

Исследование на экспериментальной модели большеберцовой кости кролика



Воздействие гидрофильной наноструктурной поверхности на процессы остеоинтеграции в сравнении с поверхностью, полученной по методу пескоструйной обработки и кислотного травления.

Alpha-Bio Tec. Отдел НИОКР¹, Израиль | 2021

Введение

Разработка максимально эффективной поверхности имплантата по-прежнему сопряжена с целым рядом трудностей как в стоматологическом, так и в ортопедическом контексте, как то замещение тазобедренного или коленного сустава, установка позвоночных имплантатов, применением стабилизационных пинов, зубных имплантатов и так далее.

Зубная имплантация считается успешным видом терапии для реабилитации зубочелюстной системы. Однако различные клинические случаи и далее представляют сложность при выполнении этой процедуры, например, при дефиците количества или ухудшении качества костной ткани, остеопорозе, замедленном заживлении ран вследствие приёма системных медикаментозных препаратов, а также при проведении одномоментной нагрузки или сокращении периода заживления.

Создание биоматериалов, главным образом, поверхностей имплантатов из титанового сплава, нацелено на достижение имитации биологических процессов ради улучшения остеогенной дифференциации и аппозиции клеток костной ткани.

Исследователи в области имплантологии уже смогли установить, что такие изменения поверхности как придание ей шероховатости, влияние на химический состав и молекулярную энергию позволяют улучшить пролиферацию и дифференциацию остеобластов, экспрессию генов и локальную секрецию факторов, способствующих росту кости.

Субмикронная шероховатость поверхности имплантата (после пескоструйной обработки и кислотного травления) на размерном уровне меньше диаметра клеток. Биологическая логика заключается в том, что остеобласты начнут механическое взаимодействие с такой поверхностью, которая имитирует лакуну после резорбции вследствие реакции ацидификации на фестончатом крае остеокласта.

Следующий уровень шероховатости представлен наноструктурной поверхностью, которая влияет на зону контакта между клетками и имплантатов и отображает клеточно-белковые взаимодействия. Таким образом, нанотопография оказывает механический, химический и биологический эффект.

Цель данного исследования заключалась в изучении влияния гидрофильной наноструктурной поверхности на площадь контакта имплантата с костью (BIC) на модели большеберцовой кости кролика при применении стандартного имплантата (с поверхностью после пескоструйной обработки и кислотного травления) и имплантата с гидрофильной наноструктурной поверхностью.

¹Отдел НИОКР – отдел научно-исследовательских и опытно-конструкторских разработок.

Материалы и методы

Данное исследование проводилось с одобрения Комитета по содержанию и использованию лабораторных животных Тель-Авивского университета. Все эксперименты выполняли в соответствии с одобренными процедурами и рекомендациями согласно руководству ARRIVE1.

В исследовании использовали семь самок белого новозеландского кролика в возрасте 6 месяцев и весом от 3,5 до 4,2 кг. Все они были помечены в клетках и содержались в скорректированной обогащённой среде. Согласно протоколу сверления компании-производителя выполнили две остеотомии на предварительно обнажённой большеберцовой кости для установки имплантатов диаметром 3,75 мм и длиной 8 мм. Установили два коммерческих имплантата (Alpha-Bio Tec.): один с нанометрической шероховатостью поверхности (MultiNeO NH), другой с микроскопической шероховатостью (Multineo CS), оставив между ними расстояние 8 мм.

Спустя 3 недели аналогичную хирургическую процедуру повторили на противоположной конечности каждого из семи животных.

Животных умертвили через 3 недели после последнего оперативного вмешательства (т.е. через 6 недель после первого вмешательства), после чего к гистологическому исследованию подготовили недекальцифицированные образцы 14 большеберцовых костей, с окраской ализариновым красным, по два образца на каждый имплантат

Гистология и гистоморфометрия

После умерщвления кроликов большеберцовые кости и окружающие их ткани собрали для подготовки образцов в виде блоков для изготовления срезов для гистологического исследования.

