

Шулятникова О.А., Рогожников Г.И

## Морфологическое исследование органов и тканей экспериментальных животных при внутримышечной имплантации диоксидтитановых образцов с наноструктурированной поверхностью (экспериментально-лабораторное исследование)

ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России, г. Пермь

Shuliatnikova O. A., Rogoznikov G. I.

### Morphological study of organs and tissues of experimental animals with intramuscular implantation of dioxide-titanium samples with nanostructured surface (experimental and laboratory research)

#### Резюме

Цель исследования явилось изучение в эксперименте на животных общетоксического действия и местной реакции тканей на внутримышечную имплантацию образцов диоксида титана с наноструктурированной поверхностью. Выделены контрольная (стекло, n=15) и две экспериментальные группы (образцы из диоксида титана (n=15), образцы из диоксида титана с наномодифицированной поверхностью (n=15)). Представленные результаты гистологического исследования не выявили патологически выраженных изменений во внутренних органах экспериментальных животных и реакции местных тканей (мышцы) в области контакта с имплантируемым материалом – наноструктурированным диоксидом титана. Таким образом, наноструктурированная поверхность диоксида титана не оказывает общетоксического действия и местного влияния на ткани опытных животных при внутримышечной имплантации экспериментальных образцов.

**Ключевые слова:** эксперимент, имплантация, животные, наномодифицированный диоксид титана

#### Summary

The aim of the study was to study, in an animal experiment, the general toxicity and local tissue response to intramuscular implantation of titanium dioxide samples with a nanostructured surface. Control (glass, n = 15) and two experimental groups (samples from titanium dioxide (n = 15), samples from titanium dioxide with nanomodified surface (n = 15)) were isolated. The presented results of the histological examination revealed no pathological changes in the internal organs of experimental animals and the reaction of local tissues (muscles) in the area of contact with the implanted material - nanostructured titanium dioxide. Thus, the nanostructured surface of titanium dioxide does not have a general toxic effect and a local effect on the tissues of experimental animals with intramuscular implantation of experimental samples.

**Key words:** experiment, implantation, animals, nanomodified dioxide of the titan

#### Введение

На современном этапе развития стоматологии дентальная имплантация приобретает все большее распространение, значительно улучшая качество жизни людей с частичным и полным отсутствием зубов [1]. Однако, несмотря на рост научно-технического прогресса, в том числе и в области дентальной имплантологии, существует две основных проблемы при установке дентальных

имплантатов – это проблема осложнений воспалительного характера мягкотканного пародонта, вследствие образования микробной пленки на конструкционном материале имплантата и недостаточная остеоинтеграция на границе костной ткани и материала имплантата, что в конечном счете может приводить к его потере [2, 3].

Особый интерес в стоматологическом материаловедении при решении данных проблем приобретает на-

правление в области наноструктурированных конструкционных материалов. Предварительно проведенные нами лабораторные и экспериментальные исследования свидетельствуют о способности наноструктурированного диоксида титана отрицательно влиять на биопленкообразование на конструкционном материале и улучшать остеointеграционные процессы на границе костной ткани и экспериментальных образцов из наноструктурированного диоксида титана [4, 5]. Таким образом, было интересно изучить в эксперименте общетоксическое влияние и реакцию местных тканей при имплантации экспериментальных образцов наноструктурированного диоксида титана опытным животным для дальнейшего планирования его использования в практической деятельности врача-стоматолога.

Цель работы: изучение в эксперименте общетоксического действия и местной реакции тканей на имплантацию образцов диоксида титана с наноструктурированной поверхностью.

### Материалы и методы

Экспериментальное исследование выполнено по разрешению Этического комитета ФГБОУ ВО «ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России». Использовали 51 клинически здоровых нелинейных белых крысы (самцов) четырехмесячного возраста, с массой тела 180-230 г, содержащихся в стандартных условиях вивария.

Экспериментальные диоксидтитановые образцы для исследований в виде таблеток (диаметр 3 мм, высота 2 мм) в количестве 33 шт. были изготовлены на кафедре «Материалы, технологии и конструирование машин» Пермского национального исследовательского политехнического университета, соответствовали требованиям ИСО 10993-12 и представляли собой спеченный диоксид титана в форме рутила, так как именно эта кристаллическая модификация образуется как при спекании изделий из диоксида титана, так и при окислении поверхности титана, в частности, титановых имплантатов. 15 образ-

цов от общего количества, подвергали дополнительной технологической обработке, при которой на поверхность титана наносили наномодифицированный слой диоксида титана в форме анатаза [рис. 1]. Контрольные образцы были изготовлены из медицинского стекла ВС-3, ГОСТ 19808-86, такого же размера в количестве 15 штук.

