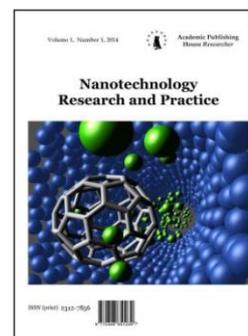


Copyright © 2014 by Academic Publishing House *Researcher*

Published in the Russian Federation  
Nanotechnology Research and Practice  
Has been issued since 2014.  
ISSN: 2312-7856  
Vol. 2, No. 2, pp. 73-79, 2014

DOI: 10.13187/ejnr.2014.2.73  
[www.ejournal13.com](http://www.ejournal13.com)



UDC 616

### Periimplant Zone Morphology after Application of the Nanocomposite Osteoplastic Material

<sup>1</sup> Elena N. Gortynska  
<sup>2</sup> Maxim V. Pogorelov

<sup>1</sup> Sumy State University, Ukraine  
40007, Sumy, R-Korsakova St., 2  
PhD (Medicine)  
E-mail: gektorr@ukr.net

<sup>2</sup> Sumy State University, Ukraine  
40007, Sumy, R-Korsakova St., 2  
Dr. (Medicine), Professor  
E-mail: pogorelov\_max@mail.ru

#### Abstract

Osteoporosis is a metabolic bone multifactorial disease characterized by increased bone fragility due to a decrease in bone mass and microarchitectural spongy and compact bone tissues. The major complications of osteoporosis are fractures of the hip bone and vertebral bodies, the treatment of which is accompanied by significant difficulties and possible complications in the postoperative period because of the poor bone quality. Particularly acute this problem is the use of bone grafts and prostheses – marked osteoporosis can significantly reduce the osseointegration of materials. To improve the biocompatibility of the implants a lot of techniques used in modern medicine such as modification the geometry and topology of the implant surface and deposition on the surface of biologically active molecules. One of the most studied compounds, which are used to cover the implants and independently as osteoplastic material is hydroxyapatite.

The purpose of our study was to investigate changes in the periimplant area of the distal epiphysis of femur after implantation of nanocomposite material based on chitosan and hydroxyapatite.

Implantation of chitosan-apatite nanocomposite material into the distal femoral epiphysis with signs of osteoporosis leads to normalization of trabecular structure and mineral saturation in periimplant zone. Given the data, the apatite-chitosan composite can be considered as the applicant for the surface modification of bone implants.

**Keywords:** Osteoporosis; nanocomposite material; hydroxyapatite; chitosan.

#### Введение

Остеопороз является метаболическим мультифакторным заболеванием костной ткани, характеризующийся повышенной ломкостью костной ткани вследствие снижения костной массы и нарушение микроархитектоники губчатого и компактного вещества кости. Остеопороз характеризуется повышенным риском перелома костей, смертности и требует

дорогостоящего лечения [Raisz L.G., 2005]. Согласно отчету ВОЗ, 35 % женщин старше 65 лет имеют остеопоротические изменения в костной ткани. В 1990 году количество переломов, ассоциированных с остеопорозом, составляло 1,3 млн и их количество удвоится к 2015 году [Gullberg B, 1997]. Основными осложнениями остеопороза являются переломы тел позвонков и переломы шейки бедра, лечение которых сопровождается значительными трудностями и возможными осложнениями в послеоперационный период из-за исходного низкого качества костной ткани [Lips P., 2001].

Качество костной ткани является ключевым параметром, который определяет прогноз у пациентов, прооперированных по поводу патологии опорно-двигательного аппарата. Особенно актуальным данный вопрос является при использовании протезов и остеопластических материалов. Ключевым моментом в процессе интеграции имплантата является остеоинтеграция, которая может быть определена как процесс образования костной ткани вокруг имплантата без развития соединительной ткани [Lamers E, 2010]. Остеоинтеграция возможна при условии миграции и адгезии остеобластов на поверхности материала, с последующей их пролиферацией и синтезом остеоида, который поддается минерализации в более поздние сроки. Дефицит минеральной составляющей костной ткани при остеопорозе, равно как низкая плотность трабекул с расположенными на их поверхности остеобластами, может привести к несостоятельности процессов остеоинтеграции и как следствие – к развитию осложнений.