Срезу проанализировали и зафиксировали с помощью оптического микроскопа и программного обеспечения Image-J.

Площадь контактной поверхности имплантата с костью измерили на каждом слайде. Данные о BIC суммировали и разделили на общий периметр имплантата.

Результаты

Рис. 1

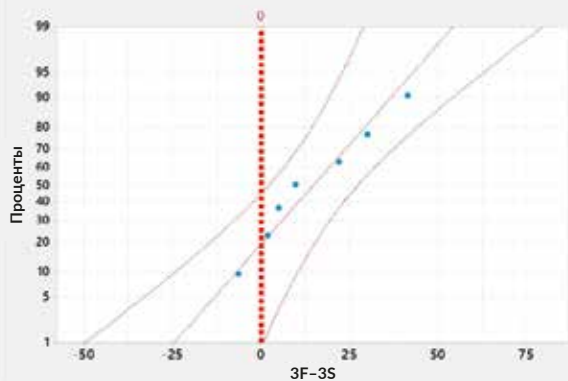
Спустя 3 недели после операции было установлено статистически значимое преимущество гидрофильной наноструктурной поверхности по параметру площади контакта имплантата с костью в сравнении со стандартной поверхностью после пескоструйной обработки и кислотного травления.

Рис. 2

Сравнение показателей BIC.

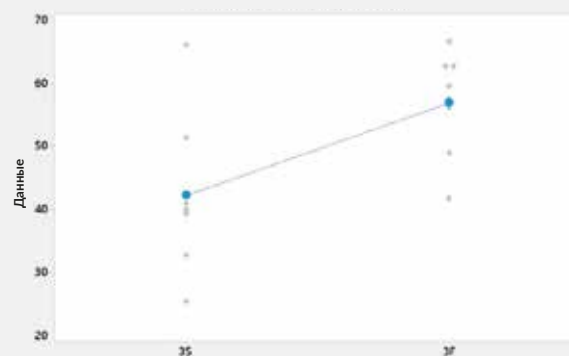
В срок через 3 недели наноструктурные имплантаты продемонстрировали 55% площади контактной поверхности с костью по сравнению с показателем 42%, который зафиксировали у имплантатов с поверхностью SLA.

График плотности распределения 3F-3S
Нормальное значение – 95% CI



- 3F- имплантаты с гидрофильной наноструктурной поверхностью
- 3S- имплантаты со стандартной поверхностью после пескоструйной обработки и кислотного травления (SLA).

Распределение индивидуальных показателей 3S, 3F



- Статистическая значимость указывает на увеличенную площадь контактной поверхности имплантата с костью (BIC) у всех экспериментальных животных при использовании гидрофильных наноструктурных имплантатов в отличие от стандартных имплантатов с поверхностью, прошедшей пескоструйную обработку и кислотное травление, через 3 недели после операции.

Исследование на экспериментальной модели большеберцовой кости кролика



Воздействие гидрофильной наноструктурной поверхности на процессы остеоинтеграции в сравнении с поверхностью, полученной по методу пескоструйной обработки и кислотного травления.

Alpha-Bio Tec. Отдел НИОКР, Израиль | 2021

Рис. 3

Гистология нанометрической поверхностной шероховатости через 3 недели после имплантации. Синие стрелки указывают на новую кость в контакте с поверхностью имплантата. 10-тикратное увеличение. (Срез подготовлен без декальцификации, окраска ализариновым красным).

