

## МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ПРОЦЕССА ОСТЕОИНТЕГРАЦИИ ИМПЛАНТАТОВ

Тимченко П.Е.<sup>1</sup>, Захаров В.П.<sup>1</sup>, Волова Л.Т.<sup>2</sup>, Болтовская В.В.<sup>2</sup>, Тимченко Е.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Самарский государственный аэрокосмический университет им. академика С.П. Королёва  
(национальный исследовательский университет),

<sup>2</sup>Институт экспериментальной медицины и биотехнологий, г. Самара

### Аннотация

Экспериментально показано, что метод конфокальной флуоресцентной микроскопии обеспечивает динамический контроль процесса интеграции различных типов клеток в костный имплантат с разрешением не хуже 400 нм. Предложена оптическая методика оценки качества костных имплантатов и технологии их изготовления.

**Ключевые слова:** конфокальная микроскопия, флуоресценция, остеоинтеграция, контраст, разрешение.

### Введение

Заместительное восстановление (регенерация) органо-тканевых участков в поражённой области организма является одной из важных проблем современной медицины [1]. Она затрагивает практически все области костной хирургии: травматологию, челюстно-лицевую хирургию, хирургическую стоматологию, ортопедию, оториноларингологию и нейрохирургию, - где необходимо восстановить утраченную структуру и/или функцию органа методами остеосинтеза или костной пластики [2]. Однако активное практическое применение имплантатов породило новую проблему. Внедрение синтезированных материалов в поражённую область организма приводит к нарушению гомеостаза, последствием которого является плохая интеграция эксплантата и даже его отторжение, неспособность длительного функционирования внедряемой синтетической матрицы. Вероятность развития данных эффектов связана как с методикой остеоинтеграции имплантата, так и корректным определением завершённости данного процесса.

Данные явления сложно прогнозировать на этапе изготовления имплантата, следовательно, для обеспечения качества операции трансплантации необходим динамический контроль процесса остеоинтеграции, который, в свою очередь, должен быть неразрушающим и обеспечивать разрешение на клеточном уровне [3]. Традиционные методы электромиографии и ультрасонографии не обладают требуемым разрешением [4], необходим переход к оптическим методам. Учитывая, что биологическая ткань является сильно рассеивающей средой, методы широкопольной микроскопии оказываются неэффективными [5]. Данную проблему можно преодолеть, переходя к методу конфокальной микроскопии, который обеспечивает увеличение контраста изображения за счёт применения сфокусированного излучения и дифракмирования рассеянного излучения в плоскости наблюдения. Такое увеличение контрастности приводит к возможности разрешения объектов, имеющих разницу в интенсивности до 200 : 1, и их локализации как в плоскости объекта, так и вдоль оптической оси. Дальнейшее увеличение контраста возможно за счёт эффекта флуоресценции, используя либо естественные флуорофоры биологической ткани, либо специ-

альные окрашивающие вещества. Следует отметить, что метод флуоресцентной микроскопии обладает более низким разрешением по сравнению с электронной или атомно-силовой микроскопией. Однако в отличие от последних он позволяет наблюдать за внутренней микроструктурой живых клеток и даже небольшими организмами. Благодаря этому флуоресцентная микроскопия оказалась оптимальным методом для изучения механизмов функционирования организмов на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях [6 - 8].

Действительно, изменение клеточных характеристик под действием различных факторов как негативного (например, повышение температуры при хирургическом вмешательстве), так и позитивного характера (покрытия имплантатов, стимулирующие остеоинтеграцию, шероховатость) сопровождается изменением оптических характеристик тканей, что позволяет использовать данный факт для контроля динамики их состояния.

Целью работы является диагностика костных имплантатов и контроль процесса их остеоинтеграции с помощью метода конфокальной флуоресцентной микроскопии.

### Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования были выбраны лиофилизированные биоимплантаты, изготовленные на сублимационной установке ALPHA2-4LSC из соединительных тканей человека по технологии «Лиопласт»<sup>®</sup>, согласно ТУ-9398-001-01963143-2004. Данные имплантаты сохраняют свои первоначальные качества от 3 до 5 лет и удобны для транспортировки и хранения.

