

УДК 616.71-089.844

## ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ ЧЕРЕПА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ ИМПЛАНТОВ

Нестеров А.В., Павлова Т.В., Павлова Л.А. Немыкин О.Н., Бокова Е.Н.

ГОУ ВПО «Белгородский государственный университет», Белгород, e-mail: nesterov\_a@bsu.edu.ru

В эксперименте нами показано, что после трепанации черепа регенерация плоских костей осуществлялась в полном объеме лишь при наличии подложки из наноимпланта, но наиболее полно этот процесс происходил в группе с нанокомпозитом (нанотитан, желатин, гидроксиапатит и коллаген). В группе с ложнопериоперированными животными полного восстановления целостности костей свода черепа не происходило.

**Ключевые слова:** регенерация, наноструктурированные импланты, череп

## FEATURES BONE REGENERATION SKULLS FROM THE USE OF NANOSTRUCTURED IMPLANTS

Nesterov A.V., Pavlova T.V., Pavlova L.A., Nemykin O.N., Bokova E.N.

Belgorod State University, Belgorod, e-mail: nesterov\_a@bsu.edu.ru

In the experiment, we showed that after trephination of skull bone regeneration flat is fully implemented only when there is a substrate of nanoimplanta, but more fully this process occurred in the group with the nanocomposite (nanotitan, gelatin, hydroxyapatite and collagen). In the group with sham animals, the full restoration of the integrity of the bones of the skull did not occur.

**Keywords:** regeneration, nanostructured implants, skull

Проблемы, приводящие к необходимости пластики черепа, сложны и многообразны. Одно из первых мест в этом вопросе занимает травматизм. Частота черепно-мозговой травмы составляет от 1,8 до 5,4 случаев на 1000 человек населения. Соответственно растет и хирургическая активность (Шукри А.А., 2006). Необходимость оперативных вмешательств по поводу новообразований головного мозга по-прежнему остается актуальной, так как заболеваемость в год составляет в мире 1 из 5000 человек (Kleihues P. et al., 2000; Olson J.D. et al. 2000). Особое значение в последнее десятилетие приобрели операции по поводу сосудистой патологии (Верещагин Н.В., 2001; Чехонацкий А.А., 2009). Вопросы транспланталогии, как и поиск имплантов, сложны и многообразны. Необходимо создание новых материалов (Gomoll A.H. et al. 2008; Kannan R.Y., 2007; Lee K.W. et al 2008; Raghunath J. et al 2009). В связи с этим, особое значение получили вопросы регенерации костной ткани, что показано и нашими исследованиями [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8]. Поэтому, целью исследования явилось изучение способов улучшения регенерации костной ткани черепа на экспериментальной модели при применении различных видов наноимплантов.

### Материалы и методы исследования

Эксперимент выполнен на 130 крысах-самцах линии «Вистар» массой 200–250 г из питомника

РАМН «Столбовая» Московской области. Все процедуры содержания животных, проведения манипуляций и тестирования полученных данных проводились в соответствии со стандартами ISO 10993-1–2003 и ГОСТ Р ИСО 10993.2–2006.

Для последующего эксперимента животные были разделены на 4 группы:

1. Ложнопериоперированные животные.
2. Животные, которым был имплантирован композит из нанотитана.
3. Животные, которым имплантирован композит из нанотитана с одним слоем покрытия.
4. Животные, которым имплантирован биокомпозит из нанотитана с двумя слоями покрытия.

Для изучения регенераторно-репаративных процессов в ране использовались импланты из наноструктурированного титана в форме дисков диаметром  $5,1 \pm 0,11$  мм, толщиной  $0,7 \pm 0,11$  мм. Поверхность дисков была подвергнута пескоструйной обработке. На стерильные титановые диски наносили первый слой покрытия, который состоял из 10% медицинского желатина. Затем наносили 2-й слой покрытия, состоящий из 10% гидроксиапатита и 0,25% коллагена. Для вводного наркоза использовался диэтиловый эфир. Производилась трепанация черепа в середине теменной кости. Изучение регенерации костной ткани проводилось через 1, 2, 4, 6, 9, 12 и 14 недель.

При аутопсии была проведена макроскопическое описание и фотографирование. Для исследования методом световой микроскопии срезы с парафиновых блоков окрашивали гематоксилином и эозином, исследовались и фотографировались в световом микроскопе «Торис-Т» Сети. Для растровой электронной микроскопии пробы фиксировали в стандартном глутаральдегидовом буфере. Затем просматривали в растровом микроскопе «FEI Quanta 200 3D». Элементный анализ макро- и микроэлементов (углерода, кислорода, фосфора, кальция, азота, натрия, магния,

железа, алюминия и серы) был сделан с использованием детектора для регистрации спектров характеристического рентгеновского излучения фирмы EPIX. Детекторы интегрированы с растровым электронным микроскопом «Quanta 600 FEG». Зондовая сканирующая микроскопия проведена на сканирующем зондовом микроскопе на приборе «Ntegra-Auga». Для изучения регенераторных особенностей костной ткани выбраны флюоресцентный краситель – родамин. Обработка препаратов производилась на микроскопе «Микмед-6», вариант 11.