Для повышения биосовместимости имплантатов в современной медицине используется масса методик, которые сводятся к модификации геометрии и топологии поверхности имплантатов и депонированию на их поверхности биологически активных молекул [John, C.W., 2012]. Среди наиболее распространенных веществ, которые используются для покрытия имплантатов следует выделить элементы костного матрикса – фосфат кальция, гидроксиапатит, коллаген 1 типа, белки костного матрикса, а также факторы роста и синтетические лекарственные препараты, например, бисфосфонаты [Dinda, G.P., 2009; Paital, S.R., 2009; Nijhuis, A.W.G., 2010; Solheim, E., 1998]. Влияние активных покрытий на процессы остеоинтеграции имплантатов изучены достаточно полно. В то же время как биомолекулы покрытия способны к миграции в окружающие ткани и таким образом могут вызывать изменения в периимплантационной зоне.

Одним из наиболее изученных веществ, которые используются для покрытия имплантатов и самостоятельно в качестве остеопластического материала, является гидроксиапатит. Кристаллы гидроксиапатита являются основой минерального компонента костного матрикса. Доказано его позитивное влияние на процессы остеоиндукции, остеоинтеграции и остеоиндукции при различных методах нанесения на покрытие [Ding, L., 2011]. Также доказано преимущество наноразмерного апатита в сравнении с микроразмерным. В то же время неизученным остается вопрос взаимодействия наноапатита с тканями периимплантационной зоной в норме и при различных заболеваниях костной системы, в частности при остеопорозе.

Учитывая изложенные факты, целью нашей работы было выявить изменения в периимплантационной зоне дистального эпифиза бедренной кости после имплантации нанокompозитного материала на основе хитозана и гидроксиапатита.

## **Материалы и методы исследования**

### **Синтез материала.**

Для получения хитозан-апатитного композитного материала в нашей работе использовали низкомолекулярный хитозан (Aldrich). Для синтеза готовили 0,2 % раствор хитозана в 1 % уксусной кислоте. Хитозан растворяли в течение 24 часов при комнатной температуре. Полученный раствор фильтровали через стеклянный фильтр со средним размером пор. К раствору хитозана в уксусной кислоте добавляли в определенных соотношениях свежеприготовленные 1М растворы солей хлорида кальция и фосфат натрия, выдерживая мольное соотношение Ca / P 1,67. Использовали соли квалификации ХЧ.

Перемешивали смесь в течение 10–15 мин с помощью магнитной мешалки. Затем продолжая перемешивание добавляли к прозрачной смеси растворов каплями 1,25 М раствор гидроксида натрия до достижения значения pH 11. При повышении pH до 6,8–7 происходит осаждение хитозана и формирования полимерной матрицы, в которой при

дальнейшем повышении значения pH осаждаются кальций-фосфаты. Образовавшуюся суспензию оставляли на 24 часа при комнатной температуре для старения осадка, что является необходимым условием для образования гидроксиапатита. Затем осадок отфильтровывали с использованием стеклянного фильтра, тщательно промывали дистиллированной водой, проверяя наличие ионов натрия и хлора в промывных водах с помощью качественных реакций. Высушивали при комнатной температуре в течение 3 суток. Для получения пористого материала высушенные в течение 24 час. лиофилизировали в лабораторной установке для лиофильной сушки.

По физической ширине линий рентгеновской дифракции (прибор ДРОН4-07), которая обратно пропорциональна размерам кристаллитов, можно сделать вывод, что увеличение доли хитозана в композитах приводит к уменьшению размер кристаллов апатита. Качественные оценки ширины профиля основных дифракционных линий указывают на то, что при соотношении хитозан / апатит, равное 50/50, размеры кристаллитов в композите соответствуют размерам биоапатита костной ткани (~ 20 нм). Несколько завышена интенсивность пиков (002) и (004), по сравнению со справочными данными (JCPDS №9-432), свидетельствует о вытянутости кристаллитов апатита вдоль кристаллографической оси с, что характерно и для биоапатита костной ткани.

