



DOI: <http://dx.doi.org/10.15688/jvolsu11.2016.1.2>

УДК 576.7

ББК (P)54.58

КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ КОСТИ В ОТВЕТ НА ПОВЫШЕНИЕ ВНЕШНЕЙ НАГРУЗКИ И В УСЛОВИЯХ ОСТЕОИНТЕГРАЦИИ ТИТАНОВЫХ ИМПЛАНТАТОВ

Нуршат Миннулаевич Гайфуллин

Кандидат медицинских наук, доцент кафедры физиологии и общей патологии,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
gaifulin@ Rambler.ru
просп. Ломоносовский, д. 31, корп. 5, 119192 г. Москва, Российская Федерация

Аннотация. В экспериментах на 28 белых крысах изучали клеточный состав и иммуногистохимические маркеры ремоделирования бедренной кости, вызванного двумя процессами: повышенной нагрузкой на опорные ткани в результате перерезки передних крестообразных связок и после установки внутрикостных титановых имплантатов с трехмерной капиллярно-пористой биоактивной поверхностью. Процесс ремоделирования прослежен через 4, 8 и 12 недель с момента начала эксперимента. Костную ткань исследовали с помощью классических методов гистологии и морфометрии, а также выявляли в области ремоделирования экспрессию остеоонектина, кислой фосфатазы, матриксных металлопротеиназ ММР-2, ММР-9 и их тканевого ингибитора ТИМР-1. В результате исследования установлено, что ремоделирование кости, вызванное установкой имплантатов с пористой биоактивной поверхностью, по своей интенсивности и динамике превосходило аналогичный процесс в условиях повышенной нагрузки на кость после перерезки передней крестообразной связки. Это свидетельствует о высоком остеоиндуктивном эффекте биоактивного покрытия, позволяющего не только достичь полной остеointegrации, но и стимулировать процесс интенсивного ремоделирования прилегающей губчатой кости. В его развитии ремоделирования в этих условиях показано совместное участие клеточных популяций остеобластов/остеоцитов, остеокластов и эндотелиальных клеток с характерным параллельным увеличением экспрессии матриксных металлопротеиназ ММР-2, ММР-9 и их тканевого ингибитора ТИМР-1.

Ключевые слова: кость, внутрикостные имплантаты, остеоциты, остеокласты, матриксные металлопротеиназы, кислая фосфатаза, остеоцитарное ремоделирование.

гически активных медиаторов, часть из которых поступает также из прилегающего костного мозга [3; 14; 15; 21].

Изменения массы тела, типа нагрузок при перемене образа жизни, последствия травм или заболеваний опорно-двигательного аппарата, нервной или мышечной системы существенно изменяют механическую нагрузку на отдельные кости (или части костей), что должно сопровождаться запуском механизмов динамического ремоделирования [17; 19; 25].

Одним из бурно развивающихся направлений современной медицины является восстановительная хирургия костей и суставов, основанная на использовании биомиметичных протезов. Современные внутрикостные имплантаты, помимо полной биосовместимости, за счет наличия биоактивной трехмерно-пористой поверхности, обладают комплексом остеоиндуктивных и остеокондуктивных свойств, что обеспечивает влияние на костную ткань не только непосредственно у контактной поверхности, но и в прилегающей ткани [4; 11; 12; 24; 26]. Отдельным механизмом, стимулирующим ремоделирование, становится иная передача прямых и рассеянных нагрузок имплантатом, в сравнении с аналогичным по объему участком костной ткани. Изучение биологической роли такого влияния на кость в условиях длительного функционирования имплантатов только начинается [16; 20; 23].

Цель работы

Изучить и сопоставить состав и свойства клеток в зоне ремоделирования костной ткани, индуцированного повышенной внешней нагрузкой и наличием материала с высокими остеогенными свойствами биоактивной поверхности.

Материал и методы исследования

Материалом для исследований послужили образцы тканей бедренной кости 28 белых крыс-самцов линии Wistar массой 220–290 г. Протокол экспериментов соответствовал этическим нормам, изложенным в «Правилах работ с использованием экспериментальных животных», Хельсинской декларации (2000) и Директивах Европейского сообщества 86/

609 ЕЕС. Все болезненные манипуляции и операции проводили при необходимом уровне обезболивания (Золетил в дозе 40 мг/кг массы внутривенно), выведение животных из эксперимента – пятикратной передозировкой того же препарата.

Повышенную механическую нагрузку на суставную поверхность и прилегающий эпифиз бедренной кости в первой экспериментальной группе вызывали путем перерезки обеих передних крестообразных связок (ПКС) обоих коленных суставов [22] у 12 животных. Для изучения ремоделирования кости в динамике остеоинтеграции во второй экспериментальной группе 12 крысам устанавливали в дистальные эпифизы бедренных костей титановые имплантаты. Стержни длиной до 4 мм и диаметром 1,2 мм имели трехмерное капиллярно-пористое (ТКП) биоактивное покрытие с дополнительным биокерамическим слоем толщиной 10 до 40 мкм, созданное с помощью микродугового оксидирования в Институте металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН [2]. Адгезивные свойства и наличие пор размером 150–250 мкм обеспечивали имплантатам высокую способность к остеоинтеграции [4; 5]. По четыре животных в каждой группе выводили из эксперимента спустя 4, 8 и 12 недель от начала эксперимента. В качестве контрольных были исследованы 8 образцов тканей бедренной кости четырех крыс, находящихся все время эксперимента в стандартных условиях того же вивария.

