

УДК 616.71-089.843-74:612.017:669.018

УКПП

№ держреєстрації 0116U007550

Інв.№

Міністерство освіти і науки України
Сумський державний університет
(СумДУ)
40007, м.Суми, вул.Римського-Корсакова, 2; тел.330172

ЗАТВЕРДЖУЮ
Проректор СумДУ
д-р фіз.-мат. наук, проф.
_____ А.М. Чорноус

ЗВІТ
ПРО НАУКОВО–ДОСЛІДНУ РОБОТУ

**ВИВЧЕННЯ БІОСУМІСНОСТІ ДЕГРАДУЮЧИХ МЕТАЛЕВИХ СПЛАВІВ
РІЗНОГО СКЛАДУ. ВИЗНАЧЕННЯ БІОСУМІСНОСТІ МЕТАЛЕВИИХ
СПЛАВІВ У РЕЗУЛЬТАТІ ПІДШКІРНОЇ ІМПЛАНТАЦІЇ
ЛАБОРАТОРНИМ ТВАРИНАМ
(остаточний)**

Науковий керівник НДР
д-р мед.наук, доц. _____

М.В. Погорелов

2018

Рукопис закінчено __ червня 2018р.

Результати роботи розглянуто науковою радою СумДУ протокол від __ ____ 20__ р. № __

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник теми, проф., д.мед.	_____ ___.06.2018 р.	М. Погорелов (заг. редакція, розділ 1, висновки)
к.мед.н.	_____ ___.06.2018 р.	О. Олешко (редакція, розділ 2)
м.н.с	_____ ___.06.2018 р.	В. Дейнека (розділ 3)
студент	_____ ___.06.2018 р.	І. Любчак (розділ 2)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 52 с., 17 рис., 72 джерела.

БИОДЕГРАДУЮЧІ ІМПЛАНТАТИ, IN-VIVO ЕКСПЕРИМЕНТ,
ОСТЕОІНТЕГРАЦІЯ, БИОДЕГРАДАЦІЯ.

Об'єкт дослідження: процеси інтеграції імплантатів.

Мета роботи – визначити особливості інтеграції імплантатів з покриттям в культурі клітин та в тканинах модельних щурів.

Предмет дослідження – особливості інтеграції імплантатів з біопокриттями.

Методи дослідження: культури клітин, растрова електронна мікроскопія, біомеханічні методи, морфометрія.

На ранніх термінах після імплантації металевих конструкцій з біоінертних сплавів на їх поверхні відбувається адгезія органічного матриксу, при цьому наявність гідроксиапатитного покриття забезпечує більш стабільну адгезію та поліморфний клітинний склад, що є предиктором прямої остеointegraції. Наявність стимуляції проліфрації остеобластів у порівнянні з фібробластами свідчить про можливий остеoіндуктивний ефект гідроксиапатитного покриття. В той же час, наявність гідроксиапатитного шару призводить до більш стабільної адгезії білкового субстрату на поверхні. Загалом, біомеханічні параметри сплавів відіграють ключову роль в процесі перебудови кісткової тканини навколо імплантатів – «класичні» сплави призводять до активізації ремоделювання, що морфологічно проявляється у витонченні трабекул, зростанні кількості кісткових одиниць ремоделювання та розвитку мікропошкоджень. В той же час, імплантація конструкцій зі сплаву β (Zr-Ti) призводить до незначної перебудови тканин в ділянці імплантації. Наявність гідроксиапатитного покриття забезпечує більшу площу контакту імплантату з кістковою тканиною і є лише додатковим чинником, який впливає на інтенсивність ремоделювання.

ЗМІСТ

Вступ	5
1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1 Сучасні уявлення про остеоінтеграцію дентальних імплантатів та чинники, що впливають на її перебіг	7
2 Експериментальне вивчення впливу матеріалу, з якого виготовлений імплантат та структури його поверхні на культури остеобластів та фібробластів	11
2.1 Матеріали і методи.....	11
2.2 Результати дослідження та їх обговорення.....	14
2.3 Вивчення впливу матеріалу, з якого виготовлений імплантат та структури його поверхні на перебіг процесів остеоінтеграції в експерименті на тваринах.....	20
2.3.1 Матеріали і методи досліджень.....	20
2.3.2 Результати дослідження.....	23
Висновки	51
Перелік джерел посилання	52

ВСТУП

Існує безліч стратегій модифікації поверхні імплантатів для створення оптимальних умов для розвитку кісткової тканини. Класичним підходом є використання кальцій-фосфатних покриттів, які по суті є остеокондуктивними. Додаткове включення антибактеріальних засобів, зокрема срібла, може забезпечити зменшення бактеріальних ускладнень. [A. Besinis, 2017; M. A. Surmeneva, 2017] Наприклад Besinis A. та співавтори поміщали НАР покриття, леговане Ag_2O і SrO , за допомогою плазмового напилення, на поверхню титану.

Останнім часом багато уваги приділяється нанорозмірним модифікаціям поверхні для зміни умов функціонування клітин. Здатність поверхні впливати на ріст клітин була відома понад 100 років тому [R. Harrison, 1911], в той час як термін "контактна інтеграція" почав використовуватись лише в 1950/1960-х роках. У 1980-х роках розуміння клітинно-топографічної взаємодії на мікромасштабному рівні було з'ясовано завдяки таким технологіям як фотолітографія та вологе/сухе травлення [C. D. W. Wilkinson, 2004]. На рубежі 21-го сторіччя такі технології як електронно-променева літографія, колоїдна літографія [F. A. Denis, 2002], розділення полімерної фази, розділення блок-сополімеру [S. Krishnamoorthy, 2006] стають доступними для клітинних біологів. Ці субстрати дозволили зрозуміти, що клітини можуть реагувати на наноструктурні особливості поверхні (E. K. Yim, 2005).

При цьому відсутні системні дані щодо реакції клітин та тканин при імплантації сплавів з різним типом покриття.

Мета роботи – визначити особливості інтеграції імплантатів з покриттям в культурі клітин та в тканинах модельних щурів.

Предмет дослідження – особливості інтеграції імплантатів з біопокриттями.

Методи дослідження: культури клітин, растрова електронна мікроскопія, біомеханічні методи, морфометрія.

1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Сучасні уявлення про остеоінтеграцію дентальних імплантатів та чинники, що впливають на її перебіг

Процеси остеоінтеграції – прямого сполучення імплантату з кістковою тканиною, відбуваються внаслідок адгезії остеогенних клітин на поверхні металевої конструкції з наступним формуванням органічного та мінерального матриксу кістки [R. Adell, 1981]. Порушення цих процесів може спричиняти дезінтеграцію імплантату і розвиток післяопераційних ускладнень.

Успіх остеоінтеграції залежить від 2-х процесів: 1) механічної інтеграції, тобто успішної первинної фіксації імплантату в кістці та 2) взаємодії клітин з поверхнею імплантату, із наступним утворенням повноцінної кісткової тканини [С. Mas-Moguno,, 2013]. Обидва процеси є важливими та нерозривними для формування здатності імплантату сприймати і перерозподіляти функціональне навантаження, а, отже, для повного відновлення жувальної функції пацієнта.

Існує безліч стратегій модифікації поверхні імплантатів для створення оптимальних умов для розвитку кісткової тканини. Класичним підходом є використання кальцій-фосфатних покриттів, які по суті є остеокондуктивними. Додаткове включення антибактеріальних засобів, зокрема срібла, може забезпечити зменшення бактеріальних ускладнень. [A. Besinis, 2017; M. A. Surmeneva, 2017] Наприклад Besinis A. та співавтори поміщали НАР покриття, леговане Ag_2O і SrO , за допомогою плазмового напилення, на поверхню титану. Цікаво, що срібло було високоефективним проти *P. aeruginosa*, але його виділення було згубним для діяльності остеобластів. Додавання SrO до покриття нівелювало цей негативний ефект.

Останнім часом багато уваги приділяється нанорозмірним модифікаціям поверхні для зміни умов функціонування клітин. Здатність поверхні впливати на ріст клітин була відома понад 100 років тому [R. Harrison, 1911], в той час як термін "контактна інтеграція" почав використовуватись лише в 1950/1960-х роках. У 1980-х роках розуміння клітинно-топографічної взаємодії на мікромасштабному

рівні було з'ясовано завдяки таким технологіям як фотолітографія та вологе/сухе травлення [C. D. W. Wilkinson, 2004]. На рубежі 21-го сторіччя такі технології як електронно-променева літографія, колоїдна літографія [F. A. Denis, 2002], розділення полімерної фази, розділення блок-сополімеру [S. Krishnamoorthy, 2006] стають доступними для клітинних біологів. Ці субстрати дозволили зрозуміти, що клітини можуть реагувати на наноструктурні особливості поверхні (E. K. Yim, 2005).

Так, використання наночасточок цирконію для модифікації поверхні імплантатів призвело до зростання абсорбції фібриногену та його зв'язків з поверхнею клітин остеогенного диферону порівняно зі звичайною машинною обробкою імплантату [Rottmar M, 2018]. Patelli A. та соавтори сформували на поверхні імплантатів 220 нм гранули кремнію, інкорпорованого в PLGA, що призвело до зростання адгезії остеобластів на 20% у порівнянні з комерційними імплантатами [Patelli A., 2018]. В іншому дослідженні було продемонстровано здатність поверхні з nano-TiO_2 з інкорпорованим гідроксиапатитом стимулювати ріст кісткової тканини на поверхні імплантату *in-vivo*, що призвело до більш стабільної фіксації конструкції [Kong F, 2018].

Окрім активації остеогенних клітин, нанорозмірна поверхня здатна до стимуляції росту епітеліальної та сполучної тканини. В дослідженнях Xu R. та співавторів, була проведена модифікація поверхні за допомогою плазмової електрооксидзації а після цього із застосуванням методу «selective laser melting» були створені нанорозмірні патерни на кальцій-фосфатному покритті. В дослідженні доведено, що така модифікація здатна посилювати проліферацію епітеліальних клітин та фібробластів а також призводить до зростання експресії їх генів [Xu R, 2018].

Зважаючи на значну кількість робіт, присвячених використанню кальцій-фосфатних покриттів для модифікації дентальних імплантатів, необхідно зупинитись на оцінці ефективності даних покриттів.

Пошук в реферативній базі PubMed показав наявність більше 10 000 публікацій за останні 15 років, які присвячені вивченню ефективності кальцій-

фосфатних покриттів. Доведений вплив таких покриттів на остеоінтеграцію, активність остеогенних та мезенхімальних клітин, вплив на диференціацію останніх в остеобласти тощо. При цьому залишається відкритим питання щодо методів модифікації та величини шорсткості поверхні. Так, дуже важко відрізнити силу впливу шорсткості чи хімічного складу поверхні на активність клітин чи процеси остеогенезу. Для розуміння впливу даних факторів необхідно провести окремий аналіз. Так, ряд досліджень довели позитивний вплив мікрометрового рівня модифікації поверхні із застосуванням кальцій-фосфатних покриттів, проте інші дослідження не показали чіткої кореляції.

Wong et al. [Wong M, 1995] порівнювали різні модифікації поверхні на моделі свиней. Шорсткість (Ra) для обробленого імплантату становила 1,5 мкм, для імплантату, обробленого піском - 2,3 мкм, для blasted-etched імплантату - 1,9 мкм, для імплантату з НАР - 6 мкм. Топографічні дані вказують на найбільшу шорсткість імплантатів з нанесеним НАР. випробування на виймання в строки 12 тижнів, продемонстрували сильну кореляцію підвищення шорсткості та міжфазної сили. У дослідженнях Gotfredsen et al. [Gotfredsen K, 1995] і Gottlander et al. [Gottlander M, 1997], було встановлено, що зміна від мінімальної шорсткості до помірної шорсткості призводить до посилення реакції кісток. Gotfredsen et al. порівнювали механізовану обробку (Sa 0.31 мм), обробку піском (Sa 0.61 мм) та імплантати з НАР (Sa 1.89 мм) на моделі кролика. Топографію поверхні визначали конфокальним лазерним профілометром. Через 3 та 12 тижнів імплантати після піско-струйної обробки, потребували значно меншої сили для екстракції ніж ті, які мали НАР покриття. Gottlander et al. порівнювали CaP-покриття з необробленими титановими імплантантами. Необроблені Ti-імплантанти мали Sa 0,53 мкм, а імплантати з покриттям - 1,42 мкм. Більшу площу контакту через 4 місяці мали покриття з НАР, тоді як через 6 місяців достовірної різниці між групами не було виявлено.

Vercaigne et al. [Vercaigne S, 1998] порівнювали поверхні з розміром модифікації 0,35, 2,39, 2,59 і 3,31 мкм – остання була представлена кальцій-фосфатним покриттям. Поверхні також вивчали конфокальним профілометром. У

стегновій кістці кроля було виявлено значно більшу площу контакту з кісткою у імплантату з покриттям з НАР вже через 3 місяці. Li [Li J., 1993] виявив, що збільшення розміру поверхні від гладкої до середньої шорсткості з гідроксиапатитним покриттям має пряму кореляцію з площею контакту імплант-кістка через 1-3 місяці.

Проте, багато дослідників не виявило чіткого зв'язку між процесами остеоінтеграції та наявністю мікронної модифікації поверхні за допомогою гідроксиапатиту. Так, Yeo et al. [Yeo IS, 2008] порівнювали поверхні, модифіковані електрооксидацією та мікрометровими частинками гідроксиапатиту з відповідними розмірами 0,7 мкм та 1,4 мкм. Через 6 тижнів автори виявили більшу площу контакту з кісткою на електрооксидованих поверхнях і більшу силу, необхідну для екстракції імплантату. Vercaine et al. [Vercaine S, 2000] досліджували поверхні імплантатів з різною шорсткістю – від 0,5 до 4,5 мкм з та без гідроксиапатитного покриття. Дослідження, проведені упродовж 12 місяців не показали достовірної різниці в імплантатах із різним покриттям. Основним фактором, який впливав на якість остеоінтеграції був розмір шорсткості із оптимальною величиною біля 2 мкм.

В деяких дослідженнях автори виявили негативну кореляцію між шорсткістю і активністю процесів остеоінтеграції. Так, Borsari et al. [Borsari V, 2007] досліджували поверхню з Ra 12 мкм та 18 мкм з гідроксиапатитним покриттям. Через 12 тижнів вони не виявили різниці між групами, проте необроблена поверхня показала наявність більшої площі інтеграції кісткової тканини. Savarino et al. [Savarino L, 2003] досліджували 2 поверхні з розмірами 5,9 мкм та 22,5 мкм з та без НАР покриття. Поверхні, які не були покритті гідроксиапатитом в даному дослідженні показали перевагу над модифікованими.

На сьогодні є поодинокі публікації щодо використання нанорозмірного гідроксиапатиту для покриття поверхні дентального імплантату. Так, Mendes et al. [Mendes VC, 2007] використовували нанокристали для модифікації 2-х сплавів титану. За їх даними, наявність нанокристалів дала змогу підвищити швидкість остеоінтеграції та збільшити відсоток контакту імплантату з кісткою. Meirelles et

al. [Meirelles L, 2008] використовували нанорозмірні часточки CaP та TiO₂ для визначення впливу фактору розміру або хімічного складу на процеси остеointegraції. Дослідники прийшли до висновку, що в незалежності від хімічного складу кристалів на модифікованій поверхні відбувається більш швидка проліферація остеобластів та ріст кісткової тканини. Таким чином, висновок авторів полягає у відсутності впливу хімічної складової на нанорівні на перебіг процесів остеointegraції. Schliephake et al. [Schliephake H, 2009] також досліджував вплив хімічної структури та розміру кристалів на процеси остеогенезу. Дослідник використав дві поверхні з розмірами шорховатості 0,5 та 2,5 мкм а також наномодифіковану поверхню з середнім розміром шорховатості 100 нм. Дослідження показало достовірне покращення формування кістки на наномодифікованій поверхні.

Таким чином, незважаючи на чисельні модифікації поверхні імплантатів, використання кальцій-фосфатних складових є найбільш вживаною медидикою через подібність за складом до екстра целюлярного матриксу кістки. Саме наявність іонів кальцію та фосфору, а також оптимальні розміри структур поверхні здатні збільшити абсорбцію білків та адгезію клітин остеобластичного диферону на поверхні імплантату. Проте, залишається багато питань щодо впливу розміру модифікацій поверхні, можливості використання мікро- та нанорозмірних модифікацій та ефективність різних типів покриття у віддалені терміни постімплантаційного остеогенезу. Крім того, недостатньо вивчений вплив механічних параметрів сплаву самого імплантату у поєднанні з різними типами модифікації поверхні на перебіг його остеointegraції.