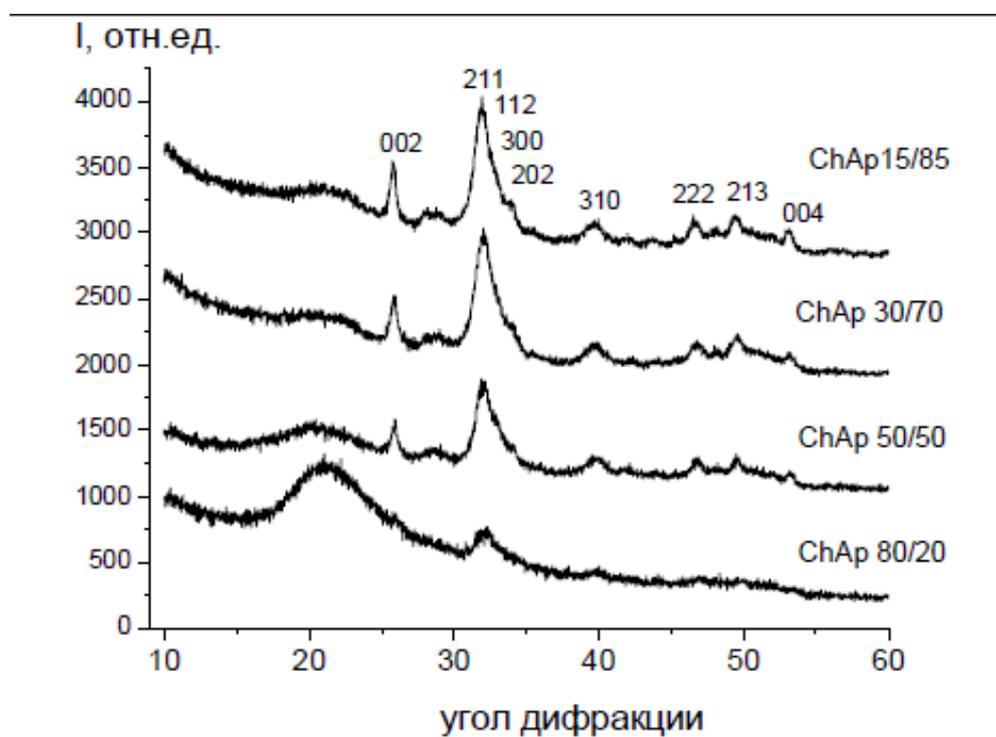


Рис. 1. Картины рентгеновской дифракции образцов хитозан-апатита с разным исходным соотношением компонентов

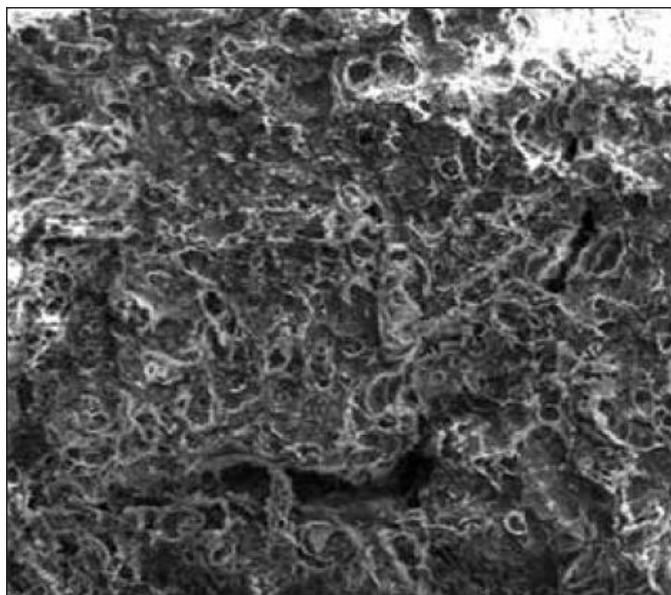


Рис. 2. Электронно-микроскопическое изображение микроструктуры пористого хитозан-апатита, полученного с использованием лиофилизации (увеличение X 200)

Использование лиофильной сушки непосредственно после промывки и старения образцов позволило получать пористые материалы, на микроскопических изображениях которых (рис. 3) морфологически можно различить две системы пор. Измерение и статистическая обработка показали, что «малые» поры имеют средний размер 29,9 мкм, «большие» – 51,0 мкм. Такой размер пор является удовлетворительным для наличия у материала osteoconductive свойств.