Для исследования использовали сертифицированное гистологическое оборудование – аппарат для проводки Microm STP 420 (Microm, Германия), модульную систему заливки Leica EG 1160 (Leica, Германия), ротационный микротом Leica RM 2255 (Leica, Германия), коверстейнер Dako (Dako, Дания), иммуногистостейнер Dako Link 48 (Dako, Дания), микроскоп Leica DM 6000B с цифровой камерой Leica DFC50C (Leica, Германия). Имидж-анализ проводили с помощью программы «ImageJ» (США).

Костные фрагменты фиксировали в 10 % забуференном нейтральном формалине в течение 24 ч, промывали 6 ч в проточной водопроводной воде при комнатной температуре. Гистологические препараты приготавливали после декальцинации в растворе «Cal-Ex®»

(Fisher Scientific, Германия) в течение 18–20 ч, окрашивали гематоксилином и эозином, трихром по Массону [13]. При гистоморфометрии определяли среднюю толщину кортикального слоя кости (мкм), среднюю толщину (мкм) и объемную долю (%) костных трабекул в губчатой кости. В серии с внутрикостными имплантатами ткань исследовали не ближе, чем в 1 мм от места их установки.

Иммуногистохимическое исследование проводили с использованием моноклональных антител производства Leica Biosystems – Novocastra (Germany): к маркеру клеток остеогенного ряда остеонектину (NCL O-nectin, 15G12), маркеру остеокластов тартрат-резистентной кислой фосфатазе (NCL-TRAP), маркеру эндотелиальных клеток CD-31 (NCL-CD31-1A10), матриксным металлопротеиназам MMP-2 (NCL-MMP2-507) и MMP-9 (MMP9-439), а также их тканевому ингибитору TIMP-1 (NCL-TIMP1-485). Все этапы проводили в соответствии с протоколами про-

изводителей, использовали вариант микроволновой температурной демаскировки антигенов, позитивные и негативные контроли антигенов, а также негативные контроли антител. Типичные визуализации клеток после их иммуногистохимического типирования в зоне остеоинтеграции приведены на рисунке 1.

Подсчитывали численную плотность иммунопозитивных клеток в ткани, результаты выражали в $1/\text{мкм}^3$ (экспрессию CD31 оценивали как показатель васкуляризации, численно равный удельной площади в процентах, занимаемой иммунопозитивным материалом). Все морфометрические определения проводили в двух препаратах от одного образца кости в пяти полях зрения, весь статистический массив по каждой выборке включал в себя от 50 до 60 измерений.

Обработку количественных данных проводили с помощью программы Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США) с учетом общепринятых требований для медико-биологических иссле-