Весь эксперимент выполнен в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 708н от 23.08.2010 г., и «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18.III.1986 (текст изменен в соответствии с положениями Протокола (ETS № 170), после его вступления в силу 2 декабря 2005 года), утвержденной решением этического комитета ГОУ ВПО «ПГМА им. академика Е.А. Вагнера» Росздрава и с ГОСТ Р ИСО 10993-6:2009 «Оценка биологического действия медицинских изделий», который соответствует ISO 10993-6:2007.; Лиссабонский договор о внесении изменений в Договор о Европейском союзе и Договор об учреждении Европейского сообщества (вступили в силу 1 декабря 2009 года).

Исследование проводили на базе патоморфологического отдела (зав., д.м.н., проф. П.В. Косарева) Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера» Минздрава России.

Экспериментальных животных разделили на три группы:

1 группа (контрольная). Внутримышечная имплантация стерильного медицинского стекла (n=18);

2 группа (экспериментальная). Внутримышечная имплантация стерильных образцов, выполненных из диоксида титана (n=18).

3 группа (экспериментальная). Внутримышечная имплантация стерильных образцов, выполненных из диоксида титана и нанесенным наноструктурированным поверхностным слоем (n=15).

Внутримышечную имплантацию экспериментальных образцов животным осуществляли на базе вивария



Рисунок 1. Экспериментальные образцы из диоксида титана с наномодифицированной поверхностной обработкой

ЦИНИЛ ФГБОУ ВО «ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера» Минздрава России. Заднюю внешнюю поверхность бедра животных очищали от шерсти, обрабатывали 70% этиловым спиртом, после 3-5 минут ингаляционного наркоза, дополненного местной анестезии «Ультракаином» в проекции линейного разреза тканей размером 1 см внутримышечно вводили стерильные имплантаты, рану послойно ушивали, и обрабатывали бриллиантовым зеленым.

Ежедневное динамическое наблюдение за животными включало регистрацию поведения, внешнего вида, физиологических функций. По окончании исследования (29 день) животных выводили из эксперимента с соблюдением правил эвтаназии, руководствуясь положением международного стандарта ИСО/ДИС 10993 «Биологический контроль материалов и изделий медицинского назначения» и ГОСТ Р ИСО 10993-6-2009 «Оценка биологического действия медицинских изделий», который соответствует ISO 10993-6:2007.

Сразу после наступления биологической смерти у животного забирали образцы органов и местной ткани для проведения морфологических исследований: поднижнечелюстная слюнная железа; печень; селезенка; агрегированные лимфоидные узелки – пейеровы бляшки и ткани мышцы в области имплантата.

## Результаты и обсуждение

Во время проведения эксперимента в течение 29 дней не отмечено случаев гибели животных. Поведение, аппетит, состояние кожных покровов, физиологические функции у животных опытных групп не отличались от таковых у животных группы контроля.

Гистологическое исследование фрагментов поднижнечелюстной слюнной железы. В контрольной и экспериментальных группах не выявлено изменений морфологического строения поднижнечелюстных желез. Подчелюстная железа образована смешанными (белково-слизистыми) концевыми отделами и четко визуализируемыми выводными протоками у животных всех групп. У одного животного группы контроля в препарате имелся локус с отеком соединительной ткани железы [рис. 2, а].

Гистологическое исследование фрагментов печени. Ткань печени типичного строения: структура сохранена, представлена дольками правильной формы, образованными печеночными балками, состоящими из гепатоцитов. Визуализируются просветы центральных вен без патологических изменений. На периферии долек выявляются триады типичного строения. У животных контрольной и 1-й экспериментальной групп в паренхиме печени визуализируются участки зернистой дистрофии гепатоцитов [рис. 3, а], определяются участки вакуольной и жировой дистрофии и ограниченные участки некрозов паренхимы печеночной ткани у половины животных. Во 2-й экспериментальной группе животных ткань печени была типичного строения, в некоторых случаях имелись расширения синусоидных капилляров, визуализировались участки зернистой дистрофии гепатоцитов, редкие ограниченные участки некрозов паренхимы с

признаками регенерации.

Гистологическое исследование фрагментов селезенки. Во всех группах животных строение селезенки было типичным с выявлением красной и белой пульпы. У большинства животных групп определяли полнокровие красной пульпы. В контрольной группе встречался гемосидероз красной пульпы, выраженный в разной степени. Белая пульпа была представлена узелками типичной структуры: эксцентрично расположенная центральная артериола с периартериальной зоной (Т-зависимая зона), светлый центр (центрами размножения) (В-зависимая зона) с мантийной зоной, маргинальная зона. Во 2-й экспериментальной группе гемосидероз не выявлен, отмечен отдельный очаг некроза лимфоидной ткани в белой пульпе у одного животного.