2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ МАТЕРІАЛУ, З ЯКОГО ВИГОТОВЛЕНИЙ ІМПЛАНТАТ ТА СТРУКТУРИ ЙОГО ПОВЕРХНІ НА КУЛЬТУРИ ОСТЕОБЛАСТІВ ТА ФІБРОБЛАСТІВ

2.1 Матеріали і методи

Перебіг остеоінтеграції дентальних імплантатів за даними літератури залежить від багатьох чинників, серед яких ключовими є якість та хімічний склад сплаву і структура поверхні, яка вступає в контакт з кістковою тканиною після імплантації. З метою дослідження процесів, які відбуваються після імплантації різних типів сплавів, що мають різну морфологію і склад поверхні, було проведено 2 серії експериментів 1) на культурах клітин та 2) на лабораторних лабораторних тваринах (див. розділ 2.3.) в ході яких було вивчено особливості взаємодії зразків наступних типів із біологічними тканинами і клітинами кістки:

1. Титановий сплав BT-6 (TiVT6); Тип поверхні SLA
2. Цирконієвий сплав КТЦ-125; Тип поверхні SLA
3. Цирконієвий сплав КТЦ-125 з запропонованим двошаровим покриттям, яке складається з двох шарів: кальційтермічний цирконій та гідроксілапатит з трикальційфосфатом у співвідношенні 60/40% нанесений шляхом вибивання потоком плазми з мішені;
4. β (Ti-Zr) сплав; Тип поверхні SLA
5. β (Ti-Zr) сплав з запропонованим двошаровим покриттям, яке складається з двох шарів: β (Ti-Zr) сплав та гідроксілапатит з трикальційфосфатом у співвідношенні 60/40% нанесені шляхом вибивання потоком плазми з мішені.

Для проведення дослідження з культурами клітин були виготовлені металеві диски з усіх типів сплавів та відповідними поверхнями діаметром 12 мм та висотою 10 мм. В експерименті були задіяні первинні культури остеобластів (зі своду черепа) та фібробластів (з дерми) лабораторних щурів. Клітини були отримані методом експлантів, контроль лінії відбувався а допомогою флуорисцентної мікроскопії з антитілами до поверхневих антигенів відповідних ліній клітин.

Культивування на поверхні імплантатів.

Перед проведенням експерименту всі зразки стерилізували методом автоклавування (121⁰ C, 1,5 Атм, 1 година) та поміщали у 24-луночний планшет. До всіх зразків додавали Fetal Bovine Serum (FBS; Invitrogen,) в середовищі Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen, cat. no. 11960) на 24 години. Перінкубація зразків необхідна для моделювання взаємодії поверхні імплантату з білковим середовищем. Через 24 години середовище видаляли з лунок та заміщували 2 ml DMEM з 10 % Fetal Bovine Serum, а також додавали 2 mM L-glutamine (Invitrogen, cat. no. 25030), 50 Од/мл пеніциліну та 50 мг/мл стрептоміцину (Invitrogen, cat. no. 15070). На поверхню кожного зразка додавали 10⁵ клітин відповідного типу (клітини висівались окремо) після чого планшет поміщали в CO₂ інкубатор в якому підтримувалась температура 37⁰ C, волога 60% та вміст CO₂ на рівні 5%. Культуральне середовище змінювали кожні 3 дні під час всього терміну проведення експерименту. Всі експерименти повторювали 3 рази.

Аналіз росту та проліферації клітин.

Для аналізу адгезії та динаміки росту клітин використовували метод редукції резазурину в терміни 1, 3 та 7 днів від початку експерименту та метод растрової електронної мікроскопії для аналізу розподілу клітин на поверхні зразка та типу взаємодії клітин з поверхнею.

Редукція резазурину

Resazurin sodium salt (Sigma) використовували в якості основного реагенту, який під дією ферментних систем живих клітин перетворюється на резофурін та втрачає оптичну щільність. 1 мл резазурину додавали до кожної лунки та проводили інкубацію розчину упродовж 4 годин. Після цього 200 мкл розчину аналізували за допомогою колориметричного планшетного ридера (Multiskan FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific) при довжині хвилі 620 нм. Відсоток активних клітин вираховували як відсоток від абсорбції вихідного розчину резазурину. В якості позитивного контролю використовували результати адгезії та проліферації клітин на TCP (культуральний пластик).

Скануюча електронна мікроскопія.

На 7-му добу експерименту з кожної лунки видаляли культуральне середовище та фіксували клітини за допомогою 2,5% глутарового альдегіду. Зневоднення зразків проводили за допомогою спиртів висхідної концентрації (від 60% до 100%), після чого зразки покривали золотом (30-40 нм) в вакуумному універсальному пості (ВУП-5). Дослідження поверхні зразків проводили за допомогою мікроскопу Hitachi TM-3000 (прискорююча напруга - 15 kV).

Статистичні методи

Отримані цифрові дані оброблялися методом варіаційної статистики за допомогою програми для обробки статистичної інформації IBM SPSS Statistics 21 з використанням параметричних методів (порівняння середніх за допомогою t-теста). Для з'ясування типу розподілу даних використовувались діаграми з кривою нормального розподілу (Колокол Гауса) та тест Колмогорова–Смирнова. За умов доведення гіпотези про нормальність розподілу даних, порівняння показників в різних серіях здійснювали з використанням критерію Стьюдента. Відмінності вважали значущими з рівнем ймовірності не менше 95% ($p \leq 0,05$).

2.2 Результати дослідження та їх обговорення

Аналізуючи дані редукції резазурину на 1 добу після посіву клітин, необхідно зазначити наявність їх адгезії на всіх досліджуваних поверхнях. Так, відсоток адгезії остеобластів становив від 34,1% до 66,5%. При цьому в досліджених групах він сильно відрізнявся. Найменший відсоток клітин, які прикріпились до поверхні, спостерігали в групах без гідроксиапатитного покриття, при цьому достовірної різниці між типом сплаву не спостерігали (рис. 2.2.1). Різниця в адгезії з ТСП (культуральний пластик) становила до 80% (у групі з ВТ-6). При цьому, в групах, які мали гідроксиапатитне покриття відсоток адгезії достовірно не відрізнявся від позитивного контролю (ТСП).

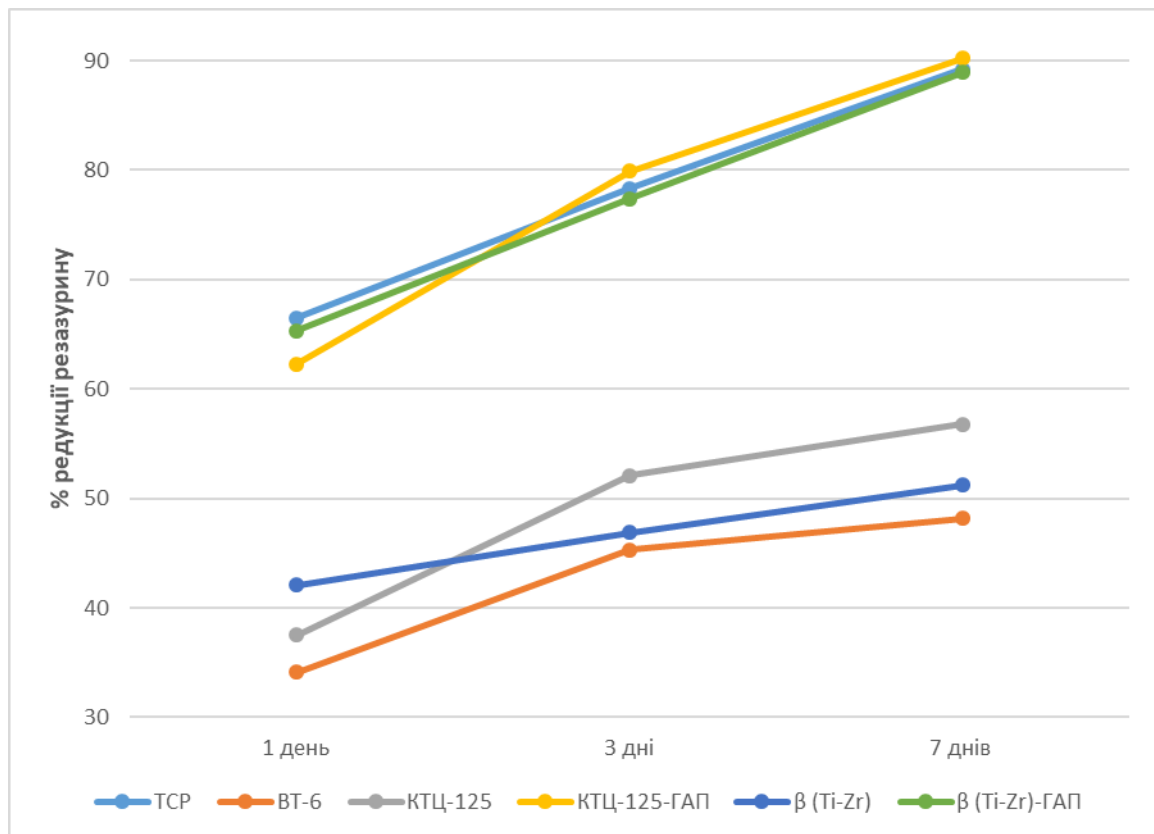


Рисунок 2.2.1 – Динаміка редукції резазурину остеобластами через 1, 3 та 7 днів від початку експерименту

Отже, ступінь адгезії мала прямий зв'язок з наявністю на поверхні зразків гідроксиапатиту. Наявність останнього дозволяла більш ефективно осідати білкам з культурального поживного середовища та закріплюватись на поверхні зразка як за допомогою поверхневого натягу, так і за допомогою хімічного зв'язку. Білки, які мають специфічний RGD-domain (в тому числі альбуміни, присутні в культуральному середовищі), здатні специфічно з'єднуватись з поверхневими рецепторами остеобластів і стимулювати їх проліферацію. Окрім цього, остеобласти здатні до прямої адгезії на поверхні кільцід-фосфатних з'єднань.

Аналіз проліферативної активності остеобластів через 3 та 7 діб від початку культивування свідчить про їх активний ріст та проліферацію в групі з кальцій-фосфатним покриттям. Динаміка зростання кількості клітин має лінійний характер та відповідає проліферативній активності на поверхні культурального пластика (TCP). Таким чином, можна стверджувати, що наявність

гідроксиапатиту стимулює проліферацію клітин остеобластичного диферону. При цьому на поверхні імплантатів без модифікації відбувається повільна проліферація клітин, відсоток зростання редукції резазурину не перевищує 23,5%, що свідчить про низький проліферативний потенціал. Слід зауважити, що різниця між типами сплавів відсутня, що доводить переважання впливу топографії поверхні на проліферативну активність остеобластів.

Адгезія фібробластів до поверхні, модифікованої гідроксиапатитом, відбувалася на рівні позитивного контролю, проте кількість клітин за даними редукції резазурину на 1-шу добу була нижчою у порівнянні з остеобластичним дифероном. Як і для остеобластів, відсоток сполучнотканинних клітин, які адгезувались на поверхні немодифікованих сплавів, був достовірно меншим. Різниця при цьому досягала 50% для сплаву КТЦ-125 (рис. 2.2.2). На відміну від остеобластів, на 3-тю та особливо 7-му добу значного зростання кількості клітин на поверхні зразків не відбувалося, що особливо помітно в останній термін спостереження. На 7-му добу відсутня достовірна різниця ($p \geq 0.05$) між кількістю клітин на поверхні β (Ti-Zr) сплаву без гідроксиапатиту та сплавами, які мають кальцій-фосфатне покриття. При цьому кількість живих клітин на поверхні культурального пластика прогресивно зростала і була достовірно вищою ніж у всіх експериментальних групах.

Порівнюючи динаміку проліферації остеобластів та фібробластів на поверхні сплавів з гідроксиапатитним покриттям слід відмітити майже однакову здатність до адгезії зазначених клітин. Зважаючи на попередню інкубацію зразків у 20% розчині фетальної бичачої сироватки, даний феномен може бути пояснений наявністю сорбованого білку на поверхні імплантатів. При цьому здатність до адгезії на модифікований зразках є значно вищою у порівнянні з немодифікованими імплантатами.

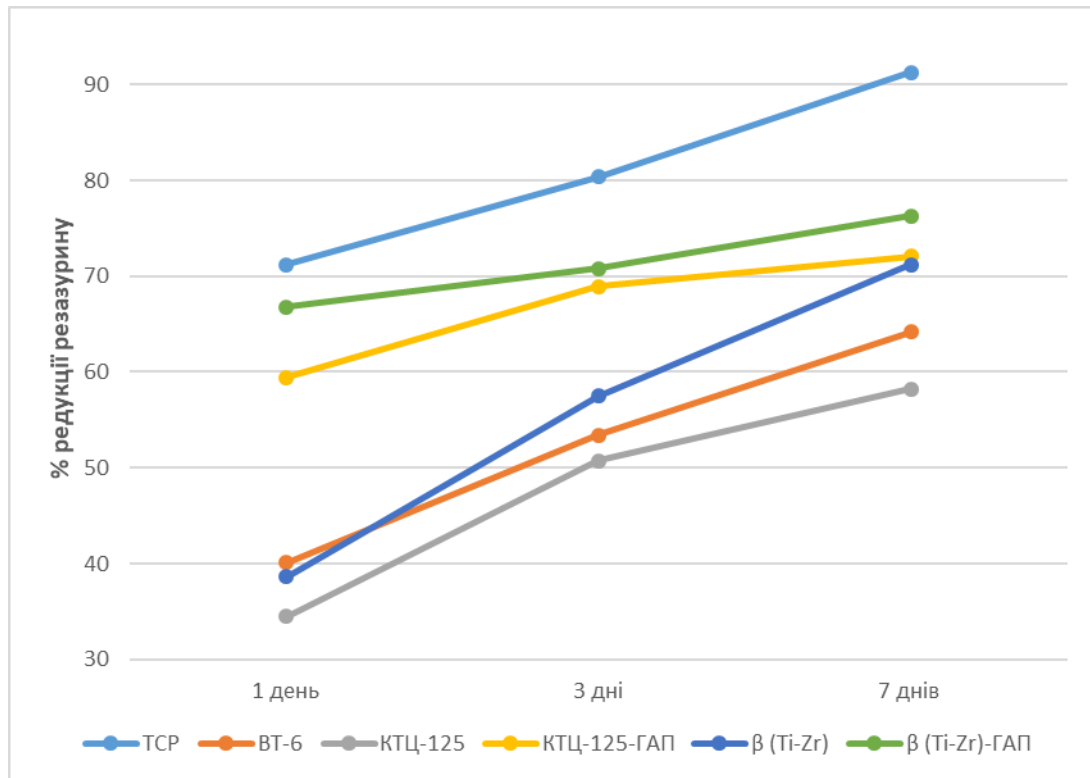


Рисунок 2.2.2 – Динаміка редукції резазурину фібробластами через 1, 3 та 7 днів від початку експерименту

Проте, вже на 3-тю добу спостереження відсоток остеобластів є значно вищим у порівнянні з кількістю фібробластів, а кількість останніх стає меншою на 23-29% ніж остеогенна популяція на 7-му добу спостереження. Аналізуючи графік редукції резазурину (рис. 2.2.3) можна відзначити зростаючий тренд проліферації остеобластів, в той час як тренд проліферації фібробластів уповільнюється з 3-ї до 7-ї доби. Таким чином, можна зробити висновок, що при наявності кальцій-фосфатного покриття відбувається прискорена проліферація остеогенних клітин. При взаємодії покриття з біологічними рідинами, в тому числі з культуральним середовищем, відбувається вивільнення іонів кальцію та фосфору, які є натуральними стимуляторами проліферації клітин остеогенного диферону, в тому числі й остеобластів.

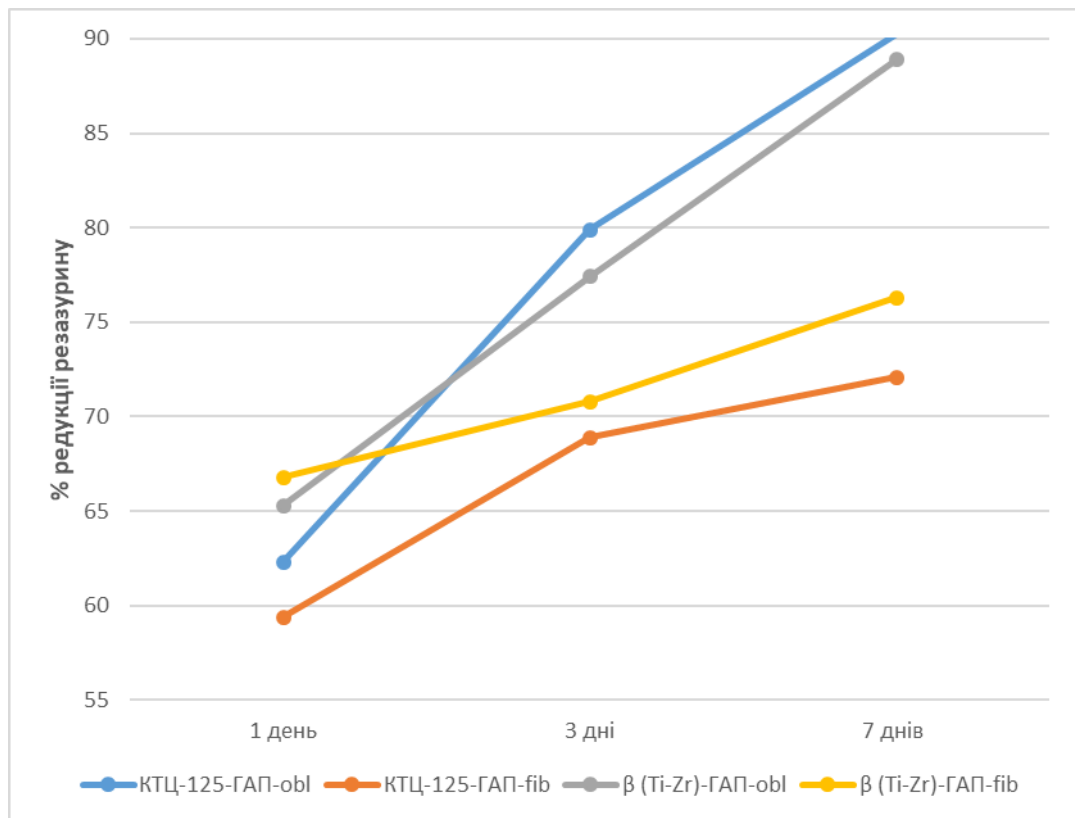


Рисунок 2.2.3 – Динаміка редукції резазурину остеобластами (obl) та фібробластами (fib) на поверхні зразків з гідроксиапатитним покриттям через 1, 3 та 7 днів від початку експерименту.