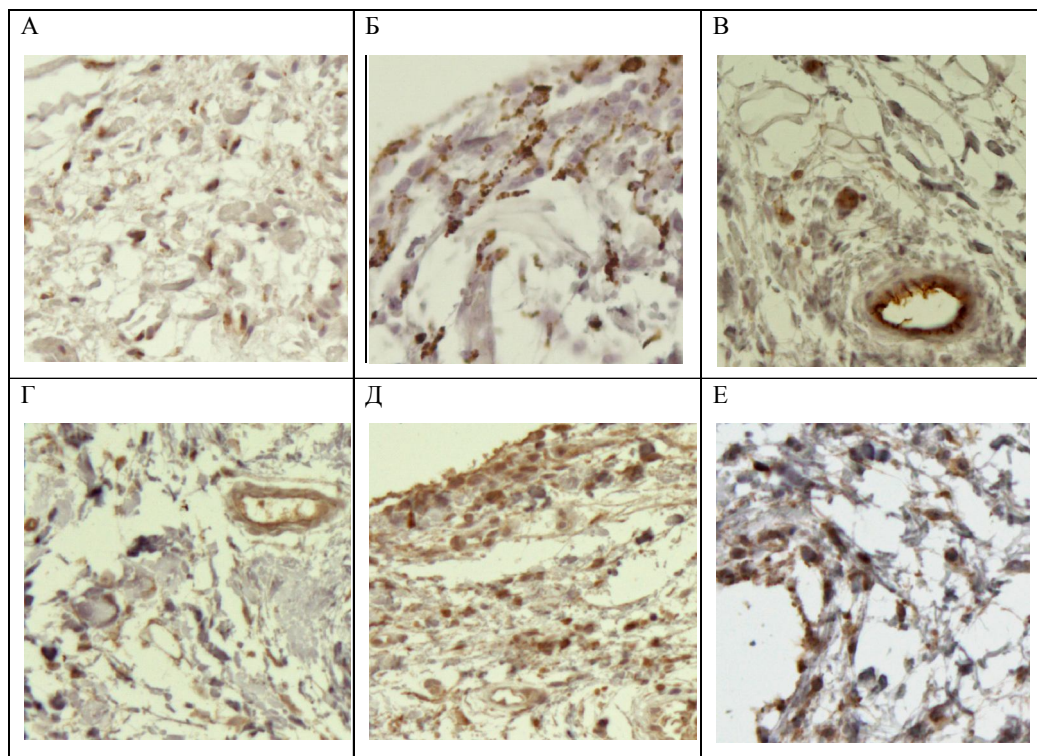


Рис. 1. Клетки регенерата в области остеоинтеграции титановых имплантатов с биоактивной поверхностью на 4-й неделе после установки в бедренную кость крыс. А. Остеонектин-позитивные остеоциты. Б. Экспрессия тартрат-резистентной кислой фосфатазы в остеокластах. В. Сосуды, визуализированные за счет экспрессии CD31 в эндотелиальных клетках. Г. Небольшая часть остеобластов и остеокласты экспрессируют MMP-2. Д. Большинство остеобластов MMP-9-позитивны. Е. Экспрессия TIMP-1 обнаруживается в небольших группах остеогенных клеток. Непрямой иммунопероксидазный метод. Ув. съемки 300

дований. Поскольку с помощью критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка было выявлено отсутствие нормальности распределения полученных параметров, для статистической обработки были использованы непараметрические критерии. Распределение в группах выражали в виде медианы Me и интервала между первым и третьим квартилем $[Q1 \div Q3]$. При сравнении результатов на разных сроках эксперимента с контролем использовали непараметрический критерий Фридмана для множественных групп ($p < 0,01$), для анализа различий между опытными группами – непараметрический критерий Манна – Уитни ($p < 0,01$).

Результаты исследования

В первой экспериментальной группе при микроскопическом исследовании костная ткань на 4-й неделе после начала эксперимента имела обычное строение. К 8-й неделе пластинка компактной кости также не претерпевала каких-либо изменений, но в губчатой кости выявлялось умеренное увеличение толщины и плотности костных балок без нарушений трехмерной их организации. В части костных балок выявлялись признаки ремоделирования в виде появления групп остеокластов и признаков остеокластической резорбции матрикса, а также цепочки остеобластов по краям костных балок. На 12-й неделе эксперимента толщина кортикальной пластинки отчетливо увеличивалась, параллельно уменьшались размеры лакун губчатой кости. Ремоделирование губчатой кости вблизи эпифизов, то есть в наиболее нагружаемых участках кости, сопровождалось небольшим увеличением васкуляризации кости, которая в этих участках приобретала мозаичное строение с чередованием участков уплотнения и остеопороза.

Во второй группе на 4-й неделе эксперимента вокруг имплантатов обнаруживали тонкий слой рыхлой соединительной ткани, богатой сосудами с очагами остеогенеза и немногочисленными остеогенными участками. В прилежащей губчатой кости выявлялись небольшие участки остеокластической резорбции и цепочки остеобластов по краям костных балок, что свидетельствовало об активной перестройке костной ткани. К 8-й неделе

ткань вокруг имплантата представляла собой смешанный регенерат, в котором преобладала грубоволокнистая костная ткань с концентрическим направлением волокон вокруг имплантата. Глубокие слои регенерата без четких границ переходили в прилежащую губчатую кость с признаками активного ремоделирования. На завершающем сроке эксперимента вокруг титановых имплантатов была сформирована плотная зона остеоинтеграции, прилежащая губчатая кость была представлена плотной упаковкой костных балок с признаками остеогенного ремоделирования.

Показатели количественного морфологического исследования приведены на рисунках 2–4.

Как перевязка ПКС, так и установка имплантатов с ТКП биоактивным покрытием сопровождалась увеличением толщины кортикального слоя бедренной кости, более динамично развивающимся в первой группе (рис. 2А). Средняя толщина и объемная доля трабекул в губчатой кости, напротив, более интенсивно увеличивались во второй группе (рис. 2Б, 2В).

Перерезка ПКС сопровождалась монотонным приростом популяции остеогенных клеток в губчатой кости (на 18,2 % к 16-й неделе эксперимента, $p < 0,01$). В серии с установкой имплантатов с ТКП биоактивным покрытием этот прирост был более динамичным, интенсивным (на 55,9 % к 8-й неделе эксперимента, $p < 0,01$) и сопровождался последующим снижением числа остеобластов и остеоцитов в губчатой кости (рис. 3А).

Динамика менее многочисленной популяции остеокластов имела сходные характеристики, но пик их численности во второй группе был более интенсивным и приходился на 4-ю неделю с момента постановки имплантатов (рис. 3Б). Ремоделирование кости сопровождалось умеренным повышением показателя васкуляризации: в первой группе с максимумом на 4-й неделе (на 37,1 %, $p < 0,01$), во второй группе – на 4–8-й неделях (на 71,4 %, $p < 0,01$) (рис. 3В).