#### **Эксперимент *in-vivo*.**

Эксперимент был проведен на 32 лабораторных крысах-самцах зрелого возраста (7 месяцев) массой 180–200 г., которые содержались в стандартных условиях вивария.

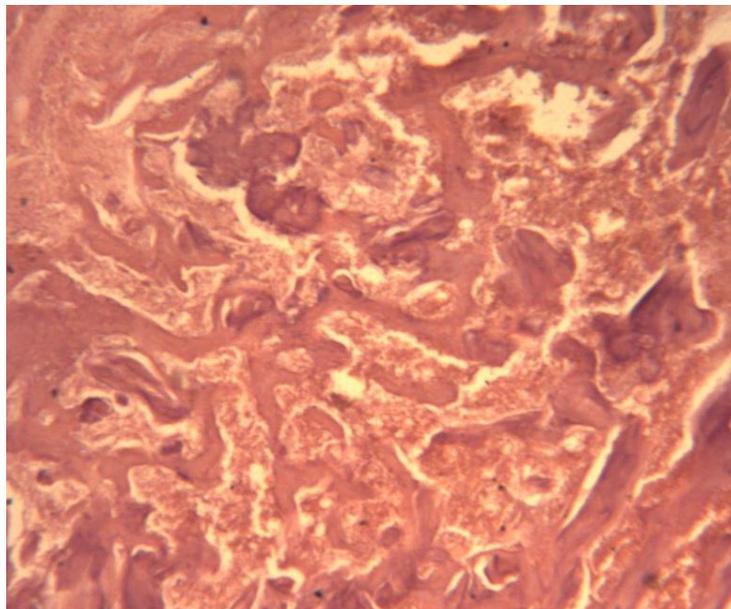
Всем животным моделировали остеопороз путем ежедневных внутривенных инъекций гидрокортизона в дозе 40 мг/кг в течение 28 дней.

После завершения моделирования остеопороза, животные были разделены на 2 группы по 16 крыс в каждой – контрольная и экспериментальная. Экспериментальной группе животных под наркозом стоматологическим бором наносили дефект в проксимальном эпифизе бедренной кости диаметром 2 мм, который заполняли инновационным хитозан-гидроксиапатитным материалом. Животных выводили из эксперимента через 15 и 30 дней после нанесения дефекта. Для анализа производился забор дистального эпифиза бедренной кости и приготовления серии гистологических препаратов для оценки влияния нанокompозитного материала на перимплантационную зону.

#### **Результаты и их обсуждение**

После моделирования остеопороза у животных контрольной серии через 10 и 30 дней наблюдается резкое сужение трабекул губчатой костной ткани, которое визуализируется во всех полях зрения. Отличительной особенностью трабекул кости контрольной группы животных является наличие большого количества конусов ремоделирования, что при снижении общего количества остеобластов свидетельствует о преобладании процессов резорбции над синтезом (рис. 3). Трабекулы губчатого вещества мозаично окрашены, что является признаком неравномерной кальцификации вследствие потери минеральной

составляющей костной ткани. Часть трабекул имеют краевые узоры, что является следствием остеокластической резорбции костной ткани. В глубине трабекул визуализируются пустующие остеоцитарные лакуны. Проводя анализ губчатого вещества, обращает на себя внимание снижение относительной площади трабекул и расширение межтрабекулярного пространства, что является основным признаком развития остеопоротических изменений в костной ткани.