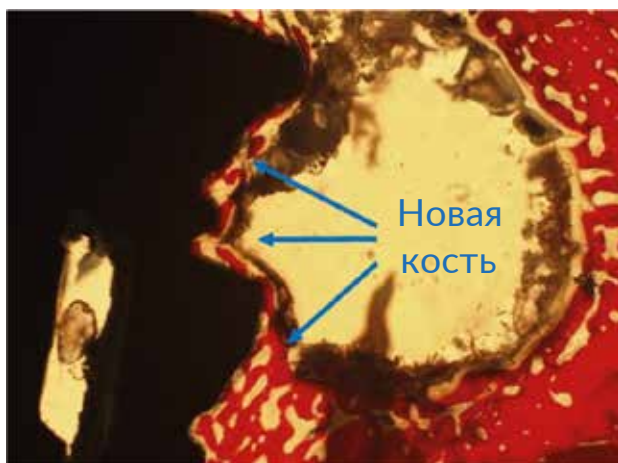


Рис. 4

Гистология микронной/субмикронной поверхностной шероховатости через 3 недели после имплантации. Примечательно, что в контакте с имплантатом находится лишь малое количество новой кости. Имплантат с поверхностью SLA. 10-тикратное увеличение. (Срез подготовлен без декальцификации, окраска ализариновым красным).



Обсуждение результатов

Высокий остеоинтегративный потенциал требует синергии целого ряда современных характеристик. Поэтому в рамках данного доклинического исследования было решено изучить мультифункциональную поверхность (гидрофильную, с наноструктурной шероховатостью) в протоколе *in vivo* (на большеберцовой кости кролика).

Быстрое заживление и образование новой кости являются следствием сочетанного влияния нескольких разных явлений – биоактивности поверхности и осаждению апатита на ней (минерализация), высокой скорости клеточной адгезии и пролиферации остеобластов,

высокой степени дифференциации клеток и поляризации макрофагов, что способствует секреции и выведению белка костного морфогенеза (BMP2) и увеличению площади контактной поверхности имплантата с костью (BIC).

Топография поверхности, её химический состав и степень смачиваемости имеют решающее значение в том, какова будет реакция кости на титановую поверхность (BIC), что проявляется уже на самых ранних этапах после установки имплантата, как было показано в рамках этого исследования.



Заключение

Нам удалось убедительно продемонстрировать, что ранние этапы заживления костной ткани протекают гораздо более результативно при применении поверхности с наноструктурной шероховатостью, которая при взаимодействии с принимающей костной тканью большеберцовой кости кролика по сравнению с поверхностью, прошедшей пескоструйную обработку кислотное травление. Преимущества имплантатов с гидрофильной наноструктурной поверхностью вывели их в лидеры спустя 3 недели после имплантации, показав 30%-ное увеличение площади контактной поверхности имплантата с костью (BIC) (55% BIC против 42%). По прошествии 6 недель после операции эта тенденция сохранилась. Позволим себе предположить, что оптимизация фазы заживления может создавать предпосылки для ранней нагрузки таких имплантатов у человека за счёт более высоким показателям BIC, которые являются результатом прямого действия или опосредованного влияния каскада реакций, происходящих при взаимодействии раневого заживления и наноструктурной шероховатости поверхности как на клеточном, так и на молекулярном уровне.