После перерезки ПКС в костной ткани наблюдалось увеличение числа клеток, экспрессирующих ММР-2 и ММР-9 с максимумом на 8-й неделе эксперимента (на 86,8 % и 37,0 % соответственно, оба $p < 0,01$). В группе с установкой имплантатов максимум

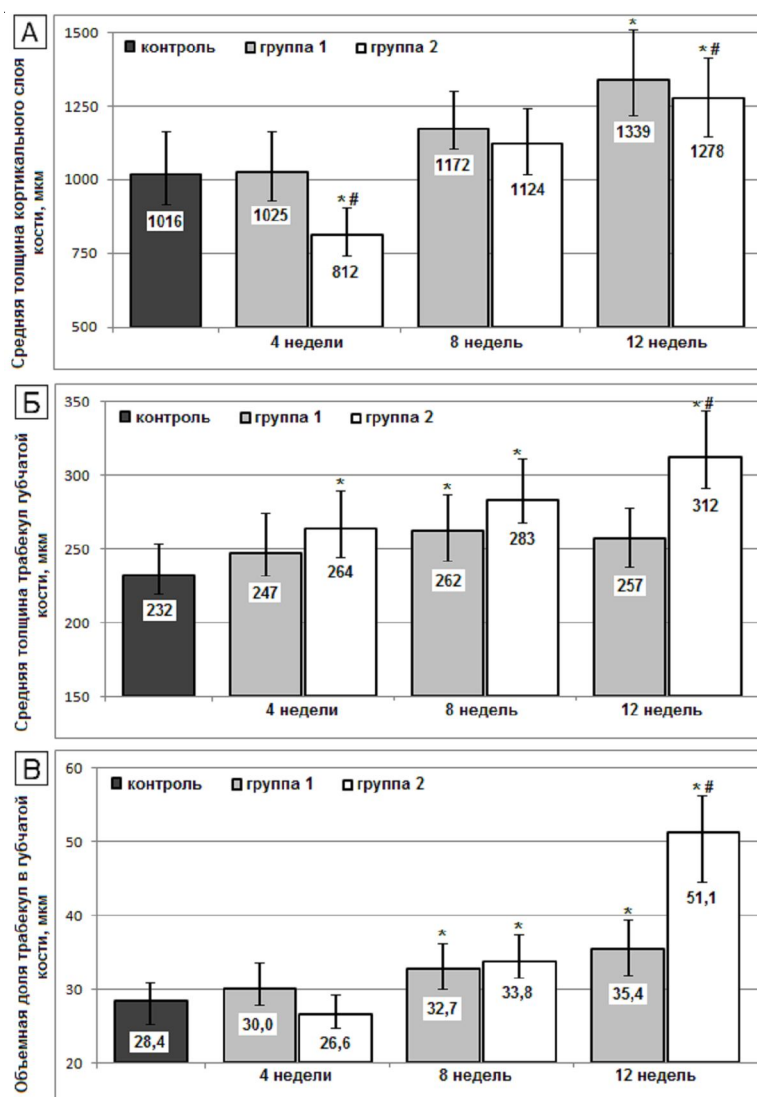


Рис. 2. Средняя толщина кортикального слоя (А), средняя толщина (Б) и объемная доля трабекул (В) в бедренной кости крыс после перерезки передних крестообразных связок (1-я группа) и после установки внутрикостных титановых имплантатов с биоактивным покрытием (2-я группа). Высота столбцов – медиана; вертикальные отрезки – квартильный интервал $Q1 \div Q3$; * – достоверные различия с величиной показателя в контрольной группе (критерий Фридмана, $p < 0,01$); # – достоверные различия между показателями в экспериментальных группах (критерий Манна – Уитни, $p < 0,01$)

подъема MMP-2 и MMP-9 приходился на 4-ю неделю, и был выше по амплитуде (на 142,1 % и 125,0 % соответственно, оба $p < 0,01$). Количество клеток, экспрессирующих TIMP-1, было не столь велико, в обеих группах для них была характерна та же динамика (рис. 4).

Как известно, изменение условий функционирования кости сопровождается активацией тканевого ремоделирования, которое протекает с участием нескольких процессов, за каждый из которых отвечает специализированная клеточная популяция [1; 18]. Обнаруженные нами изменения, вызванные в данном

случае повышением механической нагрузки на дистальный эпифиз кости или путем установки имплантата с биоактивной поверхностью, свидетельствуют о развитии такого ремоделирования в виде увеличения толщины кортикального слоя и утолщения трабекул губчатой кости. Количественными характеристиками, указывающими на механизмы процесса ремоделирования, выступают содружественный прирост клеточных популяций, повышение экспрессии матриксных металлопротеиназ MMP-2, MMP-9 и TIMP-1, а также увеличение васкуляризации ткани.