Экспериментальный стенд [9] был реализован на базе конфокального оптического микроскопа и лазерного комбайна фирмы ANDOR (скорость сканирования до 25 слоёв в секунду). На рис. 1 приведена блок-схема установки. Стенд обеспечивал два режима микросъёмки: режим конфокальной микроскопии в видимом свете и режим лазерной флуоресценции. В первом случае в качестве источника излучения использовался широкополосный источник (галогеновая лампа), а во втором – лазерные излучатели мощностью 100 мВт на длинах волн 488 нм и 561 нм.

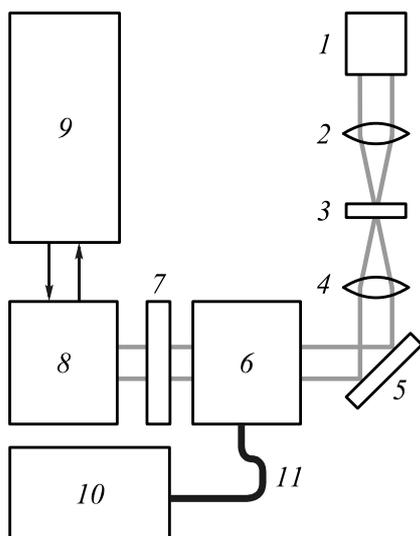


Рис. 1. Установка флуоресцентной конфокальной микроскопии: 1 – источник видимого света (галогеновая лампа), 2 – коллиматор, 3 – объект, 4 – объектив, 5 – поворотное зеркало, 6 – конфокальный сканирующий блок, 7 – блок фильтров, 8 – камера, 9 – компьютер, 10 – лазерный блок, 11 – волоконный ввод

В режиме конфокальной микроскопии свет от галогеновой лампы 1 (видимый диапазон) через блок фильтров поступает на систему фокусировки 2, которая фокусирует излучение на объекте 3. Пршедшее через объект (рассеянное вперед) излучение собирается объективом (20× или 40×) 4 и через систему зеркал и призмы 5 вводится в сканирующий конфокальный блок 6. Сканирующий конфокальный блок построен по принципу Нипкова [10]: вращающиеся диски с микродиафрагмами, реализующими конфокальный метод. Перемещение фокальной плоскости (выделение анализируемого слоя ткани) осуществляется за счёт управляемого с компьютера пьезоэлектрического z-микросканера с установленным на нём объектом исследования. Спектральная фильтрация излучения осуществляется в блоке 7, реализованном в виде системы сменных фильтров, установленных на вращающейся турели. Спектральная фильтрация позволяет повысить контрастность регистрируемого изображения. После блока 7 излучение вводится в камеру 8 (1024×1024, время экспозиции 40 мс - 10 мин.). Для снижения темновых токов (в среднем на 3 порядка) матрица камеры охлаждается до температуры  $-75^{\circ}\text{C}$ .

В режиме флуоресценции галогеновая лампа выключена. Вместо неё используется либо 4-модульный блок лазеров 10 (в настоящей работе использовались каналы излучения с длинами волн 488 нм и 561 нм), либо ртутная лампа. В обоих случаях используется волоконный ввод 11, а мощность каждого источника независимо управляется с компьютера (с шагом 0,1%). Фокусировка и согласование падающего излучения осуществляется в блоке 6 при помощи вращающегося диска с микролинзами, синхронизированного с диском Нипкова.

### Результаты исследований

Динамика развития остеобластов была исследована в модельной среде (в чашке Петри). Наблюдения проводились в течение нескольких суток с регистрацией изображений (в том числе серийных) в режиме конфокальной микроскопии. Характерный микроснимок остеобластов в модельной среде представлен на рис. 2. Размер микроснимка 370×370 мкм, достигнутое разрешение составляет 400 нм на пиксель.