Аналізуючи дані растрової електронної мікроскопії на 7-му добу культивування клітин слід відмітити наявність остеобластів та фібробластів на всіх досліджуваних зразках. При цьому можна виділити дві групи зразків – без покриття та з гідроксиапатитом на поверхні металевих імплантатів. За відсутності гідроксиапатиту клітини нерівномірно розташовані на поверхні зразка, відрізняються більшими розмірами та наявністю довгих відростків, які не мають чіткої орієнтації. При цьому щільність клітин на поверхні β (Ti-Zr) сплаву є дещо вищою, а клітини частіше анастомозують між собою довгими відростками (рис. 2.2.4, А-С).

За умов наявності гідроксиапатитного покриття на поверхні зразків відмічається значно вища щільність росту клітин, які переважно мають 2 відростки, орієнтовані в одному напрямі (рис. 4,D-E). Можна виділити ізогенні

групи клітин, які тісно анастомозують, інколи утворюючи симпласт (рис. 2.2.4, виділення колом).

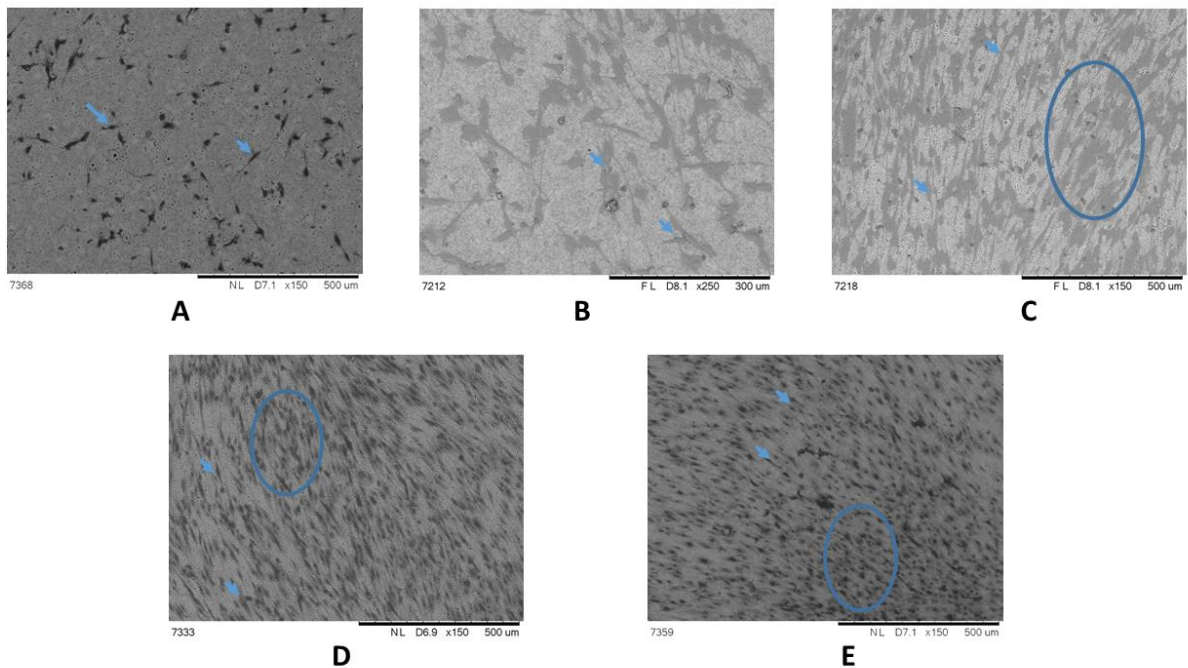


Рисунок 2.2.4 – Растрова електронна мікроскопія поверхні зразків на 7-му добу після культивування остеобластів. Стрілочками позначені окремі клітини на поверхні зразків, суцільною лінією – групи клітин, які анастомозують між собою (А - VT-6; В - КТЦ-125; С - β (Ti-Zr); D - КТЦ-125-ГАП; Е - β (Ti-Zr)-ГАП)

При культивування фібробластів на поверхні металевих сплавів, за допомогою растрової електронної мікроскопії на 7-му добу відмічається нерівномірний ріст клітин в групі імплантатів без гідроксиапатитного покриття. Клітини мають звичайну витягнуту веретеноподібну форму та розташовуються хаотично на поверхні зразків (рис. 2.2.5, А-С). При цьому відмічається наявність клітин округлої форми невеликого діаметру, що є ознакою їх загибелі. Такий фенотип клітин був відсутній при культивуванні остеобластів. На поверхні зразків з гідроксиапатитним покриттям відмічається більш щільний ріст клітин, але при цьому помітна нерівномірність їх розподілу як на сплаву КТЦ-125, так і β (Ti-Zr) сплаву (рис. 2.2.5,D-E).

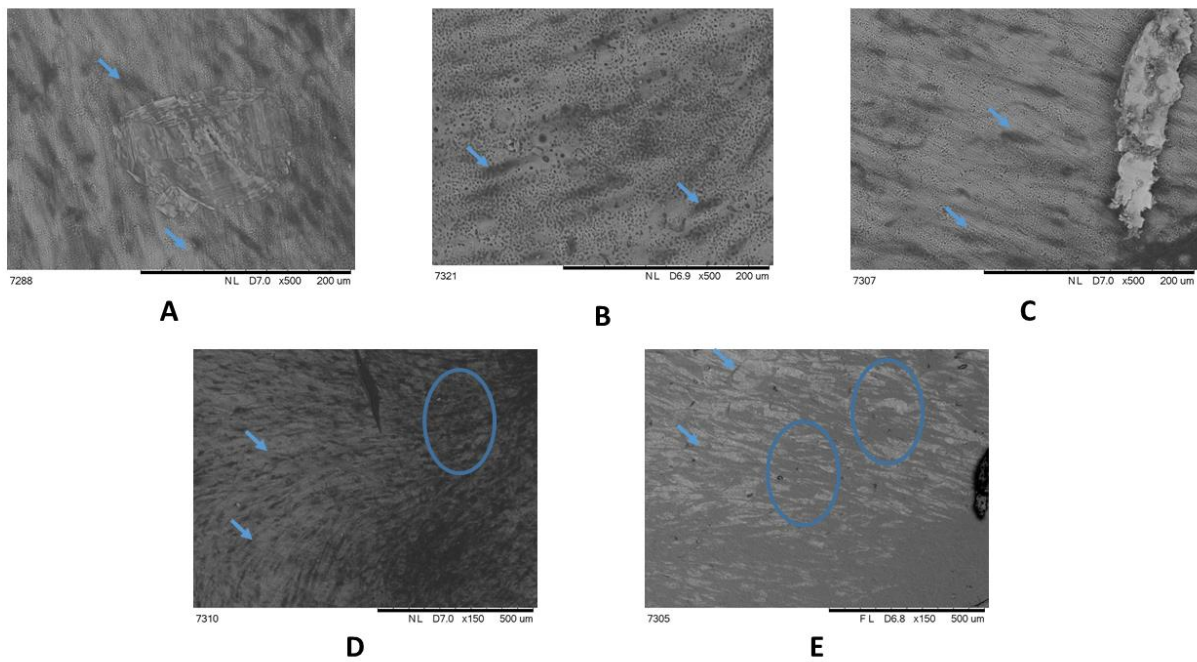


Рисунок 2.2.5 – Растрова електронна мікроскопія поверхні зразків на 7-му добу після культивування фіброblastів. Стрілочками позначені окремі клітини на поверхні зразків, суцільною лінією – групи клітин, які анастомозують між собою (А - ВТ-6; В - КТЦ-125; С - β (Ti-Zr); D - КТЦ-125-ГАП; Е - β (Ti-Zr)-ГАП)

2.3 Вивчення впливу матеріалу, з якого виготовлений імплантат та структури його поверхні на перебіг процесів остеоінтеграції в експерименті на тваринах

2.3.1. Матеріали і методи досліджень

В експерименті по вивченню впливу матеріалу та морфології поверхні імплантату на остеоінтеграцію використовували кролів породи Шиншила у віці 4-5 місяців з початковою масою 3-3,5 кг в кількості 60 особин. Всі процедури проводилися відповідно до «Європейської конвенції із захисту тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986), Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes і були узгоджені з Комісією з біомедичної етики Медичного інституту СумДУ (протокол №7 / 12 від 11.06.2013 року).

Тварини були розділені на 5 серій відповідно до типу імплантату. Під загальною анестезією (кетамін в дозі 7 мг / кг і тіопетнал в дозі 10 мг / кг) була проведена імплантація дентальних імплантатів (8 мм, Ø 3,7 мм) в дистальний епіфіз стегнової кістки при навантаженні на імплантат від 25 до 35 Н/см (рис. 2.3.1). Після операції рану зашивали і, з метою профілактики інфекційних ускладнень, проводили ін'єкції антибіотиків протягом 1 тижня.

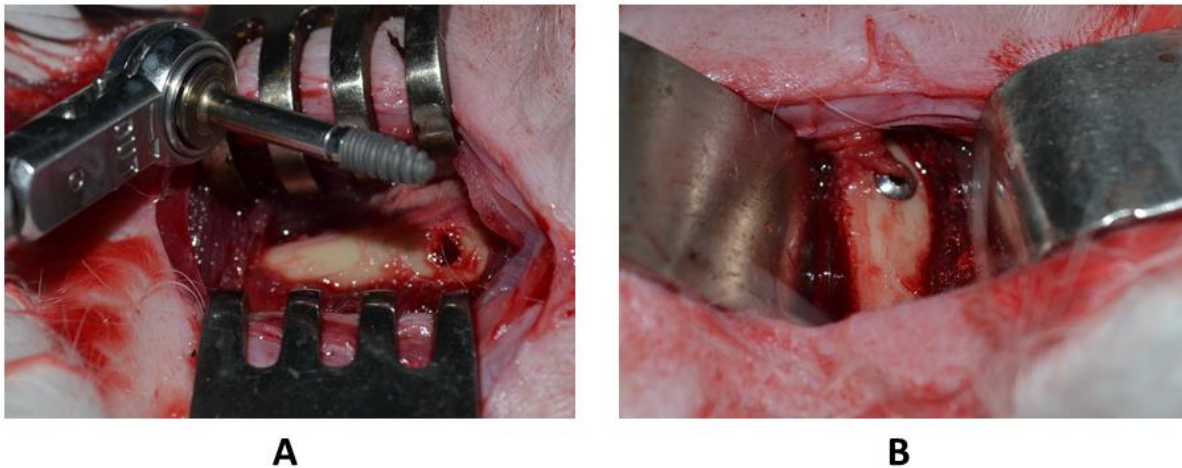


Рисунок 2.3.1 – Процедура встановлення дентального імплантату в дистальний епіфіз стегнової кістки щура: А – проведення імплантації; В – вигляд кістки з імплантатом

Тварин виводили з експерименту шляхом передозування наркозу (70 мг/кг кетаміну в/м) через 5 днів, 1, 3 і 6 місяців після імплантації та виділяли стегнову кістку.

Для дослідження процесів остеоінтеграції в ранні терміни (5 доба) імплантат відділяли від кістки та проводили його підготовку для растрової електронної мікроскопії. Для вивчення процесів остеоінтеграції у віддалені терміни після імплантації, ділянку імплантату з кісткою виділяли шляхом сколу та проводили підготовку комплексу «імплантат-кісткова тканина» для дослідження на растровому електронному мікроскопі.

Для цього зразки фіксували в 2% розчині глутаральдегіду протягом 24 годин і поміщали в 1% розчин тетраокісі осмію на 12 годин. Надалі проводили

дегідратацію зразків в спиртах зростаючої концентрації (50 - 70 - 80 - 90 і 100%) з наступним заливанням сумішшю смол «Епон-аралдіт». Для поліпшення візуалізації поверхню зразків напилювали сріблом в стандартній вакуумній установці (ВУП-5). Аналіз морфології поверхні в системі кістка / імплантат і контроль вмісту іонів (Са і Р) проводили за допомогою растрового електронного мікроскопа РЕММА-102 (Селмі, Україна) та Hitachi TM-3000.

Для визначення реакції кісткової тканини на імплантацію різних сплавів використовували гістологічне дослідження. Ділянку кістки розміром 5x5 мм, яка безпосередньо прилежить до імплантату виділяли та фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну впродовж доби та проводили декальцинацію в розчині азотної кислоти впродовж доби. Декальциновані зразки зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації та заливали в парафін. Готували гістологічні зрізи товщиною 5-7 мкм та забарвлювали їх гематоксилін-еозиномом. Отримані препарати вивчали за допомогою світлового мікроскопа "OLYMPUS".

Морфометричні дослідження зображень гістологічних препаратів та растрових електронограм проводили за допомогою комп'ютерної програми "SEOImageLab2.0".

Статистичні методи аналізу отриманих даних

Отримані цифрові дані оброблялися методом варіаційної статистики за допомогою програми IBM SPSS Statistics 21 з використанням параметричних методів (порівняння середніх за допомогою t-теста). Для з'ясування типу розподілу даних використовувались діаграми з кривою нормального розподілу (Колокол Гауса) та тест Колмогорова–Смирнова. За умов доведення гіпотези про нормальність розподілу даних, порівняння показників в різних серіях здійснювали з використанням критерію Стьюдента. Відмінності вважали значущими з рівнем ймовірності не менше 95% ($p \leq 0,05$).

2.3.2 Результати дослідження

Через 5 днів після операції по встановленню імплантатів в стегнову кістку на їх поверхні спостерігали накопичення гомогенного субстрату, який щільно прилягав до поверхні гвинтів і спостерігався у всіх міжвиткових просторах. Вірогідно, це відбувалося в наслідок адсорбція білкової фракції крові та міжклітинної рідини, як першого етапу остеointegraції [Xu R, 2018]. Завдяки накопиченню білків, які мають так званий RGD-Domain, зокрема фібронектин, ламінін, колаген, кістковий сіалопротейн тощо, клітини кісткового мозку (мезенхімальні стовбурові клітини) та камбіального шару окістя (остеобласти) адгезуються на поверхні імпланту і починають синтез міжклітинного матриксу. Як видно з рис. 2.3.2, на поверхні сплаву TiVT6 спостерігалися ділянки, вільні від гомогенної субстанції, що може свідчити про недостатню адгезію протеїнів міжклітинного матриксу.

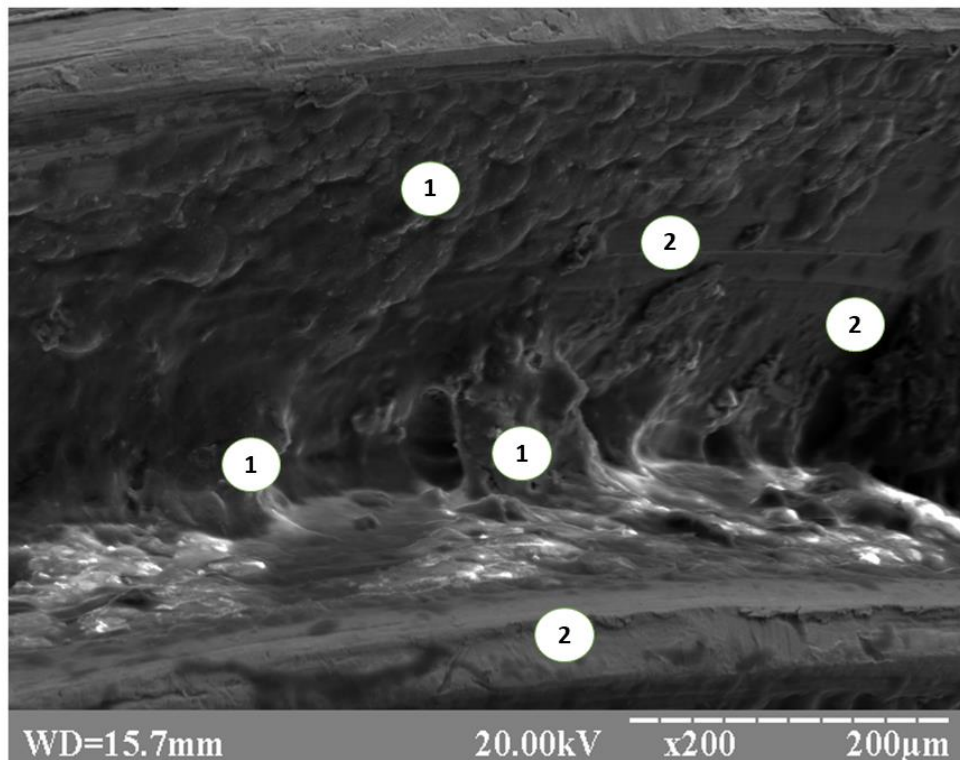


Рисунок 2.3.2 – Растрова електронна мікроскопія поверхні імплантату складу TiVT6 через 5 днів після операції. Зб x 200:

1 – білковий субстрат на поверхні зразка; 2 –поверхня зразка.