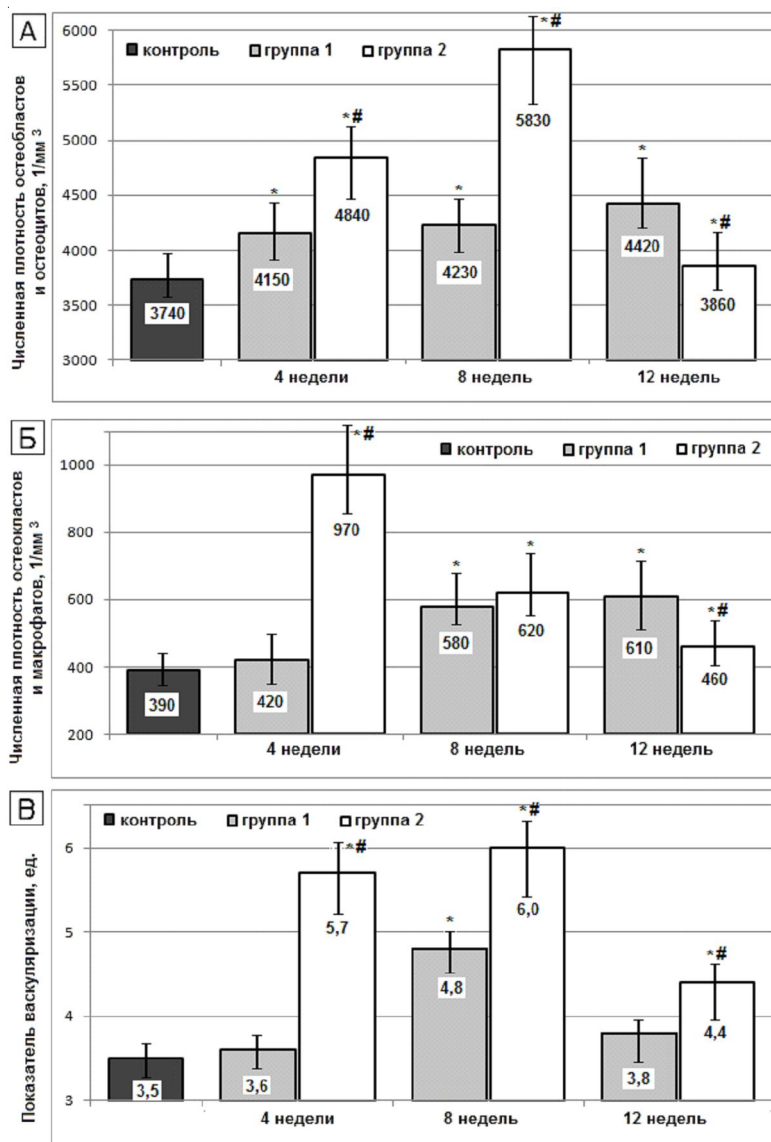


Рис. 3. Численная плотность остеоцитов и остеобластов (А), остеокластов (Б) и показатель васкуляризации (В) в бедренной кости крыс после перерезки передних крестообразных связок (1-я группа) и после установки внутрикостных титановых имплантатов с биоактивным покрытием (2-я группа). Обозначения, как на рисунке 2

В этом комплексе процессов ММР-2 и ММР-9, к секреции которых способны макрофаги, остеокласты и молодые клетки остео- и хондрогенного ряда, призваны растворять низкоминерализованные компоненты матрикса регенерирующих опорных тканей. Этим обеспечивается возможность доступа новых остеогенных клеток, а также эндотелия в зону. Матриксные металлопротеиназы также участвуют в балансе цитокинов и факторов роста в зоне ремоделирования [8; 10; 18]. Высокая активность TIMP-1 на этом этапе необходима для обеспечения очеред-

ности смены фаз отдельных клеточных популяций [11].

В результате исследования получены доказательства усиленного ремоделирования ткани не только непосредственно в зоне остеоинтеграции, но и в прилегающей губчатой кости. По своей интенсивности и динамике оно превосходило аналогичный процесс в условиях повышенной нагрузки на кость после перерезки ПКС. Совершенно очевидно, что остеоиндуктивный эффект титановых имплантатов с биоактивной ТКП поверхностью распространяется достаточно далеко за пределы соб-

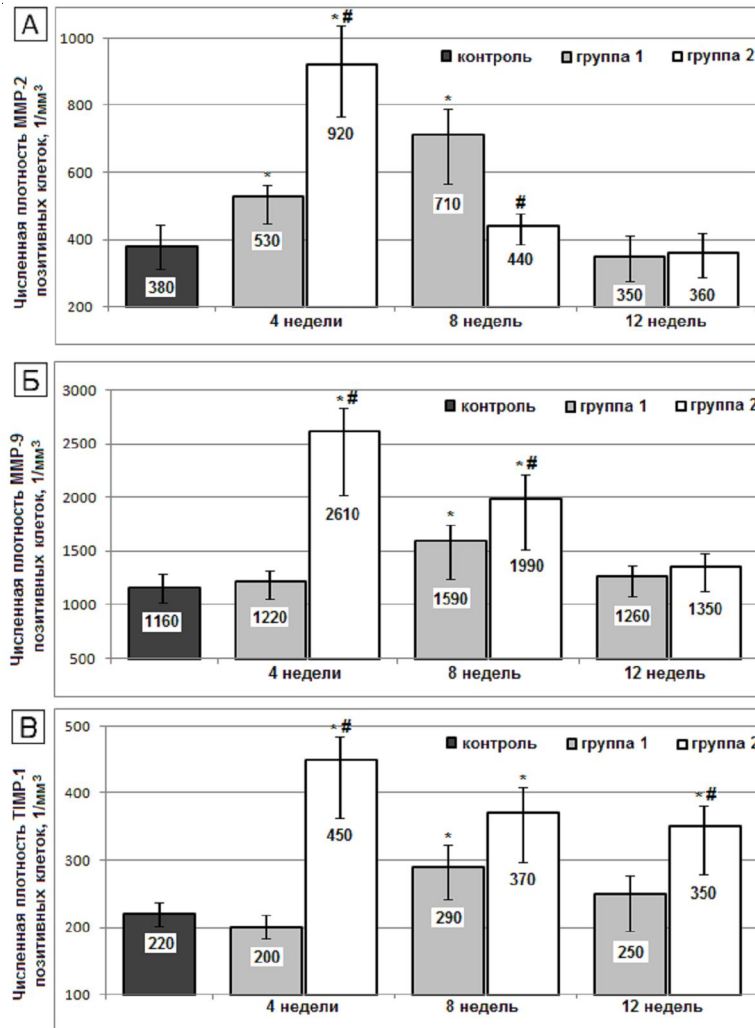


Рис. 4. Численная плотность ММР-2- (А), ММР-9- (Б) и ТИМР-1- позитивных клеток (В) в бедренной кости крыс после перерезки передних крестообразных связок (1-я группа) и после установки внутрикостных титановых имплантатов с биоактивным покрытием (2-я группа). Обозначения, как на рисунке 2

ственно зоны остеоинтеграции, что вызывает ремоделирование прилегающей губчатой кости и необходимую адаптацию к новым амплитудам и векторам нагрузок [9; 26].