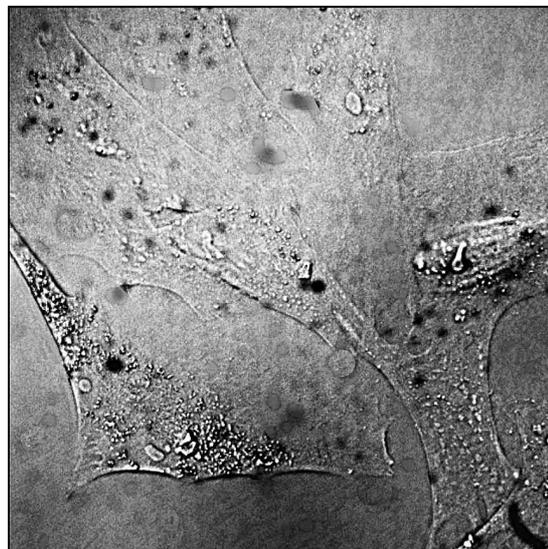


Рис. 2. Остеобласты в модельной среде в чашки Петри (размер снимка 370×370 мкм)

Полученные результаты позволили детально описать динамику развития остеобластов в модельной среде: через 2 часа после пересева большая часть их пристаёт ко дну чашки Петри и расплывается по нему; через сутки формируется неполный равномерный монослой, в котором клетки соединены своими отростками; на вторые сутки количество клеток увеличивается, отростками клетки соединяются друг с другом (рис. 2); дальнейший рост количества клеток приводит к формированию равномерного монослоя; на 6 сутки образуется полный монослой, а на 7 сутки происходит насыщение и процесс переходит в стационарную фазу. Развитие остеобластов в модельной среде характеризуется своими особенностями: клетки имеют значительно большую длину (50–100 мкм) и площадь сечения, чем в естественной среде, и образуют монослой. Вследствие этого изображение имеет низкую величину контраста – не более 0,2–0,3. Основное рассеяние даёт мембрана клетки и её ворсинки, что не позволяет должным образом визуализировать внутреннюю структуру клетки.

Переход в режим флуоресценции позволяет выделять не только клетки, но и обеспечить и визуализацию ядра и органелл клетки. Для реализации режима флуоресценции нами был использован флуорофор, который при введении в среду концентрировался в цитоплазме клеток и возбуждался на длине волны 561 нм (рис. 3). В силу того, что флуорофор концен-

трируется преимущественно в клетках, интенсивность фонового излучения на длине волны флуоресценции минимальна и контрастность изображения превышает 0,9. Хорошо видны отростки клеток, ядра, а также деление клеток (показано стрелкой). В отличие от красителей, традиционно используемых в гистологии, данный флуорофор не токсичен и позволяет детально исследовать динамику процессов. Так, для случая развития остеобластов в модельной среде измеренная скорость движения остеобластов составила 7 - 8 мкм/час.

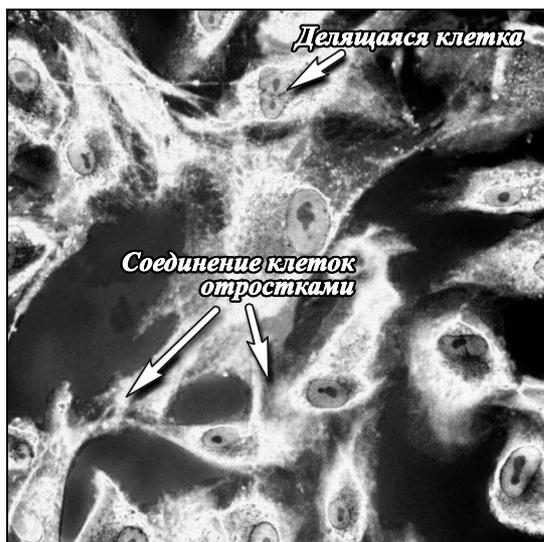


Рис. 3. Остеобласты в модельной среде в чашки Петри, 4 день (флуоресценция, размер снимка 370×370 мкм)

Отработанные на модельных средах режимы позволили перейти к исследованию интеграции остеобластов в костный имплантат. На рис. 4 представлен характерный микроснимок имплантата с остеобластами, полученный в режиме флуоресценции. Имплантат благодаря своей пористости тоже впитывает флуорофор, однако, несмотря на это, контраст изображения остаётся достаточно высоким (порядка 0,5 - 0,6) для уверенной визуализации остеобластов.

Анализ полученных микроснимков позволяет сделать вывод, что остеобласты активно интегрируют в костный имплантат (рис. 4), расселяясь преимущественно по его поверхности и формируя «колонии» вблизи выхода пор имплантата на его поверхность. Уже на восьмой день плотность активных остеобластов составляет 500 - 700 клеток/мм<sup>2</sup>.