Подібна картина спостерігалася і на поверхні сплавів КТЦ-125 та β (Zr-Ti), що свідчить про однаковий тип взаємодії з поверхнями, які мають різну хімічну структуру. При цьому тісний контакт з материнською кісткою та оточуючими рідинами (кров, інтерстиційна рідина) все таки дає можливість осадження білків на поверхні імплантату. Проте, не відбувається повного покриття поверхні імплантату білковим субстратом, що може знизити якість остеоінтеграції, зокрема зменшити вірогідність адгезії клітин на поверхні імплантату. При цьому, відсутність росту клітин на поверхні активує ріст кісткової тканини від «материнської кістки, що характеризується як «вторинна остеоінтеграція», яка часто проявляється розвитком сполучної тканини.

За наявності гідроксиапатитного покриття на поверхні імплантатів з КТЦ-125 та β (Zr-Ti) спостерігається більш рівномірне розташування білкового субстрату та наявність клітин, які мають морфологічні ознаки мезенхімальних стовбурових клітин та остеобластів (рис. 2.3.3).

За даними морфометрії проведений розрахунок площі імплантату, який покритий білковим субстратом. Так, на площа контактної поверхні для TiVT6, КТЦ-125 та β (Zr-Ti) склала відповідно $83,5 \pm 11,5\%$, $87,1 \pm 9,7\%$ та $85,4 \pm 15,7\%$. При цьому площа контакту поверхні сплавів, які мали гідроксиапатитне покриття склала відповідно $93,7 \pm 5,9\%$ для КТЦ-125 та $94,9 \pm 4,9\%$. Статистична обробка даних не показала наявності достовірної різниці між типами імплантатів.

Відомо, що наявність справжньої (контактної) остеоінтеграції відбувається завдяки ранньому синтезу міжклітинної речовини, в тому числі колагену та протеогліанів з наступним їх звапненням. Наявність клітин остеогенного диферону на поверхні імплантатів з гідроксиапатитом є основою для подальшого розвитку росту кісткової тканини. Серед факторів, які відіграють ключову роль в адгезії білків на поверхні є хімічний склад, топографія (в тому числі, наявність нано- та мікроструктурованої поверхні) та поверхневий заряд. Можливо, завдяки наявності кальцій-фосфатних груп на поверхні сплаву відбувається більш рівномірний розподіл білків та їх рання адгезія, що визначає наявність клітинних елементів на поверхні.

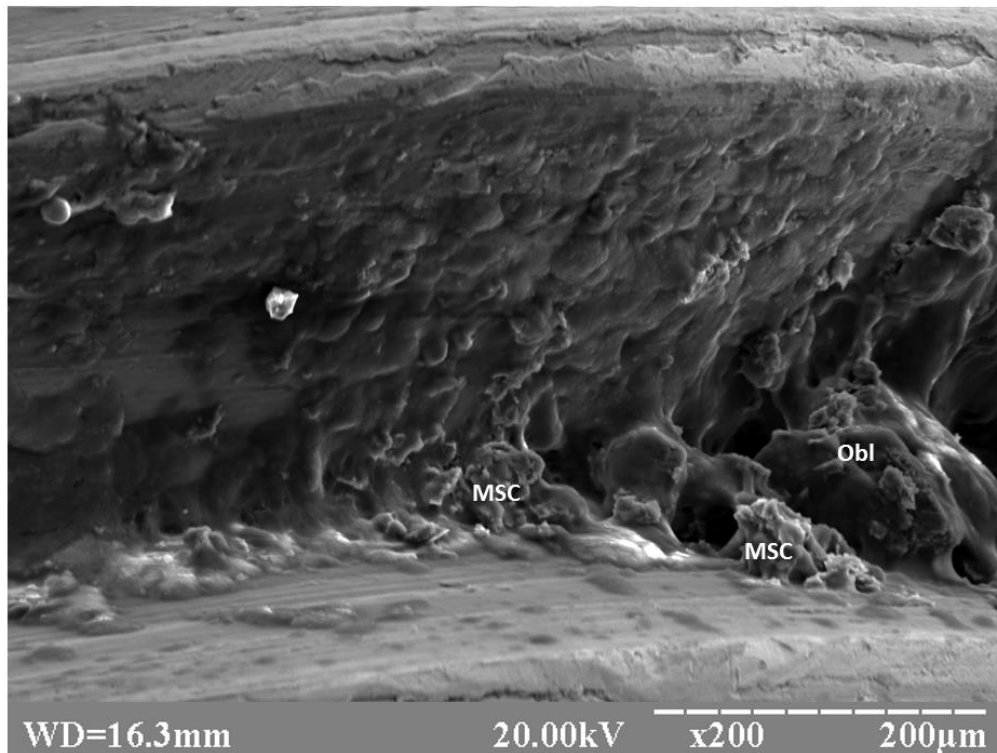


Рисунок 2.3.3 – Растрова електронна мікроскопія поверхні імплантату складу β (Zr-Ti) через 5 днів після операції. Зб x 200:
MSC – мезенхімальні стовбурові клітини; Obl – остеобласти.

Гістологічна будова кісткової тканини на ділянці навколо імплантатів мала звичайну будову. Зовні епіфіз вкритий компактною речовиною, яка є продовженням зовнішніх оточуючих пластинок діяфізу стегнової кістки. Пластинки не утворюють суцільного шару навколо епіфізу а перекриваються одна одною. Поміж пластинок розташовані остеоцити, які анастомозують своїми відростками. Під окістям розташований шар остеобластів, так званий – камбіальний шар окістя. Остеобласти даного шару знаходяться у стані спокою, мають базофільну цитоплазму з незначною кількістю органел та ексцентрично розташоване ядро. В компактній речовині розрізняють судинні канали, які пронизують всю товщу шару та поодинокі конуси ремоделювання. Останні забезпечують постійну перебудову кісткової тканин у відповідь на існуючі механічні навантаження та метаболічні зміни організму. Під шаром компактної

речовини розташована губчаста кісткова тканина, яка сформована чисельними трабекулами, що анастомозують між собою (рис. 2.3.4).

В середині трабекул наявні остецити, в той час як на поверхні розташовуються активні остеобласти. Частина трабекул має мозаїчне забарвлення, обумовлене неоднорідним звапненням внаслідок активних процесів формування кісткової речовини. В товщі трабекул розташовані одиниці ремоделювання. Сітка трабекул утворює порожнини, в яких розташовується жирова тканина та червоний кістковий мозок. Клітини останнього є джерелом для утворення кісткової тканини в разі травми.

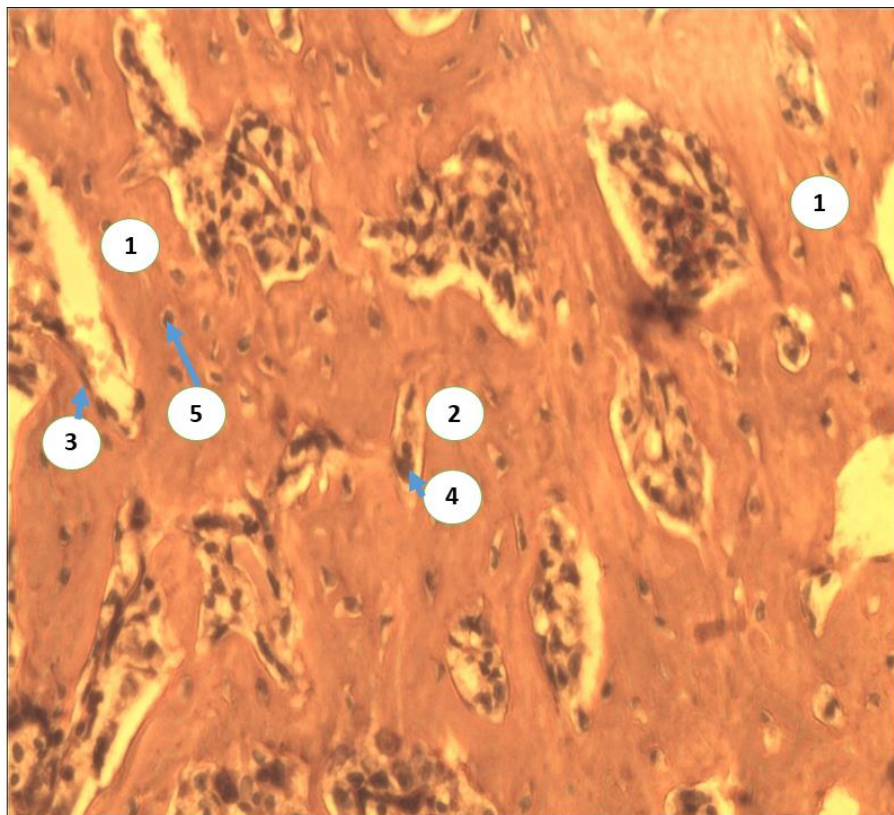


Рисунок 2.3.4 – Ділянка дистального епіфізу стегнової кістки кроля в зоні імплантації через 5 днів після операції. Забарвлення Гематоксилін-Еозин, зб. X 400: 1 – кісткова трабекула; 2 – кісткова одиниця ремоделювання; 3 – остеобласт; 4 – остеокласт; 5 – остецит в лакуні.

Морфометричні показники кісткової тканини характеризують звичну будову (табл. 2.3.1). Кількість остеобластів становить від $12,5 \pm 2,6$ до $13,6 \pm 1,5$ клітин на 1 мм^2 , остеоцитів – від $6,4 \pm 2,4$ до $7,5 \pm 1,5$ без достовірної різниці між

типами імплантованих сплавів. Кількість одиниць ремоделювання, яка характеризує активність перебудови тканини становить від $4,2 \pm 1,1$ до $5,3 \pm 1,5$ на 1 мм^2 , а їх ширина не перевищує $204,1 \pm 18,3$ мкм, що відповідає фазі спокою кісткової тканини. Таким чином, через 5 днів після введення імплантату більшість морфометричних показників кістки свідчать про відсутність перебудови в ділянці навколо імплантату.

Таблиця 2.3.1 – Морфометричні показники кісткової тканини в періімплантаційній зоні в залежності від типу імплантату через 5 днів спостереження

Показник	Остеобласти (на мм^2)	Остеоцити (на мм^2)	Одиниці ремоделювання (на мм^2)	Ширина одиниць ремоделювання (мкм)	Товщина трабекул (мкм)
TiVT6	$13,6 \pm 1,5$	$6,9 \pm 0,8$	$4,2 \pm 1,1$	$186,7 \pm 11,8$	$165,8 \pm 16,1$
КТЦ-125	$12,9 \pm 2,1$	$7,5 \pm 1,2^*$	$5,3 \pm 1,5^*$	$196,2 \pm 22,6$	$178,9 \pm 34,8$
β (Ti-Zr)	$13,1 \pm 3,3$	$6,4 \pm 2,4$	$5,1 \pm 2,2$	$204,1 \pm 18,3^*$	$169,2 \pm 22,5$
КТЦ-125- НА	$11,8 \pm 2,9^*$	$7,2 \pm 2,8$	$4,7 \pm 1,9$	$189,8 \pm 25,3$	$180,5 \pm 27,1^*$
β (Ti-Zr)- НА	$12,5 \pm 2,6$	$7,5 \pm 1,5^*$	$4,4 \pm 2,4$	$199,6 \pm 35,4$	$171,3 \pm 12,9$

* - достовірна різниця ($p \leq 0,05$) у порівнянні з групою TiVT6

У більш віддалені терміни спостереження картина взаємодії імплантатів з оточуючими тканинами та будова кісткової тканини навколо них мала відмінність не лише від залежно від структури поверхні, але й від типу сплаву, з якого був виготовлений імплантат.

Так, через місяць після імплантації навколо імплантату з TiVT6 відбувалося формування кісткової та сполучної тканини. При цьому спостерігали достатньо значний прошарок пухкої неструктурованої тканини в міжвиткових просторах, яка за своєю будовою нагадувала пухку сполучну тканину (рис. 2.3.5).

Слід відмітити наявність проміжків між поверхнею імплантату та сполучною тканиною, що може призвести до нестабільності імплантату у віддалені терміни. Формування сполучної тканини навколо імплантату характерне для непрямой (дистантної) остеointegraції, коли відбувається ріст тканини від

«материнської» кістки у напрямку до імплантату. При цьому, з часом відбувається часткове заміщення сполучної тканини кістковою, проте зазвичай воно неповне.

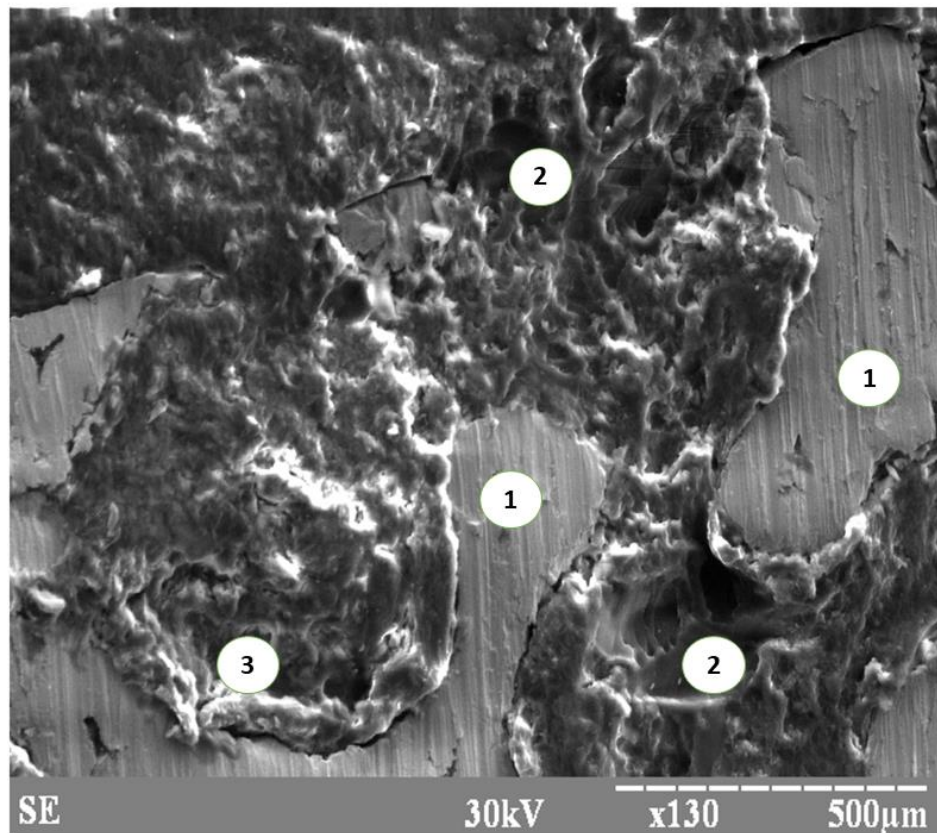


Рисунок 2.3.5 – Растрова електронна мікроскопія ділянки навколо імплантату складу TiVT6 через 1 місяць після операції. Зб x 130: 1 – поверхня імплантату; 2 – кісткова тканина; 3 – сполучна тканина.

Гістологічна будова кісткової тканини навколо імплантату характеризувалась масивною перебудовою губчастої тканини. Спостерігали незначне витончення трабекул, зростання кількості та розмірів одиниць ремоделювання, зростання кількості остеобластів (рис. 2.3.6). Така картина була характерна для змінених механічних умов існування кісткової тканини. Перерозподіл навантаження із залученням імплантату з модулем Юнга, який значно перевищує показник кісткової тканини, запускає каскад процесів ремоделювання із залученням остеобластів та остеобластів.