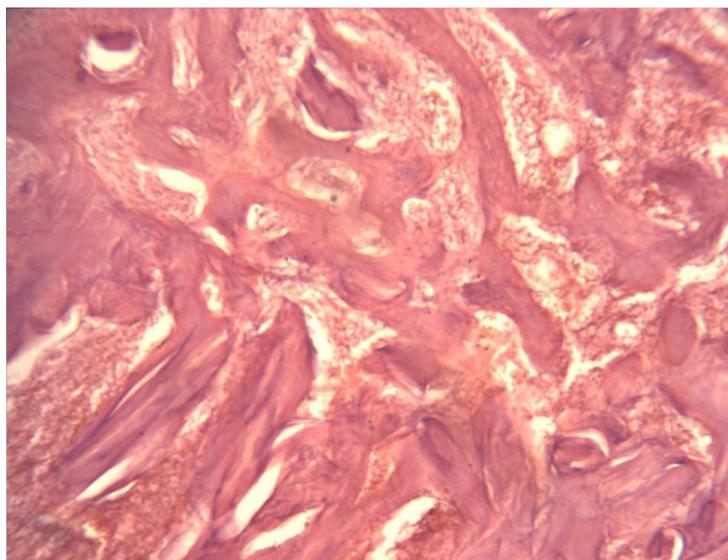


*Рис. 3.* Трабекулы губчатого вещества дистального эпифиза бедренной кости крысы контрольной группы (увеличение – 200X)

Снижение количества остеобластов губчатого вещества кости и уменьшение минеральной насыщенности при проведении имплантации может привести к нарушению остеоинтеграции на начальных этапах и привести к нарушению стабильности имплантата в поздний послеоперационный период.

Через 10 дней после имплантации пористого нанокompозитного материала не наблюдается различий между контрольной и экспериментальной группами животных. Гистологическая картина свидетельствует о наличии остеопороза в периимплантационной зоне. При этом следует отметить снижение количества конусов ремоделирования, что может быть благоприятным прогностическим признаком. При остеопорозе развития зон ремоделирования обусловлено возрастанием активности остеокластической резорбции на фоне снижения активности остеобластов. Данные процессы в конечном итоге приводят к потере костной массы.

Через 30 дней после имплантации хитозан-апатита наблюдается достоверное утолщение трабекул костной ткани периимплантационной зоны. В целом, картина зоны характерна для остеопороза, но утолщение трабекул свидетельствуют об оптимизации процессов ремоделирования и увеличении синтеза костной ткани (рис. 4). Костные трабекулы окрашены более равномерно, что косвенно свидетельствует о нормальном распределении минерального компонента на поверхности трабекул. На поверхности последних увеличивается количество остеобластов – основных синтетических клеток костного матрикса. В глубине трабекул, как и у животных контрольной группы, визуализируются пустующие остеоцитарные лакуны.



*Рис. 4.* Трабекулы губчатого вещества дистального эпифиза бедренной кости крысы в области периимплантационной зоны вокруг хитозан-апатитного материала через 30 дней после нанесения травмы (увеличение – 200X)

Анализируя полученные данные, необходимо отметить два момента – увеличение синтеза межклеточного матрикса и оптимизацию минерального состава трабекул периимплантационной зоны. Известно, что наноразмерный апатит является оптимальным субстратом для процессов адгезии остеобластов, в то время как хитозан является хемоаттрактантом в отношении последних [Anselme, K., 2010]. Комплексное взаимодействие активных субстратов нанокompозитного материала способно таким образом увеличить плотность остеобластов вокруг имплантата, тем самым стимулируя синтез межклеточного матрикса кости. Из предыдущих исследований известно, что хитозан-апатитный композит является биodeградирующим материалом и тем самым – источником кальций-фосфата, который может быть использован как источник для минерализации трабекул костной ткани периимплантационной зоны [M.V. Pogorelov].

### **Выводы**

Таким образом, имплантация хитозан-апатитного нанокompозитного материала в дистальный эпифиз бедренной кости с признаками остеопороза приводит к нормализации структуры трабекул и их минерального насыщения в периимплантационной зоне. Учитывая полученные данные, хитозан-апатитный композит может быть рассмотрен в качестве претендента для модификации поверхности костных имплантатов.