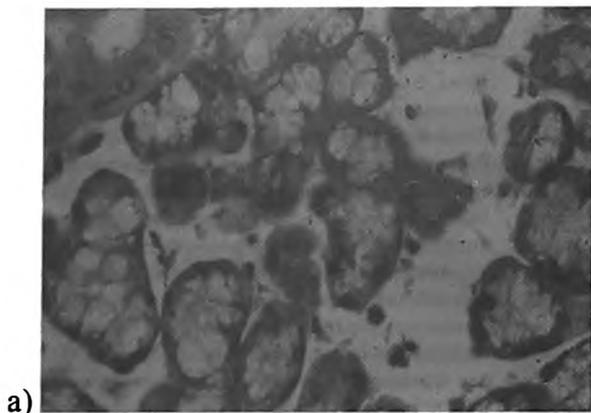
Гистологическое исследование агрегированных лимфоидных узелков – пейеровы бляшки. У всех животных контрольной группы типичного строения: структура лимфоидных узелков сохранена, контуры их четкие, в узелках выявляются светлые центры. В эпителии кишки над скоплениями узелков определяются многочисленные клетки Панета с ацидофильными гранулами. В единичных микропрепаратах экспериментальных групп выявлено некротическое изменение лимфоидной ткани в агрегированных узелках, хотя узелки в структуре бляшки дифференцировались хорошо.

Гистологическое исследование фрагментов мышцы из области имплантации. У всех животных контрольной и экспериментальных групп в образцах мышечной ткани с продольно срезанными мышечными волокнами хорошо видна поперечная исчерченность и овально-вытянутые ядра. Тем не менее, в препаратах контрольной группы выявляются участки с бледными мышечными волокнами, с потерей поперечной исчерченности, неомогенной, глыбчатой цитоплазмой, обширные участки дистрофических изменений мышечных волокон выявлены в половине случаев [рис. 4, а], обнаруживается диффузная лейкоцитарная инфильтрация в соединительной ткани перимизия. В 1-й экспериментальной группе в отдельных микропрепаратах встречаются одиночные участки дистрофических изменений мышечных волокон, ограниченные по площади, в целом строение без патологических изменений [рис. 5, а]. Во 2-й экспериментальной группе в отдельных микропрепаратах выявляли единичные участки с бледными мышечными волокнами, с потерей поперечной исчерченности и редкие участки дистрофических изменений мышечных волокон, но общая картина нормального строения сохранена [рис. 5, б].

## Выводы

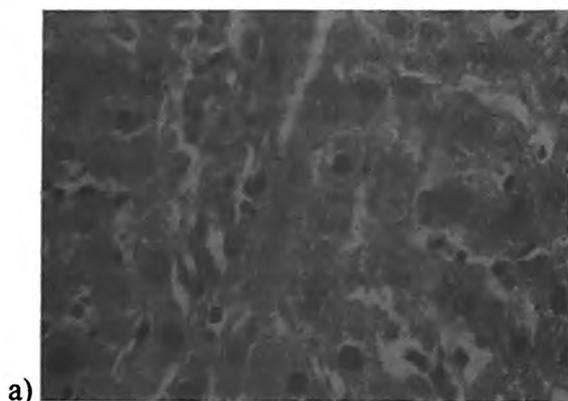
Резюмируя вышеописанные результаты гистологического исследования внутренних органов опытных животных и мышечной ткани из области контакта экспериментальных образцов диоксида титана, в том числе с наномодифицированной поверхностью выявлено следующее:

1. Слонные подчелюстные железы – без особенностей (как в контрольной, так и в опытных группах) [рис. 2 б].



	<u>Подчелюстная железа</u>	
	типичное строение	отек
группа I	94,45%	5,55%
группа II	94,45%	5,55%
группа III	100,00%	0,00%

Рисунок 2. а) Подчелюстная слюнная железа (контрольная группа), определяется отек соединительной ткани. Окраска гематоксилин-эозин. ×600; б) сравнительная характеристика к 1-му выводу



	<u>Печень</u>		
	зернистая дистр	вакуольная дистр	жировая дистр
группа I	100,00%	11,11%	11,11%
группа II	100,00%	33,33%	0,00%
группа III	100,00%	20,00%	0,00%

Рисунок 3. а) Печень (2-я экспериментальная группа). Зернистая дистрофия гепатоцитов. Окраска гематоксилин-эозин. ×600; б) сравнительная характеристика ко 2-му выводу