Заключение

Полученные результаты экспериментов свидетельствуют о том, что при постановке в кость лабораторных животных титановых имплантатов с трехмерным капиллярно-пористым биоактивным покрытием наблюдается высокий остеоиндуктивный эффект, в результате чего улучшаются не только морфологические показатели остеоинтеграции, но запускается процесс интенсивного ремоделирования прилегающей губчатой кости. В его раз-

витии принимают совместное участие популяции остеобластов/osteоцитов, остеокластов и эндотелиальных клеток. Для процесса ремоделирования кости в этих условиях характерно параллельное увеличение экспрессии матричных металлопротеиназ ММР-2, ММР-9 и их тканевого ингибитора ТИМР-1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аврунин, А. С. Остеоцитарное ремоделирование костной ткани: история вопроса, морфологические маркеры / А. С. Аврунин, Р. М. Тихилов // Морфология. – 2011. – № 1. – С. 86–94.
2. Калита, В. И. Плазменные покрытия с нанокристаллической и аморфной структурой : монография / В. И. Калита, Д. И. Комлев. – М. : Лидер М, 2008. – 388 с.

3. Лычкова, А. Э. Нервная регуляция метаболизма костной ткани / А. Э. Лычкова // Вестник РАМН. – 2011. – № 3. – С. 42–47.

4. Модификация поверхностей внутрикостных имплантатов: современные исследования и нанотехнологии / В. И. Калита, Д. А. Маланин, В. А. Мамаева [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2009. – № 4. – С. 17–22.

5. Структура и сдвиговая прочность имплантатов с плазменными покрытиями / В. И. Калита, А. И. Мамаев, В. А. Мамаева [и др.] // Физика и химия обработки материалов. – 2015. – № 6. – С. 30–46.

6. Bessa, P. C. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts) / P. C. Bessa, M. Casal, R. L. Reis // J. Tissue Eng. Regen. Med. – 2008. – Vol. 2, iss. 2–3. – P. 1–13.

7. Brewa, K. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity / K. Brewa, H. Nagaseb // Biochim. Biophys. Acta. – 2010. – Vol. 1803, № 1. – P. 55–71.

8. Chang, P. C. Evaluation of functional dynamics during osseointegration and regeneration associated with oral implants: a review / P. C. Chang, N. P. Lang, W. V. Giannobile // Clin. Oral Implants Res. – 2010. – Vol. 21, № 1. – P. 1–12.

9. Contribution of mineral to bone structural behavior and tissue mechanical properties / E. Donnelly, D. X. Chen, A. L. Boskey [et al.] // Calcif. Tissue Int. – 2010. – Vol. 87, № 5. – P. 450–460.

10. Different phenotype of chondrocytes in articular cartilage: mapping, possible mechanisms, and impact to implant healing / V. V. Novochadov, K. A. Bovol'skaya, S. A. Lipnitskaya [et al.] // Eur. J. Mol. Biotech. – 2014. – № 4. – P. 210–222.

11. Early bone healing onto implant surface treated by fibronectin/oxysterol for cell adhesion/osteogenic differentiation: *in vivo* experimental study in dogs / J. S. Lee, J. H. Yang, J. Y. Hong [et al.] // J. Periodontal Implant Sci. – 2014. – Vol. 44, № 5. – P. 242–250.

12. Functionalized mesoporous bioactive glass scaffolds for enhanced bone tissue regeneration / X. Zhang, D. Zeng, N. Li [et al.] // Sci Rep. – 2016. – Vol. 6. – P. 19361.

13. Handbook of histology methods for bone and cartilage / ed. by Y. H. An and K. L. Martin. – N. Y. : Humana Press, 2003. – 587 p.

14. Immunoregulation of bone remodeling / A. Singh, A. A. Mehdi, R. N. Srivastava, N. S. Verma // Int. J. Crit. Illn. Inj. Sci. – 2012. – Vol. 2, № 2. – P. 75–81.

15. Kamiya, N. New insights on the roles of BMP signaling in bone – a review of recent mouse genetic

studies / N. Kamiya, Y. Mishina // Biofactors. – 2011. – Vol. 37, № 2. – P. 75–82.

16. Martínez-Reina, J. On the use of bone remodeling models to estimate the density distribution of bones. Uniqueness of the solution / J. Martínez-Reina, J. Ojeda, J. Mayo // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, № 2. – P. 0148603.

17. Microstructure and nanomechanical properties in osteons relate to tissue and animal age / J. Burket, S. Gourion-Arsiquaud, L. M. Havill [et al.] // J. Biomech. – 2011. – Vol. 44, № 2. – P. 277–284.