### **References:**

1. Raisz L.G. Pathogenesis of osteoporosis: concept, conflicts and prospects. / L.G. Raisz // J. Clin. Invest. 2005. Vol. 115 (12). P. 3318-3325
2. Gullberg B. World-wide projections for hip fracture. / B. Gullberg, O. Johnell, J.A. Kanis // Osteoporos Int. 1997. Vol. 7(5). P. 407-413.
3. Lips P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. / P. Lips // Endocr Rev. 2001. Vol. 22(4). P. 477-501.
4. The influence of nanoscale grooved substrates on osteoblast behavior and extracellular matrix deposition. / E. Lamers, X.F. Walboomers, M. Domanski [et al.] // Biomaterials 2010. Vol. 31. P. 3307-3316
5. Predicting clinical biological responses to dental materials. / C.W. John // Dent. Mater. 2012 Vol. 28. P. 23-40.

6. Dinda G.P. Pulsed laser deposition of hydroxyapatite thin films on Ti-6Al-4V: Effect of heat treatment on structure and properties. / G.P. Dinda, J. Shin, J. Mazumder // *Acta Biomater.* 2009. V. 5. P. 1821–1830
7. Paital, S.R. Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies. / S.R. Paital, N.B. Dahotre // *Mater. Sci. Eng. Rep.* 2009. V. 66. P. 1–70.
8. Nijhuis A.W.G. Wet-Chemical deposition of functional coatings for bone implantology. / A.W.G. Nijhuis, S.C.G. Leeuwenburgh, J.A. Jansen // *Macromol. Biosci.* 2010. V. 10. P. 1316–1329
9. Solheim E. Growth factors in bone. / E. Solheim // *Int. Orthop.* 1998. V. 22. P. 410–416
10. Fluoridated hydroxyapatite /carbon nanotubes composite coating fabricated by radiofrequency magnetron sputtering. / L. Ding, Y. Zheng, Q.B. Wan // *Mater. Sci. Forum.* 2011. V. 675–677. P. 869–871.
11. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. / K. Anselme // *Biomaterials.* 2000. V. 21. P. 667–681.
12. Characterization and in vivo evaluation of chitosan-hydroxyapatite bone scaffolds made by one step coprecipitation method / S.N. Danilchenko, O.V. Kalinkevich, M.V. Pogorelov [et. all] // *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 2011. Vol. 96A. P. 639–647

УДК 616

### **Морфология периимплантационной зоны при применении нанокompозитного остеопластического материала**

<sup>1</sup> Елена Николаевна Гортинская  
<sup>2</sup> Максим Владимирович Погорелов

<sup>1-2</sup> Сумский государственный университет, Украина  
40007, Сумы, ул. Р-Корсакова, 2

<sup>1</sup> кандидат медицинских наук  
E-mail: gektorr@ukr.net

<sup>2</sup> доктор медицинских наук, доцент  
E-mail: pogorelov\_max@mail.ru

**Аннотация.** Остеопороз является метаболическим мультифакторным заболеванием костной ткани, характеризующийся повышенной ломкостью костной ткани вследствие снижения костной массы и нарушение микроархитектоники губчатого и компактного вещества кости. Основными осложнениями остеоопороза являются переломы тел позвонков и переломы шейки бедра, лечение которых сопровождается значительными трудностями и возможными осложнениями в послеоперационный период из-за исходного низкого качества костной ткани. Особенно остро данная проблема стоит при использовании костных имплантатов и протезов – выраженный остеопороз может значительно снизить остеоинтеграцию материалов. Для повышения биосовместимости имплантатов в современной медицине используется масса методик, которые сводятся к модификации геометрии и топологии поверхности имплантатов и депонированию на их поверхности биологически активных молекул. Одним из наиболее изученных веществ, которые используются для покрытия имплантатов и самостоятельно в качестве остеопластического материала, является гидроксиапатит.

Целью нашей работы было выявить изменения в периимплантационной зоне дистального эпифиза бедренной кости после имплантации нанокompозитного материала на основе хитозана и гидроксиапатита.

Имплантация хитозан-апатитного нанокompозитного материала в дистальный эпифиз бедренной кости с признаками остеоопороза приводит к нормализации структуры трабекул и их минерального насыщения в периимплантационной зоне. Учитывая полученные данные, хитозан-апатитный композит может быть рассмотрен в качестве претендента для модификации поверхности костных имплантатов.

**Ключевые слова:** Остеопороз; нанокompозит; гидроксиапатит; хитозан.