### Результаты исследования и их обсуждение

При изучении регенерации костной ткани в опытных группах с различными видами наноимплантов (1-2 недели экспозиции) показано, что ширина ободка демаркационной зоны воспаления составляла через неделю  $1,4 \pm 0,4$  (1-я группа),  $1,6 \pm 0,35$  (2),  $1,8 \pm 0,33$  (3), а через 2 недели –  $1,8 \pm 0,29$  мм,  $2,1 \pm 0,25$ ,  $2,2 \pm 0,22$  мм соответственно. Демаркационная зона воспаления на следующих сроках экспозиции не наблюдалась. Причем полнокровие и отек больше были выражены в группах с внедрением импланта без покрытия. К четвертой неделе гиперемия и отек были выражены в меньшей степени, чем при недельной экспозиции. На следующих сроках экспозиции воспалительная реакция не отмечалась. В матриксной кости было отмечено, что Гаверсовы каналы остеонор расширены вследствие остеокластической

резорбции, содержали большое количество клеточных элементов и заполненных кровью сосудов. Выявлялись остатки гематомы с волокнами фибрина, которые были подвержены организации за счет прорастания в них фибробластических элементов. Через 6 недель экспозиции матриксная кость не изменена. Гаверсовы каналы умеренно полнокровны вплоть до сроков 12 недель. Происходит дальнейшее разрастание хрящевой ткани и сосудов. Связь между композитом и имплантом во всех группах была уже более прочной, но все же лучше проявлялась в группах с покрытием, особенно с двумя слоями, чем без него.

При 7-дневной экспозиции у всех животных просвет между костной тканью и композитом заполнялся соединительной тканью. Следует отметить, что в группе № 2 эта связь была более рыхлой и наиболее полноценно она была выполнена в группе № 4. Граница между волокнистым и клеточным слоями не определялась. Между композитом и материнской костью было выражено полнокровие, особенно четко определяемое во 2-й группе. Наблюдались фрагменты с диапедезными кровоизлияниями. Здесь же в большей степени, чем в 3-й и 4-й группах, были выявлены клетки лимфоидного ряда. Ткань была преимущественно рыхловолокнистая соединительная. Вновь образованная ткань более равномерно нарастала на имплант в группе № 4 (рис. 1).

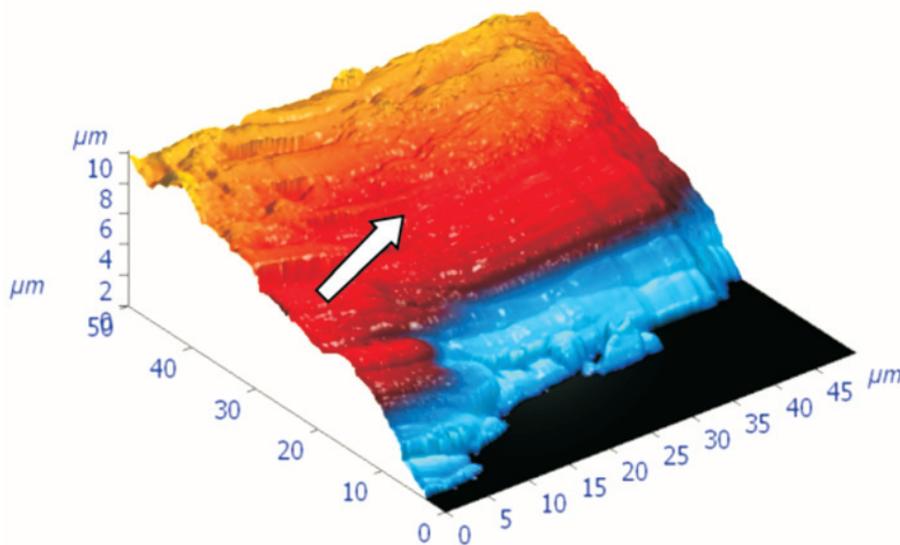


Рис. 1. Фрагмент костной ткани черепа крысы (теменная область) с композитом из нанотитана Grey с пескоструйной обработкой с двумя слоями покрытия: 1 – желатин, декстран; 2 – гидроксиапатит, коллаген, декстран без покрытия. 7 дней экспозиции. Биокompозит окружен ровным слоем рыхлой соединительной ткани шириной  $45,0 \pm 5,0$  мкм, равномерной по толщине  $11,0 \pm 0,5$  мкм, с начинающейся формироваться мезенхимальной тканью над имплантом. Атомносиловая сканирующая лаборатория