18. Molecular changes indicative of cartilage degeneration and osteoarthritis development in patients with anterior cruciate ligament injury / I. Papathanasiou, S. Michalitsis, M. E. Hantes [et al.] // BMC Musculoskelet. Disord. – 2016. – Vol. 17. – P. 21.

19. Parry, S. M. The impact of extended bed rest on the musculoskeletal system in the critical care environment / S. M. Parry, Z. A. Puthucherry // Extrem. Physiol. Med. – 2015. – Vol. 4. – P. 16.

20. Salmon, P. Editorial: Putting the “Why” back into bone “archytecture” / P. Salmon // Front. Endocrinol. (Lausanne). – 2016. – Vol. 7. – P. 14.

21. Scarfi, S. Use of bone morphogenetic proteins in mesenchymal stem cell stimulation of cartilage and bone repair / S. Scarfi // World J. Stem. Cells. – 2016. – Vol. 8, № 1. – P. 1–12.

22. Shen, J. Recent progress in osteoarthritis research / J. Shen, D. Chen // J. Am. Acad. Orthop. Surg. – 2014. – Vol. 22, № 7. – P. 467–468.

23. The effect of age, gender, and insertion site on marginal bone loss around endosseous implants: results from a 3-year trial with Premium Implant System // M. Negri, C. Galli, A. Smerieri [et al.] // Biomed. Res. Int. – 2014. – P. 369051.

24. The influence of thread geometry on implant osseointegration under immediate loading: a literature review / H. S. Ryu, C. Namgung, J. H. Lee, Y. J. Lim // J. Adv. Prosthodont. – 2014. – Vol. 6, № 6. – P. 547–554.

25. Yun, M. H. Changes in regenerative capacity through lifespan / M. H. Yun // Int. J. Mol. Sci. – 2015. – Vol. 16, № 10. – P. 25392–25432.

26. Zekiy, A. O. Molecular approaches to functionalization of dental implant surfaces / A. O. Zekiy // Eur. J. Mol. Biotech. – 2015. – № 4. – P. 228–240.

REFERENCES

1. Avrunin A.S., Tikhilov R.M. Osteotsitarnoe remodelirovanie kostnoy tkani: istoriya voprosa, morfologicheskie marker [Osteocytic Bone Remodeling: Natural History and Morphological Markers]. *Morfologiya*, 2011, no. 1, pp. 86–94.

