Експеримент проводили на базі Сумського державного університету після затвердження комісією з медичної етики (№ 14/06 на 14/06/2015).

36 лабораторних щурів у віці 8–9 місяців були рандомізовані у три серії – контрольну (модифіковані зразки) та дві експериментальні (ZrO₂ та TiO₂). Імплантація сплавів проводилась підшкірно на строк 10 і 30 днів, після чого проводилась растрова електронна мікроскопія поверхні зразків.

Результати. Використання лазерної абляції дозволило сформувати наноструктуровану поверхню у вигляді поздовжніх «боріздок». Використання різних режимів роботи лазера дозволило сформувати поверхню у двох розмірних діапазонах – до 100 нм та більше 100 нм. Після десяти днів підшкірної імплантації на поверхні контрольних зразків відсутні клітчасті елементи та волокна. Це обумовлено відсутністю субстрату для адгезії, у першу чергу протеїнів крові та міжклітчастої рідини в перші години після імплантації. Багаточисленні дослідження показали, що присутність мікро- й макроstruktur на поверхні імплантатів підсилює адгезію білків, у тому числі молекул клітчастої адгезії й факторів росту, у порівнянні із гладкою поверхнею. Присутність наноструктурних утворень на поверхні зразків сприяє адгезії клітин, у першу чергу фібробластів, і формуванню з'єднувальнотканинного каркасу.

Висновки. Формування на наноструктурованій поверхні зразків фібрилярних структур доводить можливість прикріплення з'єднувальної тканини до поверхні оксидної плівки матеріалу.

Ключові слова: імплантат, лазерна абляція, з'єднувальна тканина, фібробласти.

In-vivo assessment of connective tissue integration with nanostructured surface of ZrO₂ and TiO₂ alloys

O. Mishchenko

Aim: to analyze connective tissue integration with surface of ZrO₂ and TiO₂ alloys modified by laser ablation after the subcutaneous implantation.

Materials and Methods. The experiment was conducted on the base of Sumy State University after approval by the Commission on biomedical ethics (№ 14/06 to 06/14/2015).

36 laboratory rats, aged 8–9 months, were randomized into 3 series – the control and 2 experimental ones. Alloys implantation made in subcutaneous tissue for 10 days and scanning electron microscopy was made after samples removing.

Results. Using of laser ablation allowed formation of nanostructured surface as a longitudinal «grooves». Using the different modes of laser allowed as made surface of a 2-dimensional range – above the 100 nm and below 100 nm. No one cell and fibers present on the surface of the control samples after 10 days and 30 days of subcutaneous implantation. This is due to lack of substrate for adhesion such as proteins from blood and extracellular fluid in first hours after implantation. Numerous studies have shown that the existence of micro- and nanostructures on the surface of the implant increase the adhesion of proteins, including adhesion molecules and growth factors, compared with a smooth surface. Nano-scale grooves on alloy surface accelerate cell adhesion, especially fibroblasts, and connective tissue network formation.

Conclusion. Fibrillar structure formation on the sample's nanostructured surface proves the possibility of connective tissue integration with the surface of material's oxide film.

Key words: prosthesis, laser ablation, connective tissue, fibroblasts.

О.Н. Мищенко – доцент.

Запорожский государственный медицинский университет.

НПК «Zircon Prior.»