Несомненным достоинством данного метода является возможность выявления именно активных остеобластов и возможность оценки скорости заселения остеобластами различных имплантатов в реальном масштабе времени. Это позволяет использовать данный метод для контроля и оптимизации условий изготовления и применения имплантатов.

#### Заключение

Показано, что метод конфокальной микроскопии позволяет осуществлять динамический контроль

процесса интеграции различных типов клеток в костный имплантат с разрешением не хуже 400 нм. Данный метод позволит проводить дооперационное тестирование и контроль различных имплантатов с прогнозированием его качества.

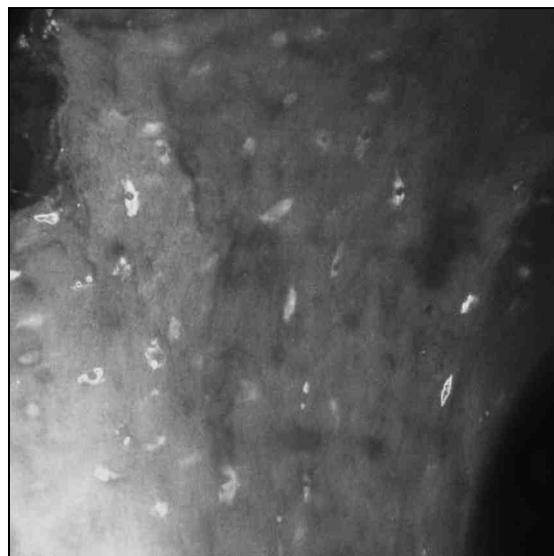


Рис. 4. Микроснимки интеграции остеобластов в костный имплантат спустя 8 дней (флуоресценция, размер снимка 370×370 мкм)

#### Благодарности

Работа выполнена при поддержке федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 - 2013 годы.

#### Литература

1. Воложин, А.И. Создание имплантационных материалов нового поколения на основе биостабильных композитов с костными клетками, полученными из стромальных клеток костного мозга / А.И. Воложин, Ю. И. Денисов-Никольский [и др.] // Наука городу Москве. – Издание Московского комитета по науке и технике, 2005. – Т. 2. – С. 36-40.
2. Шендеров, В.А. Особенности костного обрастания и крепления различных по конфигурации имплантатов в эксперименте / В.А. Шендеров, С. Виноградский, Ю.В. Мошковцев, Е.А. Шендерова // Травматол. и ортопед. России. – 1996. – № 2. – С. 33-37.
3. Данилов, Р.К. Жизнеспособность и гибель клеток в раневой гистогенезе / Р.К. Данилов, Г.Я. Графова, Ю.К. Хилова // Физиологические и клинические проблемы апоптоза: Труды ВМед; под ред. В.С. Новикова, В.П. Цыгана. – СПб.: 1998. – Т. 246. – С. 21-44.
4. Еськин, Н.А. Комплексная оценка повреждений и заболеваний мягких тканей и суставов. Дисс. д-ра мед. наук / Н.А. Еськин. – М., 2000.
5. Pochaev, V. A beginners guide to practical pitfalls in image acquisition / V. Pochaev // JCB. – 2006. – V. 172, N 1. – P. 9-18.
6. Robert, H. Webb Confocal optical microscopy / H. Webb Robert // Rep. Prog. Phys. – 1996. – N 59. – P. 427-471.
7. Kino, G.S. Confocal scanning optical microscopy / G.S. Kino, T.R. Corle // Phys. Today. – 1989. – N 42. – P. 55-62.