2. Kalita V.I., Komlev D.I. *Plazmennyye pokrytiya s nanokristallicheskoj i amorfnoy strukturoj: monografiya* [Plasma Coatings With Nano-Crystalline and Amorphous Structure: Monograph]. Moscow, Lider M Publ., 2008. 388 p.
3. Lychkova A.E. Nervnaya regulyatsiya metabolizma kostnoy tkani [Neuronal Regulation of Bone Metabolism]. *Vestnik RAMN*, 2011, no. 3, pp. 42-47.
4. Kalita V.I., Malanin D.A., Mamaeva V.A., et al. Modifikatsiya poverkhnostey vnutrikostnykh implantatov: sovremennyye issledovaniya i nanotekhnologii [Modification of Intraosseal Implants Surfaces: Current Research and Nanotechnologies]. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*, 2009, no. 4, pp. 17-22.
5. Kalita V.I., Mamaev A.I., Mamaeva V.A., et al. Struktura i sdvigovaya prochnost implantatov s plazmennymi pokrytiyami [Structure and Shear Strength of Implants With Plasma Coatings]. *Fizika i khimiya obrabotki materialov* [Physics and Chemistry of Materials Treatment], 2015, no. 6, pp. 30-46.
6. Bessa P.C., Casal M., Reis R.L. Bone Morphogenetic Proteins in Tissue Engineering: the Road From the laboratory to the Clinic, Part I (Basic Concepts). *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 2008, vol. 2 (2-3), pp. 1-13.
7. Brewa K., Nagase H. The Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs): An Ancient Family With Structural and Functional Diversity. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, vol. 1803 (1), pp. 55-71.
8. Chang P.C., Lang N.P., Giannobile W.V. Evaluation of Functional Dynamics During Osseointegration and Regeneration Associated With Oral Implants: a Review. *Clin. Oral Implants Res.*, 2010, vol. 21 (1), pp. 1-12.
9. Donnelly E., Chen D.X., Boskey A.L., Baker S.P. Contribution of Mineral to Bone Structural Behavior and Tissue Mechanical Properties. *Calcif. Tissue Int.*, 2010, vol. 87 (5), pp. 450-460.
10. Novochadov V.V., Bovolskaya K.A., Lipnitskaya S.A., Perevalova E.V., Shuvalova E.Yu., Zagrebina Z.N., Zaytzev V.G. Different Phenotype of Chondrocytes in Articular Cartilage: Mapping, Possible Mechanisms, and Impact to Implant Healing. *Eur. J. Mol. Biotech.*, 2014, no. 4, pp. 210-222.
11. Lee J.S., Yang J.H., Hong J.Y., Jung U.W., Yang H.C., Lee I.S., Choi S.H. Early Bone Healing Onto Implant Surface Treated by Fibronectin/Oxysterol for Cell Adhesion/Osteogenic Differentiation: in Vivo Experimental Study in Dogs. *J. Periodontal Implant Sci.*, 2014, vol. 44 (5), pp. 242-250.
12. Zhang X., Zeng D., Li N., Wen J., Jiang X., Liu C., Li Y. Functionalized Mesoporous Bioactive Glass Scaffolds for Enhanced Bone Tissue Regeneration. *Sci Rep.*, 2016, vol. 6, p. 19361.
13. An Y.H., Martin K.L. (ed.). *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. New York, Humana Press., 2003. 587 p.
14. Singh A., Mehdi A.A., Srivastava R.N., Verma N.S. Immunoregulation of Bone Remodeling. *Int. J. Crit. Illn. Inj. Sci.*, 2012, vol. 2 (2), pp. 75-81.
15. Kamiya N., Mishina Y. New Insights on the Roles of BMP Signaling in Bone – a Review of Recent Mouse Genetic Studies. *Biofactors*, 2011, vol. 37 (2), pp. 75-82.
16. Martínez-Reina J., Ojeda J., Mayo J. On the Use of Bone Remodeling Models to Estimate the Density Distribution of Bones. Uniqueness of the Solution. *PLoS One.*, 2016, vol. 11 (2), p. 0148603.
17. Burket J., Gourion-Arsiquaud S., Havill L.M., Baker S.P., Boskey A.L., van der Meulen M.C.H. Microstructure and Nanomechanical Properties in Osteons Relate to Tissue and Animal Age. *J. Biomech.*, 2011, vol. 44 (2), pp. 277-284.
18. Papathanasiou I., Michalitsis S., Hantes M.E., Vlychou M., Anastasopoulou L., Malizos K.N., Tsezou A. Molecular Changes Indicative of Cartilage Degeneration and Osteoarthritis Development in Patients With Anterior Cruciate Ligament Injury. *BMC Musculoskelet. Disord.*, 2016, vol. 17, p. 21.
19. Parry S.M., Puthuchery Z.A. The Impact of Extended Bed Rest on the Musculoskeletal System in the Critical Care Environment. *Extrem. Physiol. Med.*, 2015, vol. 4, p. 16.
20. Salmon P. Editorial: Putting the “Why” Back Into Bone “architecture”. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2016, vol. 7, p. 14.
21. Scarfi S. Use of Bone Morphogenetic Proteins in Mesenchymal Stem Cell Stimulation of Cartilage and Bone Repair. *World J. Stem. Cells*, 2016, vol. 8 (1), pp. 1-12.
22. Shen J., Chen D. Recent Progress in Osteoarthritis Research. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, 2014, vol. 22 (7), pp. 467-468.
23. Negri M., Galli C., Smerieri A., Macaluso G.M., Manfredi E., Ghiacci G, Toffoli A., Bonanini M., Lumetti S. The Effect of Age, Gender, and Insertion Site on Marginal Bone Loss Around Endosseous Implants: Results From a 3-year Trial With Premium Implant System. *Biomed Res. Int.*, 2014, p. 369051.
24. Ryu H.S., Namgung C., Lee J.H., Lim Y.J. The Influence of Thread Geometry on Implant Osseointegration Under Immediate Loading: a Literature Review. *J. Adv. Prosthodont*, 2014, vol. 6 (6), pp. 547-554.
25. Yun M.H. Changes in Regenerative Capacity Through Lifespan. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, vol. 16 (10), pp. 25392-25432.
26. Zekiy A.O. Molecular Approaches to Functionalization of Dental Implant Surfaces. *Eur. J. Mol. Biotech.*, 2015, no. 4, pp. 228-240.

**CELLULAR MECHANISMS OF BONE REMODELING
DUE TO EXTERNAL OVERLOAD AND TO THE CONDITIONS
OF TITAN IMPLANT OSSEOINTEGRATION**

Nurshat Minnullaevich Gayfullin

Candidate of Medical Sciences, Associate Professor,
Department of Physiology and General Pathology,
Lomonosov Moscow State University
gaifulin@rambler.ru
Prosp. Lomonosovskiy, 31/5, 119192 Moscow, Russian Federation

Abstract. The goal of the article consists in describing the remodeling of the femur caused by two processes: the increased strain on supporting tissue as a result of anterior cruciate ligament transection and stimulation by installation of endosseous titanium implants with a porous bioactive coating. The process is traced through 4, 8 and 12 weeks in 28 adult Wistar rats. To characterize the bone remodeling the classical methods of histology and morphometry as well as immune histochemistry to reveal osteonectin, tartrate-resistant acid phosphatase, endothelial marker CD31, matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and its tissue inhibitor TIMP-1, were used with necessary morphometrics. The study showed for bone remodelling caused by implants with a porous bioactive coating, to be superior to a similar process under conditions of overload on the bone after transection of the anterior cruciate ligament by its intensity and dynamics. This indicates a high osteoinductive effect of bioactive coating that allows not only to achieve full osseointegration, but also to stimulate a process of intensive remodeling of adjacent cancellous bone. The cooperative participation of cell populations as osteoblasts/osteocytes, osteoclasts, and endothelial cells with characteristic parallel intensive expression of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and their tissue inhibitor TIMP-1, used to be main characteristics of bone remodeling in these conditions.

Key words: bone, intraosseous implants, osteocytes, osteoclasts, matrix metalloproteinases, acid phosphatase, osteocytic remodeling.