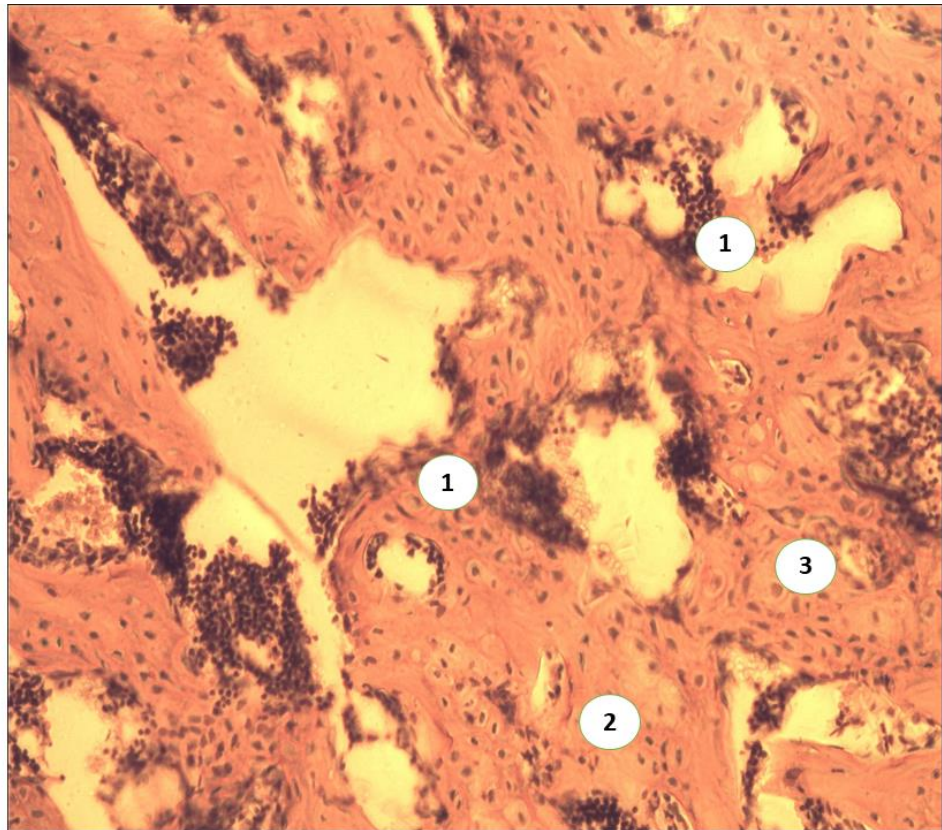


Рисунок 2.3.6 – Ділянка дистального епіфізу стегнової кістки кроля біля ділянки імплантації сплаву TiVT6 через 1місяць після операції. Забарвлення Гематоксилін-Еозин, зб. X 300: 1 – витончення трабекули; 2 – нерівномірність забарвлення; 3 – кісткова одиниця ремоделювання.

Кількість сполучної тканини навколо імплантатів з КТЦ-125 не відрізнялася від попередньої серії, що свідчить про значну залежність процесів утворення тканин від первинних умов, в яких знаходиться імплантат. Як і в попередній серії, кількість вільних від білка ділянок була достатньо значною, що є лімітуючим фактором для формування кісткової тканини.

Гістологічна будова кістки навколо імплантату також свідчить про активність процесів ремоделювання з переважанням резорбції – кісткові балочки витончені, наявні значні за розміром узури на їх поверхні, кількість одиниць ремоделювання губчастої речовини значно зростає порівняно з кісткою у стані спокою.

Через 30 днів після імплантації сплаву β (Zr-Ti) відзначається подібна картина навколо імплантату, проте відсоток сполучної тканин є меншим,

порівняно з попередніми групами. Такий феномен може бути пояснений низьким модулем Юнга сплаву, що забезпечує більш стабільну фіксацію в системі «імплантат-кістка» і зменшення інтенсивності впливу на оточуючі тканини.

Як і у попередніх групах, на гістологічних препаратах помітні ознаки ремоделювання у вигляді конусів резорбції, зміни забарвлення тканини та зростання кількості остеобластів на поверхні трабекул (Рис. 2.3.7). Проте відсутнє значне витончення кісткових балочок, зміна забарвлення тканини носить незначний характер.

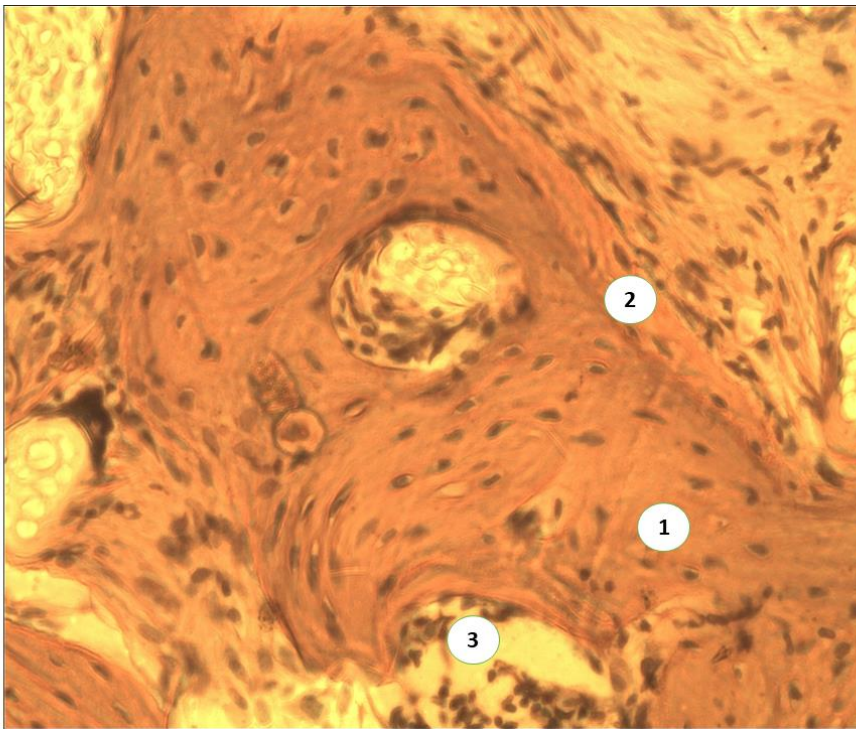


Рисунок 2.3.7 – Ділянка дистального епіфізу стегнової кістки кроля біля ділянки імплантації сплаву β (Zr-Ti) через 1 місяць після операції. Забарвлення Гематоксилін-Еозин, зб. X 600: 1 – кісткова трабекула; 2 – новоутворена кісткова тканина з «лінією цементування»; 3 – кісткова одиниця ремоделювання.

Через місяць після операції навколо імплантату виготовленого з β (Zr-Ti) сплаву з гідроксиапатитним покриттям спостерігається формування кісткової тканини з незначними прошарками сполучної (рис. 2.3.8). Характерною ознакою даної групи є майже повна відсутність порожнин між імплантатом та

новосформованою тканиною. Можливо, завдяки високій адсорбції білків у першу фазу остеointegraції та адгезії остеогенних клітин, відбувається ранній синтез міжклітинного матриксу з розвитком прямої остеointegraції – формування тканин від імплантату у напрямку до «материнської кістки».

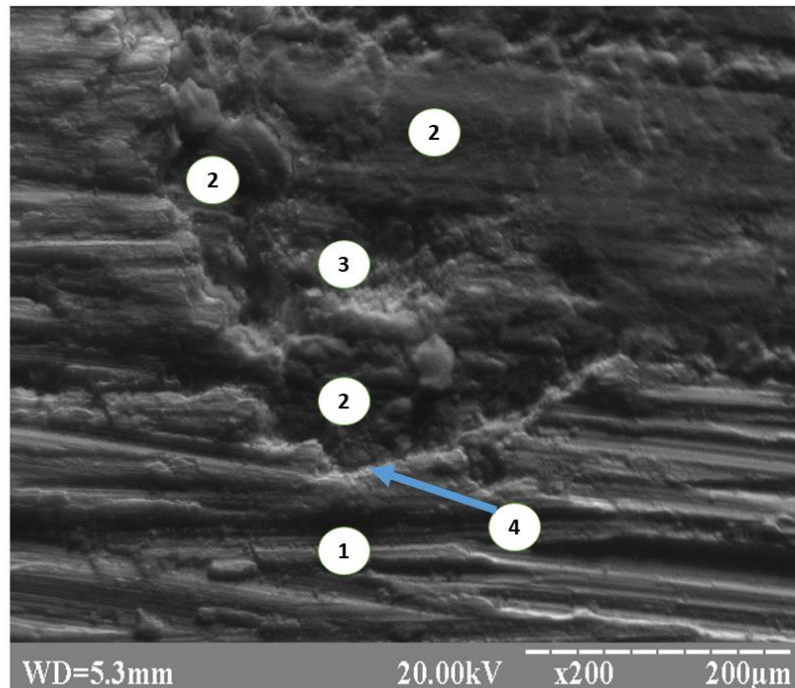


Рисунок 2.3.8 – Растрова електронна мікроскопія ділянки навколо імплантату складу β (Zr-Ti) через 1 місяць після операції. Зб x 200: 1 – поверхня імплантату; 2 – кісткова тканина; 3 – сполучна тканина; 4 – місця контакту поверхні імплантату з кісткою.

Подібна картина характерна і для імплантату з КТЦ-125, що свідчить про важливу роль кальцій-фосфатного покриття для формування прямої остеointegraції.

Гістологічне дослідження ділянки кісткової тканини навколо імплантату з КТЦ-125 свідчить про значну швидкість процесів ремоделювання, викликану різкою зміною біомеханічних параметрів в органі. Так, кількість одиниць ремоделювання значно зростає, що призводить до стончення кісткових балочок і наявності значних за площею змін забарвлення тканини (рис. 2.3.9).

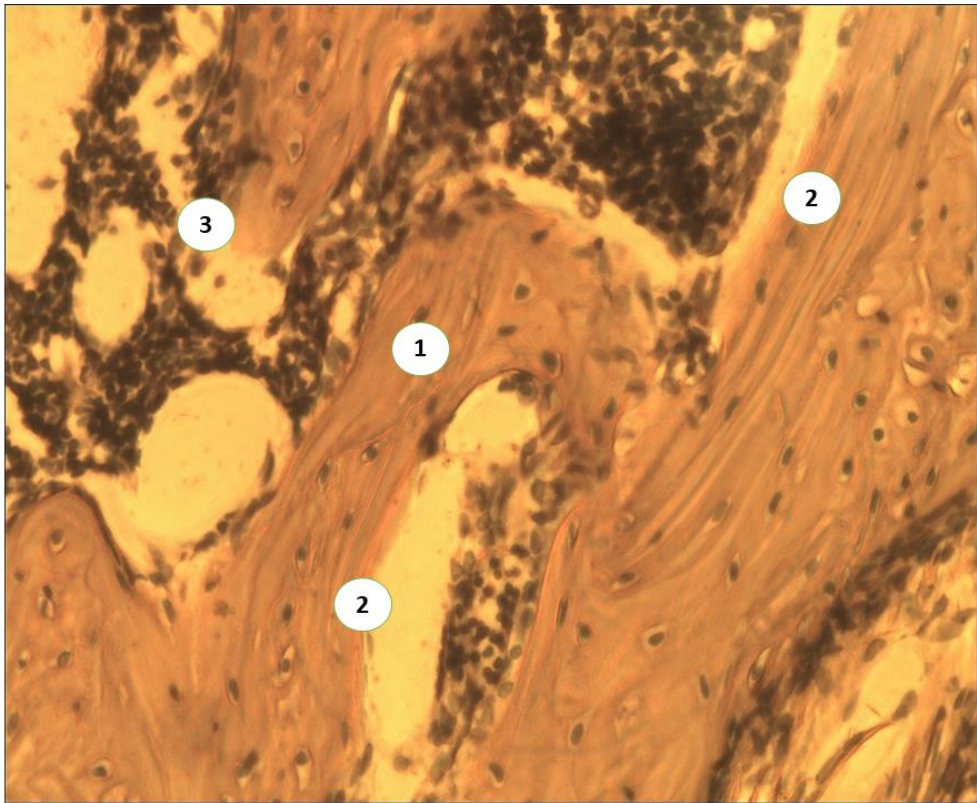


Рисунок 2.3.9 – Ділянка дистального епіфізу стегнової кістки кроля біля встановленого імплантату зі сплаву КТЦ-125 з гідроксиапатитним покриттям через 1 місяць після операції. Забарвлення Гематоксилін-Еозин, зб. X 300:

1 – кісткова трабекула; 2 – новоутворена кісткова тканина з «лінією цементування»; 3 – пошкодження трабекули.

Останній феномен є відображенням нерівномірної кальцифікації кісткового матриксу. Проте, кісткова тканина навколо імплантату з β (Zr-Ti) майже не зазнає змін. Як і в групі без наявності покриття відбувається незначна активація перебудови з мінімальною зміною гістоархітекtonіки кісткової тканини

За даними растрової електронної мікроскопії навколо імплантату через місяць відбувається формування кісткової тканини, яка представлена пластинчастою та грубоволокнистою кісткою а також сполучною тканиною, яка має меншу електронну щільність і добре візуалізується в комплексі з кальцифікованими тканинами. Як видно з таблиці 2.3.2, переважно навколо імплантату спостерігається пластинчаста кісткова тканина. При цьому варто відмітити наявність достовірної різниці ($p \leq 0.05$) між сплавами без

гідроксиапатитного покриття та КТЦ-125-НА і β (Ti-Zr)-НА. При цьому тип сплаву не має впливу на достовірність різниці. Відсоток грубоволокнистої кістки, наявність якої характерна в перші терміни репаративного процесу, становить від $13,7 \pm 2,3\%$ навколо імплантату β (Ti-Zr)-НА до $25,2 \pm 3,1\%$ ($p \leq 0,05$) - навколо TiVT6. Наявність достовірно більшої кількості сполучної тканини навколо імплантатів з немодифікованою поверхнею свідчить про значний вплив гідроксиапатиту на розвиток кісткової тканини.

Таблиця 2.3.2 – Відсотковий вміст тканин навколо імплантів різного складу через 1 місяць спостереження за даними растрової електронної мікроскопії

Показник	Пластинчаста кісткова тканини, %	Грубоволокниста кісткова тканина, %	Сполучна кісткова тканина, %
TiVT6	$54,5 \pm 8,1$	$25,2 \pm 3,1$	$9,5 \pm 0,9$
КТЦ-125	$58,1 \pm 3,7$	$21,8 \pm 4,7$	$10,1 \pm 5,7$
β (Ti-Zr)	$67,2 \pm 9,2^*$	$17,4 \pm 2,9^*$	$10,6 \pm 2,4$
КТЦ-125-НА	$73,7 \pm 3,9^*$	$15,3 \pm 4,2^*$	$6,7 \pm 2,1^*$
β (Ti-Zr)-НА	$71,8 \pm 4,3^*$	$13,7 \pm 2,3^*$	$7,9 \pm 0,6^*$

* - достовірна різниця ($p \leq 0,05$) у порівнянні з групою TiVT6

Аналізуючи показники морфометрії кісткової тканини періімплантаційної зони необхідно відзначити активацію процесів ремоделювання тканини у всіх досліджуваних серіях, проте ступінь активності має залежність від типу імплантату. Так, кількість остеобластів достовірно зростає в усіх серіях експерименту, окрім тварин, яким імпантували β (Ti-Zr). При цьому, достовірність змін не залежить від наявності чи відсутності гідроксиапатитного покриття (табл. 2.3.3). Кількість остеоцитів на одиницю площі кістки зменшується в усіх серіях, проте достовірна різниця спостерігається лише для сплаву КТЦ-125. Кількість одиниць ремоделювання зростає також в усіх серіях, проте достовірна різниця з попереднім терміном спостереження відсутня для сплавів КТЦ-125 та β (Ti-Zr) з гідроксиапатитним покриттям. Разом з тим ширина одиниць ремоделювання достовірно не відрізняється лише в серіях тварин, яким імпантували сплав β (Ti-Zr). Ширина кісткових трабекул відображає здатність

процесів ремоделювання підтримувати позитивний кістковий баланс. Через місяць після імплантації відбувається достовірне зменшення їх ширини в групах з імплантатами з TiVT6 та КТЦ-125 без гідроксиапатитного покриття.

Таблиця 2.3.3 – Морфометричні показники кісткової тканини в періімплантаційній зоні в залежності від типу імплантату через 1 місяць спостереження

Показник	Остеобласти (на мм ²)	Остеоцити (на мм ²)	Одиниці ремоделювання (на мм ²)	Ширина одиниць ремоделювання (мкм)	Товщина трабекул (мкм)
TiVT6	16,7±2,4*	5,7±1,3	6,7±0,7*	238,3±26,1*	143,1±9,2*
КТЦ-125	17,1±1,6*	5,4±2,6*	7,2±2,3	229,5±16,4*	152,5±11,5*
β (Ti-Zr)	14,4±3,8	7,1±1,1	6,8±1,0*	211,8±21,3	161,3±15,3
КТЦ-125- НА	16,9±4,1*	6,5±1,5	6,6±0,9*	242,2±12,7*	173,8±15,9
β (Ti-Zr)-НА	12,9±1,8	6,8±0,5	5,1±0,4	209,9±11,8	168,1±17,0

*- достовірність різниці з аналогічним показником в попередній термін спостереження ≤ 0.05

Таким чином, можна зробити висновок, що щільність утворення кісткової тканини в інтерфейсі «кістка-імплантат» має тісний зв'язок з наявністю гідроксиапатитної складової на поверхні імплантату, в той час як активність процесів ремоделювання навколо імплантату – виключно від біомеханічних особливостей останнього.

Через 3 місяці після операції відбувалась перебудова тканин навколо імплантатів складу TiVT6 та КТЦ-125. Спостерігалось зменшення ділянок сполучної тканини та розвиток кісткових трабекул, що свідчить про прогресування процесів остеоінтеграції. Незважаючи на це, площа контакту кісткової тканини з імплантатом не перевищує 70%. Як і у попередній термін спостереження відмічалась наявність щілин між імплантатом та новоутвореними тканинами, що може вплинути на мікрорухомість конструкції і викликати реакцію оточуючих тканин (рис. 2.3.10).