	<u>Мышцы</u>	
	лейкоц инфильтрация	отек
группа I	11,11%	0,00%
группа II	0,00%	0,00%
группа III	0,00%	0,00%

Рисунок 4. а) Продольный срез мышечных волокон в месте имплантата с обширными дистрофическими участками (группа контроля). Гематоксилин и эозин ×150; б) сравнительная характеристика к 5-му выводу

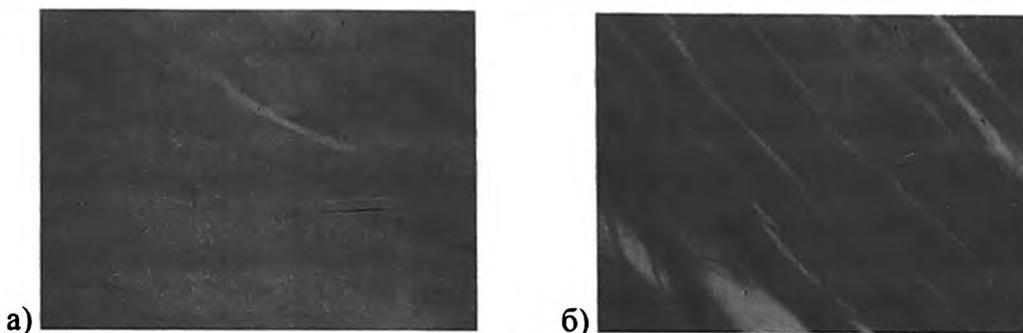


Рисунок 5. а) Продольный срез поперечнополосатых мышц в области имплантата – нормальное строение мышечных волокон, визуализируется поперечная исчерченность (1-я экспериментальная группа); б) Продольный срез мышечных волокон с поперечной исчерченностью (2-я экспериментальная группа).  
Окраска гематоксилин-эозин.  $\times 600$

2. Печень – без существенных изменений в опыте по сравнению с контролем. Имеется тенденция в экспериментальных группах к расширению синусоидных капилляров [рис. 3 б].

3. Селезенка нормального строения во всех группах.

4. Агрегированные лимфоидные узелки тонкой кишки – в контроле и в опыте – без каких-либо изменений.

5. Мышцы без каких-либо статистически значимых изменений по группам [рис. 4 б].

Таким образом, можно говорить об отсутствии патологических ярко выраженных достоверных изменений во внутренних органах экспериментальных животных и реакции местных тканей (мышцы) из области контакта с имплантируемым материалом. Наличие отдельно встречающиеся морфологические изменения могут быть расценены как общая реакция организма животного на операцию имплантации. Кроме этого, выявленные отдельные изменения не являются при статистической обработки значимыми и достоверными. Таким образом, наноструктурированная поверхность об-

работка диоксидом титана не оказывает общетоксического действия и местного влияния на ткани экспериментальных животных.

*Шулятникова О.А. – к.м.н., доцент кафедры ортопедической стоматологии Пермского государственного медицинского университета им. академика Е.А. Вагнера (ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России), инженер кафедры «Материалы, технологии и конструирование машин» Пермского национального исследовательского политехнического университета (ФГБОУ ВО ПНИПУ); Рогожников Г.И. – д.м.н., профессор, Заслуженный деятель науки РФ, заведующий кафедрой ортопедической стоматологии Пермского государственного медицинского университета им. академика Е.А. Вагнера (ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России); Автор, ответственный за переписку: Шулятникова Оксана Александровна, г. Пермь, 614007, ул. Революции, д.18, кв.15, e-mail: anasko06@mail.ru*

## Литература:

1. Хенч Л., Джонс Д. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей. Москва: Техносфера; 2007.
2. Lindhe J., Meyle J. *J Clin Periodontol* 2008; 35 (8): 282–5.
3. Zitzmann, N.U. & Berglundh, T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *Journal of clinical periodontology* 2008; 35: 286–91.
4. Шулятникова О.А., Порозова С.Е., Коробов В.П. и соавт. Ингибирование образования микробной пленки при наноструктурировании поверхности конструкционного материала. *Уральский медицинский журнал* 2016; 7 (140): 20–24.
5. Шулятникова О.А., Косарева П.В., Рогожников Г.И., Порозова С.В. Морфологические характеристики костной ткани экспериментальных животных при внутрикостной имплантации титановых образцов с поверхностной обработкой наномодифицированным диоксидом титана (экспериментально-лабораторное исследование). *Уральский медицинский журнал*. 2017; № 1 (145): С. 120–124.