8. **Wilson, T.** Scanning optical microscopy / T. Wilson // Scanning. – 1985. – N 7. – P. 79-87.
  9. **Захаров, В.П.** Микроскопический контроль сеточных эксплантатов / В.П. Захаров, П.Е. Тимченко, И.А. Братченко // Сборник конкурсных докладов VIII Всероссийский молодёжный Самарский конкурс-конференция научных работ по оптике и лазерной физике (Самара, 17-20 ноября 2010 года). – Самара: Издательство «Самарский университет», 2010. – С. 155-161.
  10. **Sheppard, C.J.** The theory of the direct-view confocal microscope / C.J. Sheppard, T. Wilson // J. Microsc. – 1981. – V. 124. – P. 107-117.
- References**
1. **Volozhin, A.I.** Creation d'implantation materials of new generation on the basis of biostable composites with the bone cells received from stromalnuui of cells of a bone brain / A.I. Volozhin, U.I. Denisov-Nikolskii [et al.] // Science to town Moscow. – Publication of Moscow comitee of science and technical, 2005. – V. 2. – P. 36-40. – (In Russian).
  2. **Shenderov, V.A.** Features bone to acquire and fastenings various on a configuration implantant in experiment / V.A. Shenderov, S. Vinogradskii, U.V. Moshkovcev, E.A. Shenderova / Traumatology and orthopedy of Russia. – 1996. – N 2. – P. 33-37. – (In Russian).
  3. **Danilov, R.K.** Viability and destruction of cells in wound histogenesis / R.K. Danilov, G.Ya. Grafova, U.K. Hilova // Physiological and clinical problems apop-
  4. **Eskin, N.A.** A complex estimation of damages and diseases of soft fabrics and joints / N.A. Eskin // The dissertation of the doctor of medical sciences. – Moscow, 2000. – (In Russian).
  5. **Pochaev, V.** A beginners guide to practical pitfalls in image acquisition / V. Pochaev // JCB. – 2006. – V. 172, N 1. – P. 9-18.
  6. **Robert, H.** Webb Confocal optical microscopy / H. Webb Robert // Rep. Prog. Phys. – 1996. – N 59. – P. 427-471.
  7. **Kino, G.S.** Confocal scanning optical microscopy / G.S. Kino, T.R. Corle // Phys. Today, 1989. – N 42. – P. 55-62.
  8. **Wilson, T.** Scanning optical microscopy / T. Wilson // Scanning. – 1985. – N 7. – P. 79-87.
  9. **Zakharov, V.P.** The microscopic control net explants / V.P. Zakharov, P.E. Timchenko, I.A. Bratchenko // The collection of competitive reports VIII All-Russia youth Samara competition conference of scientific works on optics and laser physics (Samara, 17-20 November 2010). – Samara: Publishing «Samara university», 2010. – P. 155-161. – (In Russian).
  10. **Sheppard, C.J.** The theory of the direct-view confocal microscope / C.J. Sheppard, T. Wilson // J. Microsc. – 1981. – V. 124. – P. 107-117.

## DIAGNOSTICS OF BONE IMPLANT AND CONTROL OF THEIR PROCESS OSTEOINTEGRATION WITH OF A METHOD CONFOCAL MICROSCOPY

*P.E. Timchenko<sup>1</sup>, V.P. Zakharov<sup>1</sup>, L.T. Volova<sup>2</sup>, V.V. Boltovskaya<sup>2</sup>, E.V. Timchenko<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*S.P. Korolev Samara State Aero Space University (National Research University),*

<sup>2</sup>*University Experimental Medicine And Biotechnologies Institute of the Samara Medicine University*

### Abstract

Applicability confocal microscopy for the dynamic control of process integration of various types of cells in bone implant with wave length of 400 nanometers is shown. The quality estimation optical method of bone implant and their manufacturing technology is offered.

**Key words:** confocal microscopy, fluorescence, osteointegration, contrast, resolution.

### Сведения об авторах



**Тимченко Павел Евгеньевич**, 1983 года рождения. Кандидат физико-математических наук, научный сотрудник, ассистент кафедры радиотехнических устройств Самарского государственного аэрокосмического университета имени академика С.П. Королёва (национальный исследовательский университет). Область научных интересов – оптические методы диагностики, исследование взаимодействия низкоинтенсивного лазерного излучения с биологическими объектами, спектроскопия, трёхмерная визуализация многократно рассеивающих сред. Автор более 40 научных работ.

E-mail: [Timpavel@mail.ru](mailto:Timpavel@mail.ru).

**Pavel Evgenjevich Timchenko**, (b. 1983), Candidate of physical and mathematical sciences, scientist, the assistant of radio engineering devices department of S.P. Korolyov Samara State Aerospace University (National Research University). Main scientific interests: optical diagnostics methods, spectroscopy, 3D-visualisation of multi-scattering medias. He is the author of more than 40 scientific works.