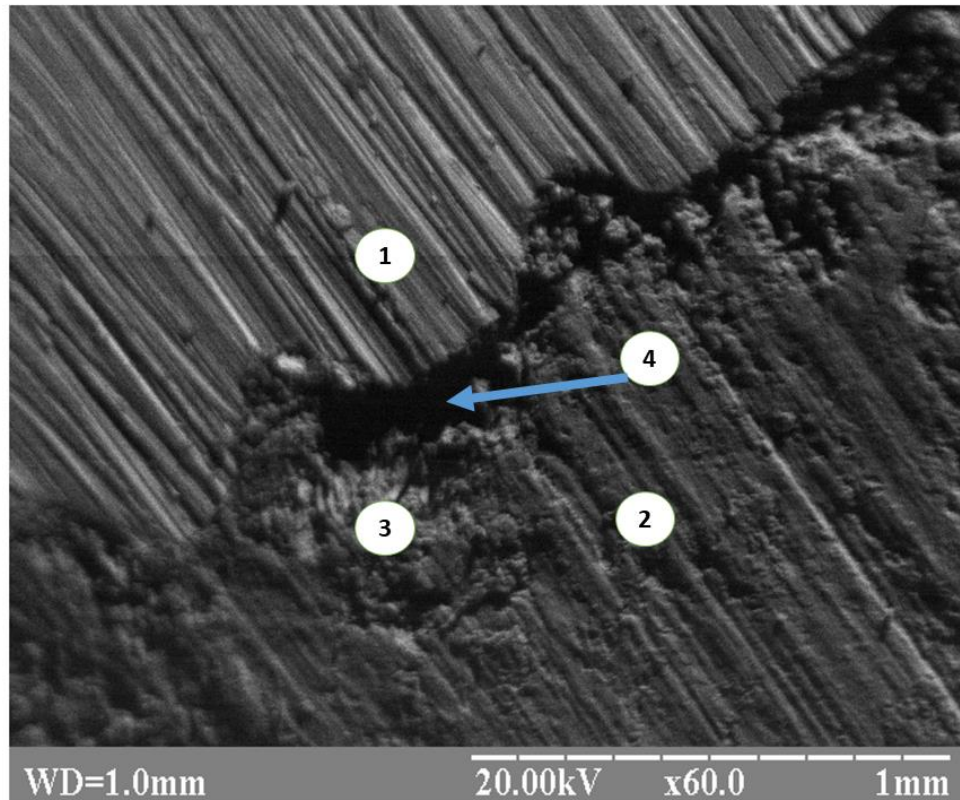


Рисунок 2.3.10 – Растрова електронна мікроскопія ділянки навколо імплантату складу TiVT6 через 3 місяці після операції. Зб x 60: 1 – поверхня імплантату; 2 – кісткова тканина; 3 – сполучна тканина; 4 – відсутність прямого контакту кістки з імплантатом.

В цей термін, кісткова тканина навколо імплантату все ще характеризується активними процесами ремоделювання зі значною кількістю остеобластів. Можлива мікрорухомість імплантатів та перерозподіл напруження на високомодульний імплантат є основними причинами активації ремоделювання. При цьому спостерігається наявність мікротріщин на поверхні трабекул. Такі зміни є характерними при наявності значних градієнтів механічного напруження і можуть викликати макроскопічні пошкодження кістки у віддалені терміни.

Гістологічна будова кісткової тканин навколо імплантату з β (Zr-Ti) сплаву характеризувалася уповільненням процесів ремоделювання, проте в ній були наявні конуси резорбції, які мали повздовжню орієнтацію (рис. 2.3.11).

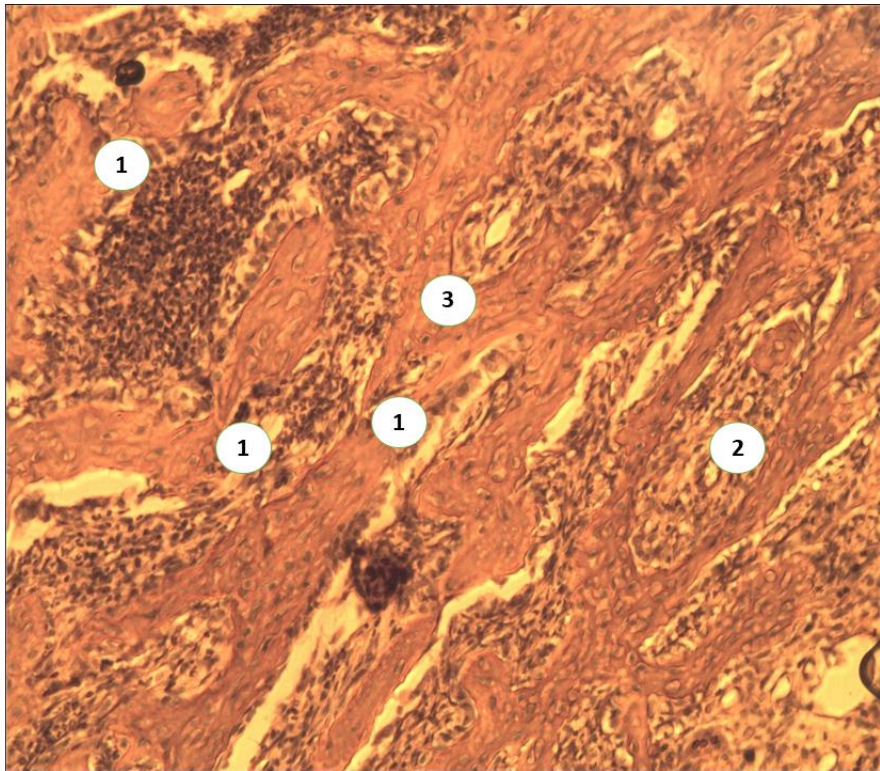


Рисунок 2.3.11 – Ділянка дистального епіфізу стегнової кістки кроля навколо імплантату зі сплаву КТЦ-125 через 3 місяці після операції. Забарвлення Гематоксилін-Еозин, зб. X 300: 1 – мікротріщини; 2 – витончення трабекул; 3 – «фронт мінералізації».

Здебільшого вони були розташовані на поверхні трабекул, що дещо зменшувало їх товщину. Майже не спостерігалися зони змін забарвлення кісткової тканини, що свідчить про нормалізацію мінерального обміну кістки на ділянці імплантації.

При імплантації конструкцій з гідроксиапатитним покриттям гістологічна картина також характеризувалась перебудовою структур навколо імплантату. Відмічалось зменшення ділянок сполучної тканини та розвиток пластинчастої кісткової тканини навколо імплантату (рис. 2.3.12).

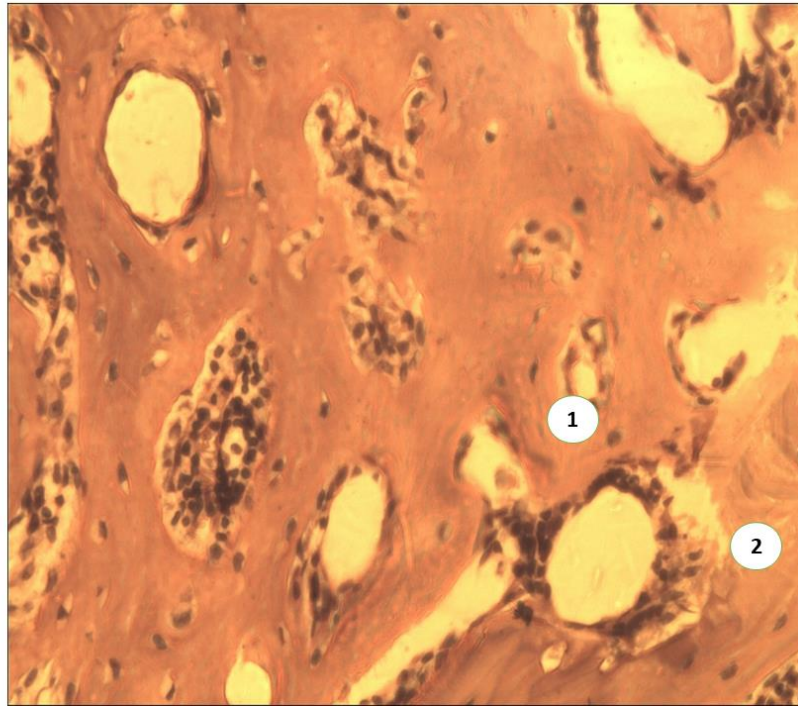


Рисунок 2.3.12 – Ділянка дистального епіфізу стегнової кістки кроля навколо імплантату зі сплаву β (Zr-Ti) через 3 місяці після операції. Забарвлення Гематоксилін-Еозин, зб. X 600: 1 – кісткова одиниця ремоделювання; 2 – новоутворена кісткова тканина.

Даний термін характеризувався формуванням повноцінної кісткової тканини з тісними зв'язками між останньою та поверхнею імплантату, що забезпечувало стабільність конструкції. Відмінністю між імплантатами складу β (Zr-Ti) та КТЦ-125 була наявність мікротріщин біля імплантату складу КТЦ-125, що може свідчити про наявність великих градієнтів механічного напруження між кісткою та металевою конструкцією. Проте, кількість тріщин та їх розмір є значно меншими у порівнянні з конструкціями без гідроксиапатитного покриття.

Гістологічна будова кісткової тканини навколо імплантатів з КТЦ-125 з гідроксиапатитним покриттям характеризувалась активними процесами перебудови, проте їх інтенсивність була меншою у порівнянні з імплантатом без покриття (рис. 2.3.13).

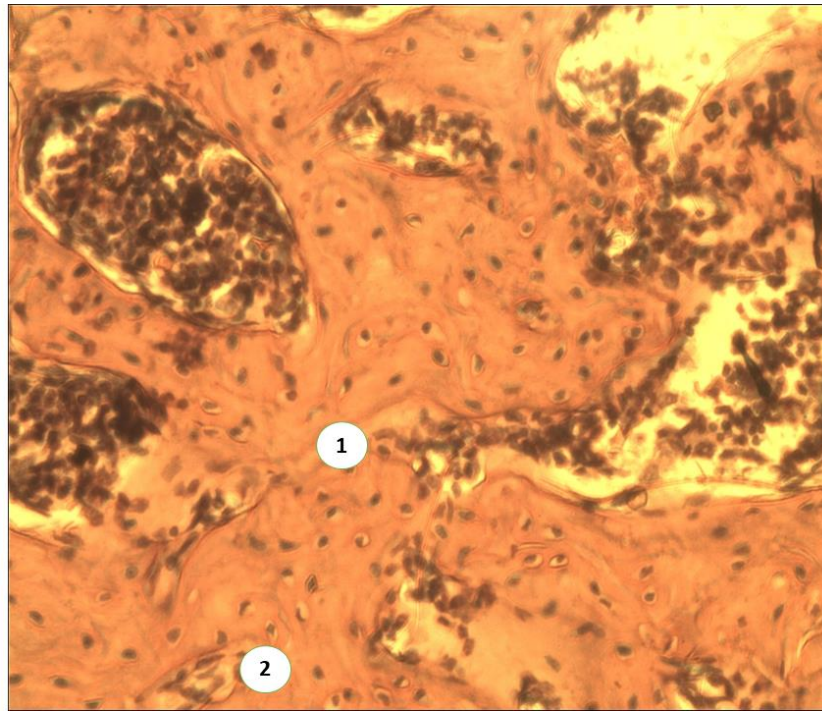


Рисунок 2.3.13 – Ділянка дистального епіфізу стегнової кістки кроля біля ділянки імплантації сплаву КТЦ-125 з гідроксиапатитом через 3 місяці після операції.

Забарвлення Гематоксилін-Еозин, зб. X 400: 1 – мікротріщина;

2 – кісткова одиниця ремоделювання.

На відміну від КТЦ-125, β (Zr-Ti) з гідроксиапатитним покриттям не викликав активізації ремоделювання на даному етапі остеointegraційних процесів і гістологічна будова тканини відповідала групі без покриття. Таким чином, саме від механічних властивостей сплаву залежить інтенсивність перебудови кісткової тканини навколо імплантату – сплави з більш фізіологічними механічними параметрами не викликають масивної перебудови тканини. При цьому наявність кальцій-фосфатного покриття на поверхні зменшує активність перебудови кістки.

Через 3 місяці після операції відбувається суттєва перебудова тканин навколо імплантатів. Як видно з таблиці 4, відбувається достовірне зростання кількості пластинчастої кісткової тканини та зменшення грубоволокнистої. При цьому більш суттєві зміни спостерігаються в серіях тварин з імплантатами складу КТЦ-125-НА та β (Ti-Zr)-НА, що свідчить про значний вплив гідроксиапатитного покриття на формування кісткової тканини. Слід зазначити, що відсоток сполучної тканини прогресивно зменшується, різниця з попереднім терміном

спостереження склала від 2 до 5 разів ($p \leq 0.05$). Навколо імплантатів складу КТЦ-125-НА та β (Ti-Zr)-НА сполучна тканина не візуалізується (табл. 2.3.4).

Таблиця 2.3.4 – Відсотковий вміст тканин навколо імплантів різного складу через 3 місяці спостереження за даними растрової електронної мікроскопії.

Показник	Пластинчаста кісткова тканини, %	Грубоволокниста кісткова тканина, %	Сполучна кісткова тканина, %
TiVT6	82,3±2,7*	11,5±2,0*	5,4±0,4*
КТЦ-125	81,8±4,5*	9,6±1,4*	3,8±1,2*
β (Ti-Zr)	85,4±2,1*	6,2±0,9*	2,1±0,5*
КТЦ-125-НА	94,7±1,4*	4,3±1,0*	-
β (Ti-Zr)-НА	96,3±2,6*	2,3±0,4*	-

*- достовірність різниці з аналогічним показником в попередній термін спостереження $p \leq 0.05$

Морфометрія гістологічних препаратів свідчить про зменшення активності процесів перебудови кістки в періімплантаційній зоні (табл. 2.3.5). При цьому не відбувається суттєвих та достовірних зрушень у порівнянні з попереднім терміном спостереження. Достовірне зменшення кількості одиниць ремоделювання спостерігається лише в серії з β (Ti-Zr) сплавом, що може свідчити про оптимальне механічне навантаження в системі «імплантат-кістка». Товщина кісткових трабекул дещо зростає у порівнянні з попереднім терміном спостереження, проте різниця є не достовірною.

Через 6 місяців після операції структура тканин навколо імплантатів без покриття суттєво не відрізнялась від попереднього терміну спостереження. Відбувалось поступове заміщення сполучно-тканинних елементів кістковою тканиною, проте остання була бідна на клітинні елементи. Така тканина повільно піддається ремоделюванню, що може спричинити розвиток мікроушкоджень від різниці напруги в системі «імплантат-кістка» з подальшим розвитком рухливості конструкції (рис. 2.3.14). Слід відмітити, що площа щілин між імплантатом та тканинами у даній групі значно зменшилась порівняно з попереднім терміном спостереження, що може свідчити про стабілізацію імплантату і зменшення його мікрорухомості.