Библиография

- Shibata Y, Tanimoto Y, Maruyama N, Nagakura M. A review of improved fixation methods for dental implants. Part II: biomechanical integrity at bone-implant interface. *J Prosthodont Res*. 2015 Apr;59(2):84-95.
- Smeets R, Stadlinger B, Schwarz F, Beck-Broichsitter B, Jung O, Precht C, Kloss F, Gröbe A, Heiland M, Ebker T. Impact of Dental Implant Surface Modifications on Osseointegration. *Biomed Res Int*. 2016.
- Scarano A, Piattelli A, Quaranta A, Lorusso F. Bone Response to Two Dental Implants with Different Sandblasted/Acid-Etched Implant Surfaces: A Histological and Histomorphometrical Study in Rabbits. *Biomed Res Int*. 2017.
- Moon BS, Kim S, Kim HE, Jang TS. Hierarchical micro-nano structured Ti6Al4V surface topography via two-step etching process for enhanced hydrophilicity and osteoblastic responses. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017 Apr 1; 73:90-98.
- Coelho PG, Takayama T, Yoo D, Jimbo R, Karunakaran S, Tovar N, Janal MN, Yamano S. Nanometer-scale features on micrometer-scale surface texturing: a bone histological, gene expression, and nanomechanical study. *Bone*. 2014 Aug; 65:25-32.
- Gittens RA, McLachlan T, Olivares-Navarrete R, Cai Y, Berner S, Tannenbaum R, Schwartz Z, Sandhage KH, Boyan BD. The effects of combined micron-/submicron- scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. *Biomaterials*. 2011 May;32(13):3395-403.
- Kanai R, Kuroshima S, Kamo M, Sasaki M, Uto Y, Inaba N, Uchida Y, Hayano H, Tamaki S, Inoue M, Sawase T. Effects of surface sub-micrometer topography following oxalic acid treatment on bone quantity and quality around dental implants in rabbit tibiae. *Int J Implant Dent*. 2020 Nov 27;6(1):75.
- Berger MB, Bosh KB, Jacobs TW, Joshua Cohen D, Schwartz Z, Boyan BD. Growth factors produced by bone marrow stromal cells on nanoroughened titanium-aluminum-vanadium surfaces program distal MSCs into osteoblasts via BMP2 signaling. *J Orthop Res*. 2020 Oct 1.
- Mendonça G, Mendonça DB, Aragão FJ, Cooper LF. Advancing dental implant surface technology -from micron- to nanotopography. *Biomaterials*. 2008 Oct;29(28):3822-35. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.
- Wilkinson A, Hewitt RN, McNamara LE, McCloy D, Dominic Meek RM, Dalby MJ. Biomimetic microtopography to enhance osteogenesis in vitro. *Acta Biomater*. 2011 Jul;7(7):2919-25.
- Azeem A, English A, Kumar P, Satyam A, Biggs M, Jones E, Tripathi B, Basu N, Henkel J, Vaquette C, Rooney N, Riley G, O'Riordan A, Cross G, Ivanovski S, Huttmacher D, Pandit A, Zeugolis D. The influence of anisotropic nano- to micro- topography on in vitro and in vivo osteogenesis. *Nanomedicine (Lond)* 2015;10(5):693-711.
- Huang L, Luo Z, Hu Y, Shen X, Li M, Li L, Zhang Y, Yang W, Liu P, Cai K. Enhancement of local bone remodeling in osteoporotic rabbits by biomimic multilayered structures on Ti6Al4V implants. *J Biomed Mater Res A*. 2016 Jun;104(6):1437-51.
- Hyzy SL, Cheng A, Cohen DJ, Yatzkaier G, Whitehead AJ, Clohessy RM, Gittens RA, Boyan BD, Schwartz Z. Novel hydrophilic nanostructured microtexture on direct metal laser sintered Ti-6Al-4V surfaces enhances osteoblast response in vitro and osseointegration in a rabbit model. *J Biomed Mater Res A*. 2016 Aug;104(8):2086-98.
- Mapara M, Thomas BS, Bhat KM. Rabbit as an animal model for experimental research. *Dent Res J* 2012;9:111-118.
- Yang GL, He FM, Yang XF, Wang XX, Zhao SF. Bone responses to titanium implants surface-roughened by sandblasted and double etched treatments in a rabbit model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol End* 2008;106:516-524.
- Le Guehennec L, Goyenvalle E, Lopez-Heredia M-A, Weiss P, Amourig Y, Layrolle P. Histomorphometric analysis of the osseointegration of four different implant surfaces in the femoral epiphyses of rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2008;19:1103-1110.
- Gotz HE, Muller M, Emmel A, Holzwarth U, Erben RG, Stangl R. Effect of surface finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants. *Biomaterials* 2004;25:4057-4064.
57. Coelho PG, Granjeiro JM, Romanos GE, Suzuki M, Silva NRF, Cardaropoli G, Thompson VP, Lemons JE. Basic research methods and current trends of dental implant surfaces. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;88B:579-596.
58. Sollazzo V, Pezzetti F, Scarano A, Piattelli A, Bignozzi CA, Massari L, Brunelli G, Carinci F. Zirconium oxide coating improves implant osseointegration in vivo. *Dent Mater* 2008;24:357-361.
59. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: A review. *Eur Cell Mater* 2007;13:1-10.