**Захаров Валерий Павлович**, 1954 года рождения. Доктор физико-математических наук, профессор, заведующий кафедрой радиотехнических устройств Самарского государственного аэрокосмического университета имени академика С.П. Королёва (национальный исследовательский университет). Является специалистом в области фотоники, лазерной физики и техники, физики плазмы, оптики и биофизики. Область научных интересов – биоптоника, нелинейные процессы в лазерах, физика плазмы, физика газового разряда, нелинейная оптика, разработка лазеров и лазерных систем, медицинская лазерная техника. Под его руководством разработана серия лазерных медицинских установок. Автор более 100 научных работ, в том числе патентов РФ и других стран.

E-mail: [zakharov@ssau.ru](mailto:zakharov@ssau.ru).

**Valery Pavlovich Zakharov**, (b. 1954), Doctor of physical and mathematical sciences, professor, Head of radio engineering devices department of S.P. Korolyov Samara State Aerospace University (National Research University); specialist in photonics, laser physics and technique, physics of plasma, optics and biophysics. Main scientific interests: biophotonics, nonlinear processes in lasers, plasma physics, nonlinear optics, laser systems development and design, medical laser technique. Several laser medical devices were designed under his management. He is the author of more than 100 scientific works, including patents of the Russian Federation and other countries.



**Волова Лариса Теодоровна**, 1948 года рождения. Доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент Российской академии естествознания, директор центральной научно-исследовательской лаборатории Института экспериментальной медицины и биотехнологий Самарского государственного медицинского университета. Область её научных интересов – биоимплантаты, разработка способов оперативного лечения в травматологии, ортопедии, стоматологии, офтальмологии, оториноларингологии, тканевая и клеточная трансплантология. Под её руководством разработана серия лазерных медицинских установок. Автор более 100 научных работ, в том числе патентов РФ и других стран.

E-mail: [csrl.sam@mail.ru](mailto:csrl.sam@mail.ru).

**Larisa Teodorovna Volova**, (b. 1948), Doctor of medical sciences, professor, corresponding member of the Russian Academy of Natural Sciences, director of the central research laboratory of Experimental Medicine and Biotechnologies Institute of the Samara State Medical University. Main scientific interests: morphology, cellular and tissue biotechnology, tissue engineering, regenerative medicine in traumatology, orthopedy, stomatology, ophthalmology, otorhinolaryngology, bioethics. The author more 220 of scientific works, including more than 32 patents of the Russian Federation and other countries.

**Болтовская Виолетта Викторовна**, 1963 года рождения. Кандидат медицинских наук, научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории Института экспериментальной медицины и биотехнологий Самарского государственного медицинского университета. Область её научных интересов – биоимплантаты, разработка способов оперативного лечения в травматологии, ортопедии, стоматологии, офтальмологии, оториноларингологии, тканевая и клеточная трансплантология.

E-mail: [csrl.sam@mail.ru](mailto:csrl.sam@mail.ru).

**Violetta Viktorovna Boltovskaya**, (b. 1963), Candidate of medical sciences, scientist of the central research laboratory of Experimental Medicine and Biotechnologies Institute of the Samara State Medical University. Main scientific interests: bioimplantat, development of ways of operative treatment in traumatology, orthopedy, stomatology, ophthalmology, otorhinolaryngology, tissue and cellular transplantology.



**Тимченко Елена Владимировна**, 1982 года рождения. Кандидат физико-математических наук, научный сотрудник, ассистент кафедры экологии и безопасности жизнедеятельности Самарского государственного аэрокосмического университета имени академика С.П. Королёва (национальный исследовательский университет). Область научных интересов: оптические методы диагностики, исследование взаимодействия низкоинтенсивного лазерного излучения с биологическими объектами, экологический мониторинг, спектроскопия. Автор более 50 научных работ.

E-mail: [Vorobjeva.82@mail.ru](mailto:Vorobjeva.82@mail.ru).

**Elena Vladimirovna Timchenko**, (b. 1982), Candidate of physical and mathematical sciences, scientist, the assistant ecology and life safety department of the S.P. Korolyov Samara State Aerospace University (National Research University). Main scientific interests: optical diagnostics methods, research of interaction low laser radiation with biological objects, ecological monitoring, spectroscopy. She is the author of more than 50 scientific works.

Поступила в редакцию 1 апреля 2011 г.