Таблиця 2.3.5 – Морфометричні показники кісткової тканини в періімплантаційній зоні в залежності від типу імплантату через 3 місяці спостереження

Показник	Остеобласти (на мм ²)	Остеоцити (на мм ²)	Одиниці ремоделювання (на мм ²)	Ширина одиниць ремоделювання (мкм)	Товщина трабекул (мкм)
TiVT6	17,1±3,2	6,1±0,7	6,1±2,3	232,6±17,9	151,4±4,3
КТЦ-125	16,6±2,3	6,3±1,3	7,2±2,3	211,4±13,4	157,2±13,6
β (Ti-Zr)	13,9±2,6	6,2±2,3	4,5±0,5*	201,3±12,9	172,5±21,7
КТЦ-125-НА	16,1±3,2	7,1±2,3	5,8±1,4	212,5±7,2*	177,3±12,3
β (Ti-Zr)-НА	13,3±2,9	6,5±1,8	5,2±1,2	204,9±19,2	174,8±14,7

*- достовірність різниці з аналогічним показником в попередній термін спостереження ≤ 0.05

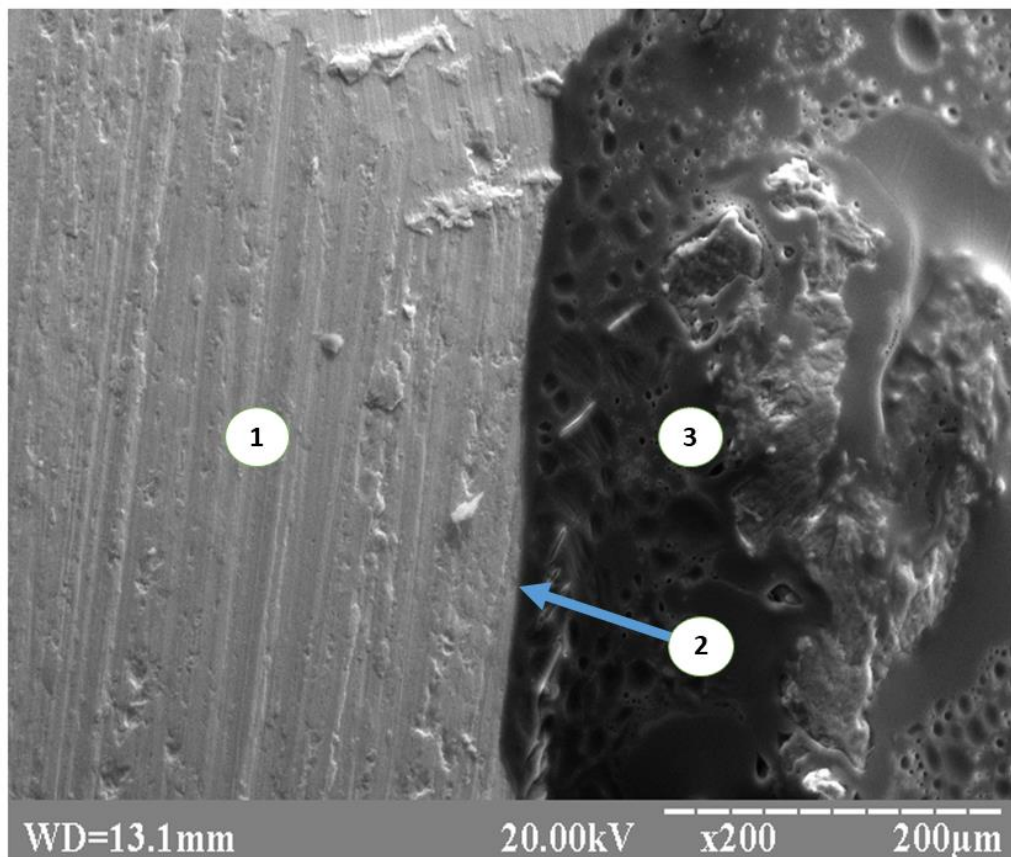


Рисунок 2.3.14 – Растрова електронна мікроскопія ділянки навколо імплантату з β (Zr-Ti) сплаву через 6 місяців після операції. Зб x 200: 1 – поверхня імплантату; 2 – місце контакту поверхні імплантату з кісткою; 3 – кісткова тканина.

Слід відмітити зростання площі контакту між імплантатом та кісткою при використанні сплаву β (Zr-Ti) та майже повну відсутність щілин в цьому випадку.

Гістологічна будова кісткової тканини навколо імплантатів з TiVT6 та КТЦ-125 характеризувалась зменшенням активності процесів ремоделювання, проте відмічалась наявність незначних за площею зон мозаїчного забарвлення та мікротріщин (рис. 2.3.15). Процеси ремоделювання активуються внаслідок появи надпорогових стимулів, які при імплантації відбуваються з боку металеві конструкції [Patelli A, 2018]. Такі сигнали можуть виникати як в наслідок мікрорухомості імплантату, так і при нерівномірному розподілу навантаження при використанні класичних високомодульних сплавів. В даному випадку, сплави TiVT6 та КТЦ-125 сприймають більшу частину навантаження та нерівномірно розподіляють його в кістковій тканині.

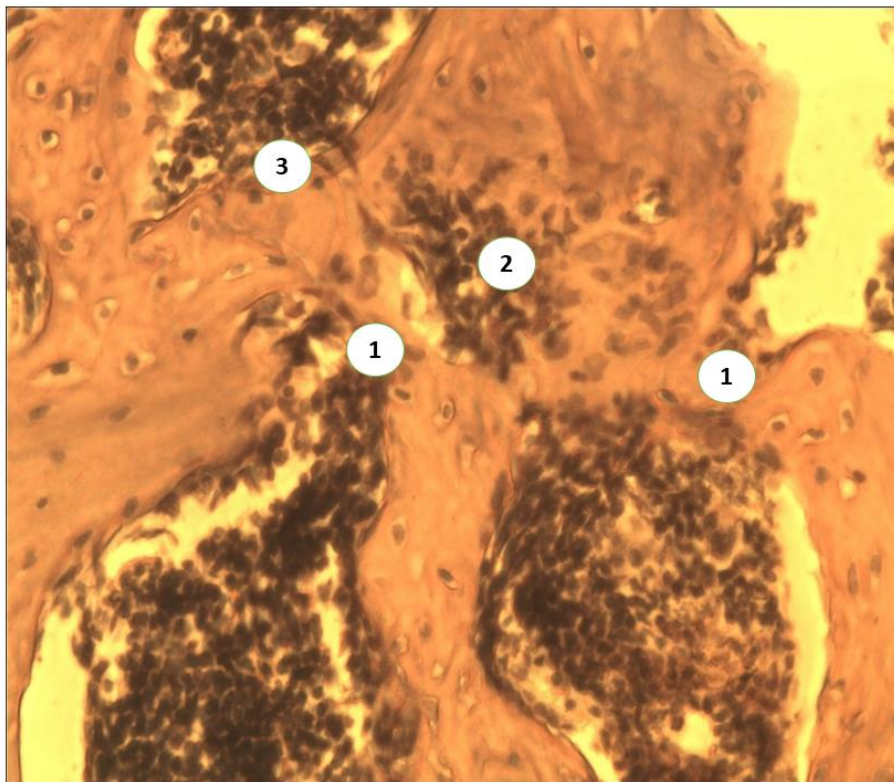


Рисунок 2.3.15 – Ділянка дистального епіфізу стегнової кістки кроля біля встановленого імплантату зі сплаву TiVT6 через 6 місяців після операції.

Забарвлення Гематоксилін-Еозин, зб. X 400: 1 – витончення трабекул;

2 – злиття одиниць ремоделювання.

Через 6 місяців після встановлення імплантату зі сплаву β (Zr-Ti) гістологічна будова кістки навколо конструкції характеризувалась мінімальними структурними змінами. Процеси ремоделювання за своєю активністю відповідали терміну 3 місяці і мають мінімальні наслідки для будови та функції кісткової тканини. Зони мозаїчного забарвлення зустрічаються на поодиноких препаратах і локалізуються у безпосередній близькості до металевої конструкції. Кількість остеобластів та їх розташування на поверхні трабекул відповідають фазі спокою, спостерігаються поодинокі витончені балочки з незавершеним формуванням кісткової тканини (рис. 2.3.16).

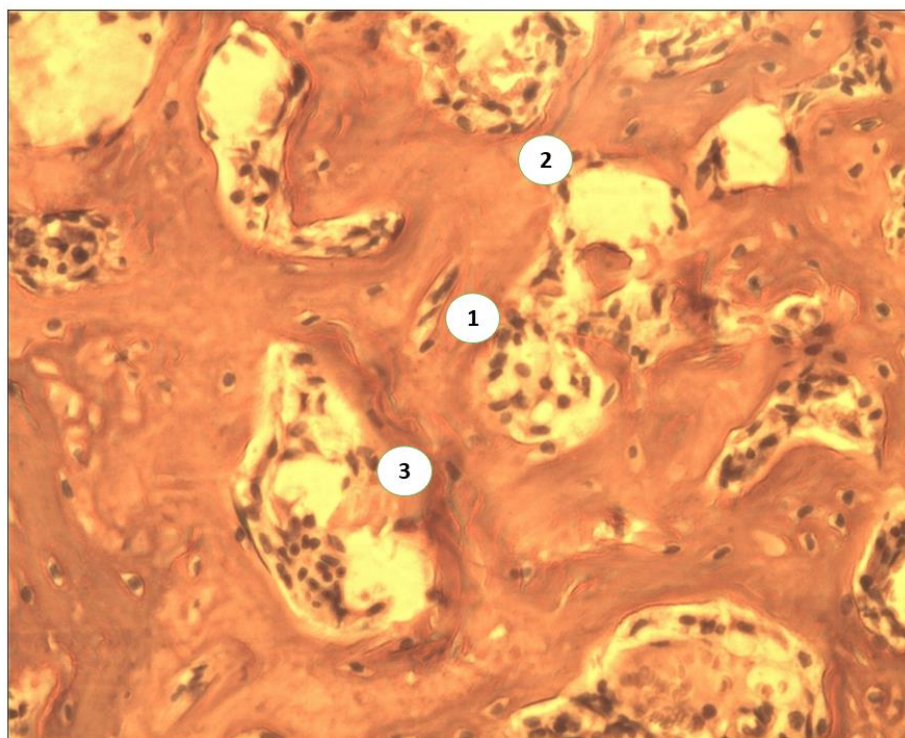


Рисунок 2.3.16 – Ділянка дистального епіфізу стегнової кістки кроля біля встановленого імплантату зі сплаву β (Zr-Ti) через 6 місяців після операції. Забарвлення Гематоксилін-Еозин, зб. X 400: 1 – кісткова одиниця ремоделювання; 2 – витончення трабекули; 3 – новоутворена кісткова тканина з «лінією цементування».

Ділянка контакту імплантатів з гідроксиапатитним покриттям з кістковою тканиною через 6 місяців після операції характеризується наявністю «мостиків»,

які свідчать про ріст кістки з поверхні імплантатів і про наявність хімічного зв'язку між покриттям та структурами новоутвореної тканини (рис. 2.3.17). Щільність кісткової тканини значно вища, ніж у попередніх групах, при цьому кількість клітин в товщі тканини значно перевищує групу без покриття. Не зважаючи на позитивну динаміку осифікації, в поодиноких ділянках присутня сполучна тканина, яка відмежовує поверхню імплантату від кісткової. Кількість таких «острівців» в групі з β (Zr-Ti) сплавом є меншою

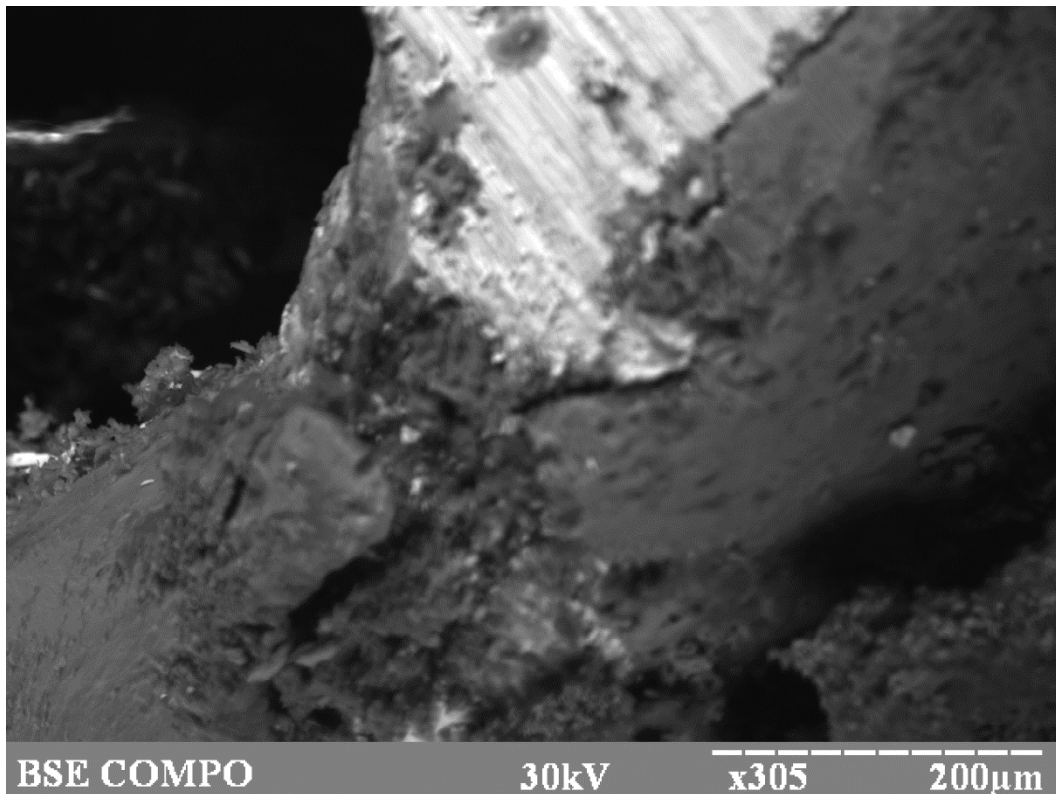


Рисунок 2.3.17 – Растрова електронна мікроскопія ділянки навколо імплантату з β (Zr-Ti) сплаву з гідроксиапатитним покриттям через 6 місяців після операції. 3б x 305.

Гістологічна будова кістки навколо імплантату залежала від складу сплаву. Так, процеси ремоделювання були більш активними в групі з імплантами з КТЦ-125, при цьому в ній відмічалися поодинокі мікротріщини. Імплантація сплаву β (Zr-Ti) з гідроксиапатитним покриттям характеризувалась звичною будовою кістки, що відповідала фазі спокою. Поодинокі одиниці ремоделювання

відображали зміну будови кістки при зміні умов навантаження та майже не відрізнялися від інтактної кістки.

Визначення площі різних типів тканин за даними растрової електронної мікроскопії показало перебудову грубоволокнистої кісткової тканини в пластинчасту навколо всіх типів імплантатів. Як видно з таблиці 2.3.6, відбувається достовірне зростання пластинчастої кісткової тканини навколо імплантатів без гідроксиапатитного покриття у порівнянні з попереднім терміном спостереження. Зважаючи на високий відсоток даного типу тканини навколо імплантатів з покриттям через 3 місяці після операції, різниця на 6-й місяць спостереження є недостовірною. Більше ніж у 2 рази зменшується площа грубоволокнистої кісткової тканини навколо імплантатів у тварин 1-3 серії. За даними растрової електронної мікроскопії кількість сполучної тканини є мінімальною навколо всіх типів імплантатів, при цьому навколо конструкцій з β (Ti-Zr) та КТЦ-125 з гідроксиапатитним покриттям її відсоток є достовірно меншим ($p \leq 0,05$) (табл. 2.3.6).

Таблиця 2.3.6 – Відсотковий вміст тканин навколо імплантів різного складу через 6 місяців спостереження за даними растрової електронної мікроскопії.

Показник	Пластинчаста кісткова тканини, %	Грубоволокниста кісткова тканина, %	Сполучна кісткова тканина, %
TiVT6	88,5±4,2*	4,8±1,9*	5,4±1,23*
КТЦ-125	89,1±2,7*	3,5±1,1*	4,6±0,95*
β (Ti-Zr)	92,9±3,2*	4,1±0,4*	3,1±0,4*
КТЦ-125-НА	91,1±0,7	2,7±0,3	3,2±0,3
β (Ti-Zr)-НА	92,5±1,9	2,1±0,9	3,5±0,6

*- достовірність різниці з аналогічним показником в попередній термін спостереження $p \leq 0.05$

Розвиток кісткової тканини навколо імплантату і зменшення можливості мікрорухомості призводить до зменшення інтенсивності ремоделювання кісткової тканини в періімплантаційній зоні. В тканині навколо імплантатів складу TiVT6 та КТЦ-125-НА достовірно зменшується кількість остеобластів, відбувається зменшення кількості одиниць ремоделювання в тканині навколо сплаву КТЦ-125

та ширини кісткових ремоделюючих одиниць – навколо імплантатів з TiVT6. Відбувається незначне зростання ширини кісткових балочок (табл. 2.3.7). При цьому слід зазначити, що активність ремоделювання є значно меншою навколо імплантатів з низькомодульного сплаву β (Ti-Zr).

Таблиця 2.3.7 – Морфометричні показники кісткової тканини в періімплантаційній зоні в залежності від типу імплантату через 6 місяців спостереження

Показник	Остеобласти (на мм ²)	Остеоцити (на мм ²)	Одиниць ремоделювання (на мм ²)	Ширина одиниць ремоделювання (мкм)	Товщина трабекул (мкм)
TiVT6	14,0±1,1*	6,3±1,1	5,3±1,7	201,7±13,2*	153,4±5,1
КТЦ-125	15,1±1,8	6,9±2,7	5,1±2,1*	207,6±22,8	165,5±11,8
β (Ti-Zr)	13,2±1,9	7,1±1,4	4,6±0,9	197,9±11,5	171,3±12,4
КТЦ-125- НА	13,9±2,7*	6,5±1,6	5,3±1,2	207,3±14,5	175,5±19,2
β (Ti-Zr)- НА	12,6±1,5	6,7±2,1	5,7±1,4	202,4±12,2	172,5±23,7

*- достовірність різниці з аналогічним показником в попередній термін спостереження $p \leq 0.05$

Аналізуючи відсоток контакту поверхні імплантату з кістковою тканиною через місяць після операції за даними растрової електронної мікроскопії, слід відмітити достовірну різницю між сплавами TiVT6 та β (Zr-Ti) без гідроксиапатитного покриття ($p \leq 0.05$). Також характерною ознакою є достовірна більша площа контакту кістки навколо імплантатів з гідроксиапатитним покриттям ($p \leq 0.001$ у порівнянні з немодифікованими сплавами). Відповідність механічних характеристик імплантату та кісткової тканини в останньому випадку імовірно має значення для росту кістки на поверхні імплантату. При цьому, наявність кальцій-фосфатного покриття є ключовим фактором у розвитку прямої остеоінтеграції і значно підвищує площу контакту кісткової тканини з імплантатом.

Через 3 місяці після імплантації слід відмітити зростання щільності кістки навколо всіх типів конструкцій (табл. 2.3.8). Достовірна різниця з попереднім

терміном спостерігалася для всіх імплантатів без покриття ($p \leq 0.05$), що свідчить про активізацію процесів ремоделювання кістки навколо конструкцій. Особливо значне зростання відсотка контакту кістки з імплантатом спостерігалось для сплаву β (Zr-Ti) – до 77,2%, що може бути наслідком більш оптимальної біомеханічної взаємодії в системі «імплантат-кістка». Зважаючи на високий вихідний рівень контакту імплантату з кісткою, відсоток зростання контакту в групі з гідроксиапатитним покриттям є недостовірним у порівнянні з попереднім терміном.

Визначення відсотку контакту поверхні імплантату з кісткою через 6 місяців спостереження свідчить про незначний ріст кісткової тканини біля поверхні сплавів TiVT6 та КТЦ-125 – різниця з попереднім терміном є недостовірною. Не зважаючи на відсутність достовірної різниці з попереднім терміном для сплаву β (Zr-Ti), відсоток кісткової тканини навколо імплантату є достовірно вищим за попередні групи ($p \leq 0.05$), що свідчить про вплив механічних параметрів імплантату на перебіг процесів остеоінтеграції. Зважаючи на високий вихідний рівень контакту імплантатів з кісткою при наявності гідроксиапатитного покриття, різниця з попереднім терміном була недостовірною. Проте, як видно з таблиці 2.3.8, площа контакту в даних групах є достатньою для забезпечення механічної стабільності конструкції.

Таблиця 2.3.8 – Відсоток контакту поверхні імплантату з кістковою тканиною за даними растрової електронної мікроскопії через місяць після імплантації.

Сплав	TiVT6	КТЦ-125	β (Zr-Ti)	КТЦ-125-ГАП	β (Zr-Ti)-ГАП
1 місяць	58,6 \pm 3,56	61,2 \pm 5,3	69,6 \pm 7,2	83,5 \pm 4,7	89,8 \pm 2,5
2 місяці	68,3 \pm 2,5*	67,9 \pm 1,2*	77,2 \pm 2,8*	89,1 \pm 5,4	91,4 \pm 2,9
3 місяці	72,9 \pm 3,2	74,6,9 \pm 2,3	81,9 \pm 3,8	92,4 \pm 3,9	94,1 \pm 4,2

*- достовірність різниці з аналогічним показником в попередній термін спостереження $p \leq 0.05$

ВИСНОВКИ

1. Металеві сплави, які широко використовують для виготовлення дентальних імплантатів мають достатню адгезивну здатність у відношенні як остеобластів, так і фібробластів. Використання гідроксиапатитного покриття значно підвищує здатність клітин до адгезії на поверхні імплантату.

2. Наявність кальцію та фосфору є чинником, який переважно стимулює проліферацію клітин остеобластичного диферону та майже не впливає на здатність фібробластів до проліферації.

3. На ранніх термінах після імплантації металевих конструкцій з біоінертних сплавів на їх поверхні відбувається адгезія органічного матриксу, при цьому наявність гідроксиапатитного покриття забезпечує більш стабільну адгезію та поліморфний клітинний склад, що є предиктором прямої osteointegraції. Наявність стимуляції проліферації остеобластів у порівнянні з фібробластами свідчить про можливий osteoіндуктивний ефект гідроксиапатитного покриття.

4. Наявність гідроксиапатитного шару призводить до більш стабільної адгезії білкового субстрату на поверхні. Загалом, біомеханічні параметри сплавів відіграють ключову роль в процесі перебудови кісткової тканини навколо імплантатів – «класичні» сплави призводять до активізації ремоделювання, що морфологічно проявляється у витонченні трабекул, зростанні кількості кісткових одиниць ремоделювання та розвитку мікропошкоджень.

5. Імплантація конструкцій зі сплаву β (Zr-Ti) призводить до незначної перебудови тканин в ділянці імплантації. Наявність гідроксиапатитного покриття забезпечує більшу площу контакту імплантату з кістковою тканиною і є лише додатковим чинником, який впливає на інтенсивність ремоделювання.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. R. Adell, U. Lekholm, B. Rockler, P. I Brånemark, *Int. J. Oral Surg.* 1981, 10, 387.
2. C. Mas-Moruno, M. Espanol, E. B. Montufar, G. Mestres, C. Aparicio, F. J. Gil, M. P. Ginebra, in *Biomaterials Surface Science* (Eds: A. Taubert, J. F. Mano, J. C. Rodríguez-Cabello), Wiley-VCH, Weinheim, Germany 2013, pp. 337–374.
3. S. Veerachamy, T. Yarlagadda, G. Manivasagam, P. K. Yarlagadda, *Proc. Inst. Mech. Eng., Part H* 2014, 228, 1083.
4. E. T. J. Rochford, R. G. Richards, T. F. Moriarty, *Clin. Microbiol. Infect.* 2012, 18, 1162.
5. P. E. Kolenbrander, R. J. Palmer, S. Periasamy, N. S. Jakubovics, *Nat. Rev. Microbiol.* 2010, 8, 471.
6. C. R. Arciola, D. Campoccia, P. Speziale, L. Montanaro, J. W. Costerton, *Biomaterials* 2012, 33, 5967.
7. S. Bauer, P. Schmuki, K. von der Mark, J. Park, *Prog. Mater. Sci.* 2013, 58, 261.
8. A. Civantos, E. Martínez-Campos, V. Ramos, C. Elvira, A. Gallardo, A. Abarrategi, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2017, 3, 1245.
9. A. G. Gristina, *Science* 1987, 237, 1588.
10. J. Raphael, M. Holodniy, S. B. Goodman, S. C. Heilshorn, *Biomaterials* 2016, 84, 301.
11. C. Mas-Moruno, M. Espanol, E. B. Montufar, G. Mestres, C. Aparicio, F. J. Gil, M. P. Ginebra, in *Biomaterials Surface Science* (Eds: A. Taubert, J. F. Mano, J. C. Rodríguez-Cabello), Wiley-VCH, Weinheim, Germany 2013, pp. 337–374.
12. L. Le Guéhennec, A. Soueidan, P. Layrolle, Y. Amouriq, *Dent. Mater.* 2007, 23, 844.
13. D. D. Deligianni, N. Katsala, S. Ladas, D. Sotiropoulou, J. Amedee, Y. F. Missirlis, *Biomaterials* 2001, 22, 1241.
14. A. Shekaran, A. J. Garcia, *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 2011, 96A, 261.

15. F. Barrere, C. M. van der Valk, G. Meijer, R. A. Dalmeijer, K. de Groot, P. Layrolle, *J. Biomed. Mater. Res., Part B* 2003, 67B, 655.
16. M. Shrikhanzadeh, *J. Mater. Sci. Lett.* 1991, 10, 1415.
17. J. E. Hulshoff, T. Hayakawa, K. van Dijk, A. F. Leijdekkers-Govers, J. P. van der Waerden, J. A. Jansen, *J. Biomed. Mater. Res.* 1997, 36, 75.
18. J. Lee, L. Rouhfar, O. Beirne, *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2000, 58, 1372.
19. K. von der Mark, J. Park, *Prog. Mater. Sci.* 2013, 58, 327.
20. R. O. Hynes, *Cell* 2002, 110, 673.
21. C. Mas-Moruno, R. Fraioli, F. Rechenmacher, S. Neubauer, T. G. Kapp, H. Kessler, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2016, 55, 7048.
22. R. Agarwal, C. González-García, B. Torstrick, R. E. Guldberg, M. Salmerón-Sánchez, A. J. García, *Biomaterials* 2015, 63, 137.
23. C. Herranz-Diez, C. Mas-Moruno, S. Neubauer, H. Kessler, F. J. Gil, M. Pegueroles, J. M. Manero, J. Guillem-Martí, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2016, 8, 2517.
24. B. Bragdon, O. Moseychuk, S. Saldanha, D. King, J. Julian, A. Nohe, *Cell. Signalling* 2011, 23, 609.
25. V. Llopis-Hernández, M. Cantini, C. González-García, Z. A. Cheng, J. Yang, P. M. Tsimbouri, A. J. García, M. J. Dalby, M. Salmerón-Sánchez, *Sci. Adv.* 2016, 2, e1600188
26. T. Fowler, E. R. Wann, D. Joh, S. Johansson, T. J. Foster, M. Höök, *Eur. J. Cell Biol.* 2000, 79, 672.
27. U. Schwarz-Linek, J. M. Werner, A. R. Pickford, S. Gurusiddappa, J. H. Kim, E. S. Pilka, J. A. Briggs, T. S. Gough, M. Höök, I. D. Campbell, J. R. Potts, *Nature* 2003, 423, 177.
28. C. Aparicio, F. J. Gil, C. Fonseca, M. Barbosa, J. A. Planell, *Biomaterials* 2003, 24, 263.
29. C. Aparicio, J. M. Manero, F. Conde, M. Pegueroles, J. A. Planell, M. Vallet-Regi, F. J. Gil, *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 2007, 82A, 521
30. C. D. W. Wilkinson, *Eur. Cells Mater.* 2004, 8, 21.

31. F. A. Denis, P. Hanarp, D. S. Sutherland, J. Gold, C. Mustin, P. G. Rouxhet, Y. F. Dufrêne, *Langmuir* 2002, 18, 819.
32. S. Krishnamoorthy, C. Hibert, M. Liley, A. Meister, M. Dalby, R. Oreffo, J. Brugger, R. Pugin, H. Heinzelmann, C. Hinderling, presented at Int. Conf. Nanoscience and Technology, ICN&T, Basel, Switzerland, 30 July to 4 August 2006.
33. E. K. Yim, R. M. Reano, S. W. Pang, A. F. Yee, C. S. Chen, K. W. Leong, *Biomaterials* 2005, 26, 5405.
34. Wong M, Eulenberger J, Schenk R, Hunziker E. Effect of surface topology on the osseointegration of implant materials in trabecular bone. *J Biomed Mater Res* 1995;29:1567-75.
35. Gotfredsen K, Wennerberg A, Johansson C, Skovgaard LT, Hjørting-Hansen E. Anchorage of TiO₂-blasted, HA-coated, and machined implants: an experimental study with rabbits. *J Biomed Mater Res* 1995;29:1223-31
36. Gottlander M, Johansson CB, Wennerberg A, Albrektsson T, Radin S, Ducheyne P. Bone tissue reactions to an electrophoretically applied calcium phosphate coating. *Biomaterials* 1997;18:551-7.
37. Vercaigne S, Wolke JG, Naert I, Jansen JA. Bone healing capacity of titanium plasma-sprayed and hydroxylapatitecoated oral implants. *Clin Oral Implants Res* 1998;9:261-71.
38. Li J. Behaviour of titanium and titania-based ceramics in vitro and in vivo. *Biomaterials* 1993;14:229-32.
39. Yeo IS, Han JS, Yang JH. Biomechanical and histomorphometric study of dental implants with different surface characteristics. *J Biomed Mater Res B Appl Biomat* 2008; 87:303-11.
40. Vercaigne S, Wolke JG, Naert I, Jansen JA. A histological evaluation of TiO₂-gritblasted and Ca-P magnetron sputter coated implants placed into the trabecular bone of the goat: Part 2. *Clin Oral Implants Res* 2000;11:314-24
41. Borsari V, Fini M, Giavaresi G, Rimondini L, Consolo U, Chiusoli L, et al. Osteointegration of titanium and hydroxyapatite rough surfaces in healthy and

- compromised cortical and trabecular bone: in vivo comparative study on young, aged, and estrogen-deficient sheep. *J Orthop Res* 2007;25:1250-60
42. Savarino L, Fini M, Ciapetti G, Cenni E, Granchi D, Baldini N, et al. Biologic effects of surface roughness and fluorhydroxyapatite coating on osteointegration in external fixation systems: an in vivo experimental study. *J Biomed Mater Res A* 2003;66:652-61.
43. Mendes VC, Moineddin R, Davies JE. The effect of discrete calcium phosphate nanocrystals on bone-bonding to titanium surfaces. *Biomaterials* 2007;28:4748-55.
44. Meirelles L, Currie F, Jacobsson M, Albrektsson T, Wennerberg A. The effect of chemical and nano topographical modifications on early stage of osseointegration. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2008;23:641 7
45. Schliephake H, Aref A, Scharnweber D, Roessler S, Sewing A. Effect of modifications of dual acid-etched implant surfaces on periimplant bone formation. Part II: calcium phosphate coatings. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:38 44.
46. Rottmar M, Müller E, Guimond-Lischer S, Stephan M, Berner S, Maniura-Weber K. Assessing the osteogenic potential of zirconia and titanium surfaces with an advanced in vitro model. *Dent Mater*. 2018 Nov 10. pii: S0109-5641(18)30429-9.
47. Patelli A, Mussano F, Brun P, Genova T, Ambrosi E, Michieli N, Mattei G, Scopece P, Moroni L. Nanoroughness, Surface Chemistry, and Drug Delivery Control by Atmospheric Plasma Jet on Implantable Devices. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018 Nov 21;10(46):39512-39523.
48. Xu R, Hu X, Yu X, Wan S, Wu F, Ouyang J, Deng F. Micro-/nano-topography of selective laser melting titanium enhances adhesion and proliferation and regulates adhesion-related gene expressions of human gingival fibroblasts and human gingival epithelial cells. *Int J Nanomedicine*. 2018 Sep 4;13:5045-5057
49. Kong F, Nie Z, Liu Z, Hou S, Ji J. Developments of nano-TiO₂ incorporated hydroxyapatite/PEEK composite strut for cervical reconstruction and interbody

- fusion after corpectomy with anterior plate fixation. *J Photochem Photobiol B*. 2018 Oct;187:120-125.
50. K. G. Neoh, E. T. Kang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2011 , 3, 2808.
51. I. Banerjee, R. C. Pangule, R. S. Kane, *Adv. Mater.* 2011 , 23, 690.
52. K. G. Neoh, X. Hu, D. Zheng, E. T. Kang, *Biomaterials* 2012, 33, 2813.
53. K. Glinel, P. Thebault, V. Humblot, C. M. Pradier, T. Jouenne, *Acta Biomater.* 2012, 8, 1670.
54. L. Zhang, C. Ning, T. Zhou, X. Liu, K. W. K. Yeung, T. Zhang, Z. Xu, X. Wang, S. Wu, P. K. Chu, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2014, 6, 17323.
55. N. J. Hickok, I. M. Shapiro, *Adv. Drug Delivery Rev.* 2012, 64, 1165.
56. L. G. Harris, S. Tosatti, M. Wieland, M. Textor, R. G. Richards, *Biomaterials* 2004, 25, 4135.
57. R. R. Maddikeri, S. Tosatti, M. Schuler, S. Chessari, M. Textor,
58. R. G. Richards, L. G. Harris, *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 2008, 84A, 425.
59. G. Subbiahdoss, B. Pidhatika, G. Coullerez, M. Charnley, R. Kuijjer, *Eur. Cells Mater.* 2010, 19, 205.
60. J. Buxadera-Palomero, C. Calvo, S. Torrent-Camarero, F. J. Gil, C. Mas-Moruno, C. Canal, D. Rodríguez, *Colloids Surf., B* 2017, 152, 367.
61. X. Hu, K. G. Neoh, Z. Shi, E. T. Kang, C. Poh, W. Wang, *Biomaterials* 2010, 31, 8854.
62. Q. Yu, Z. Wu, H. Chen, *Acta Biomater.* 2015, 16, 1.
63. Y. Cheng, H. Yang, Y. Yang, J. Huang, K. Wu, Z. Chen, X. Wang, C. Lin, Y. Lai, *J. Mater. Chem. B* 2018, 6, 1862.
64. K. Das, S. Bose, A. Bandyopadhyay, B. Karandikar, B. L. Gibbins, *J. Biomed. Mater. Res., Part B* 2008, 87B, 455.
65. A. Gao, R. Hang, X. Huang, L. Zhao, X. Zhang, L. Wang, B. Tang, S. Mad, P. K. Chu, *Biomaterials* 2014, 35, 4223
66. Y. Li, W. Xiong, C. Zhang, B. Gao, H. Guan, H. Cheng, J. Fu, F. Li, *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 2014, 102, 3939.

67. R. Hang, A. Gao, X. Huang, X. Wang, X. Zhang, L. Qin, B. Tang, J. Biomed. Mater. Res., Part A 2014, 102, 1850.
68. T. Kumeria, H. Mon, M. S. Aw, K. Gulati, A. Santos, H. J. Griesser, D. Losic, Colloids Surf., B 2015, 130, 255.
69. A. Besinis, S. D. Hadi, H. R. Le, C. Tredwin, R. D. Handy, Nanotoxicology 2017, 11, 327.
70. M. A. Surmeneva, A. A. Sharonova, S. Chernousova, O. Prymak, K. Loza, M. S. Tkachev, I. A. Shulepov, M. Epple, R. A. Surmenev, Colloids Surf., B 2017, 156, 104.
71. U. K. Marelli, F. Rechenmacher, T. R. Sobahi, C. Mas-Moruno, H. Kessler, Front. Oncol. 2013, 3, 222.
72. R. Harrison, Science 1911 , 34, 279.