Через 2 недели между тканью и композитом просматривалась хорошо сформированная соединительная ткань, богатая полнокровными сосудами, что особенно ярко было выражено в группе № 4. К 30 суткам между матриксной костью и имплантом формируется сложный симбиоз из нескольких видов тканей: это фиброзная ткань, которая как бы является основой для располагающейся среди нее островков хрящевой ткани, которая более выражена в группах 3 и 4, а также жировая ткань. Здесь определяются уже и вновь образованные сосуды. Между композитом и матриксной костью было выражено полнокровие, особенно четко определяемое во 2-й группе. Наблюдались фрагменты с диапедезными кровоизлияниями. Через 9–12 недель между имплантом и матриксной костью наблюдается формирование костной ткани с развитием Гаверсовых каналов, которые на этой стадии меньшего размера и полнокровны. Osteобласты располагаются в полостях и хорошо выражены.

Через неделю покрытия импланта вновь образованной тканью импланта в группе № 2 не наблюдалось. В 3-й группе составляло  $1,0 \pm 0,2 \times 0,4 \pm 0,1$  мм, в 4-й –  $2,0 \pm 0,3 \times 0,4 \pm 0,08$ . Через 2 недели эти показатели составляли:  $0,8 \pm 0,2 \times 0,2 \pm 0,05$ ,  $1,5 \pm 0,2 \times 0,6 \pm 0,03$  и  $2,4 \pm 0,3 \times 0,8 \pm 0,01$  мм соответственно. К 4 неделям покрытие составляло во 2-й группе –  $1,4 \pm 0,23 \times 3,5 \pm 0,11$ , 3 –  $1,8 \pm 0,2 \times 3,8 \pm 0,1$ , 4 –  $2,2 \pm 0,16 \times 4,5 \pm 0,08$ . При экспозиции 6 недель покрытие импланта было следующим: 2 группа –  $1,8 \pm 0,21 \times 3,8 \pm 0,1$ , 3 –  $2,1 \pm 0,25 \times 4,2 \pm 0,08$ , 4 –  $2,6 \pm 0,3 \times 4,5 \pm 0,05$ . На сроках экспозиции свыше 9 недель имплант полностью покрыт вновь образованной тканью по всей поверхности.

При изучении ткани над имплантом с помощью атомносиловой микроскопии было показано, что при использовании биокомпозитов формировалась ровная зона мезенхимальной ткани, заполняющей дефект между костной тканью и композитом и равномерно прикрывающей последний, формирующая своеобразный купол над ним толщиной до  $11,0 \pm 0,5$  мкм. При использовании же композитов без покрытия слой вновь образованной ткани был неравномерным,  $5,0 \pm 1,5$  мкм, и наблюдались лишь отдельные фрагменты формирования ткани над имплантом.

Слой костной ткани, образовавшиеся при экспозиции 6 недель, имели свои каналы, соединенные с лежащими ниже слоями. Их толщина составляла:  $56 \pm 19,71$ ;  $70,0 \pm 8,83$ ;  $80,0 \pm 6,45$ . Следует отметить, что при внедрении импланта без покры-

тия, вновь образованная ткань плохо взаимодействовала с имплантом, тогда как при наличии покрытия, особенно с двумя слоями, наблюдалось более прочное их сращение. Фиброзная ткань покрывала имплант. По периферии импланта определялись фиброзный и остеогенный слои надкостницы. Вновь образованная ткань развивалась с двух сторон импланта. Со стороны твердой мозговой оболочки ее слой имел более неровную поверхность.

Поверхность над имплантом к 9 неделям была заполнена костной тканью. Граница между старой и новообразованной костью визуализировалась только под микроскопом. Выявлена компактная кость с грубоволокнистыми костными трабекулами, фрагменты пластинчатой кости. Отмечено формирование зрелой пластинчатой из губчатой кости. Наблюдалась инвазия сосудов в область импланта с формированием сосудистой сети, наличием эритроцитов. Фиброзная ткань не выражена. Наблюдался плотный ободок соединительной ткани по периферии импланта во всех опытных группах. Выявлены новообразованные остеоны.

Расстояние между центром импланта и вновь образованной тканью через 9 недель составляло  $450,09 \pm 28,7$ ,  $380,12 \pm 20,08$ ,  $300,02 \pm 9,98$  мкм. Через 12 недель оно соответственно уменьшалось, особенно в группе 4 и составляло  $187,69 \pm 28,24$ ,  $150,08 \pm 19,87$ ,  $98,84 \pm 8,9$  мкм. Толщина вновь образованной ткани над центром композита составляла при 9-недельной экспозиции  $497,08 \pm 29,51$ ,  $687,0 \pm 20,03$ ,  $905,0 \pm 9,62$  мкм; а при 12-недельной –  $1167,0 \pm 29,1$ ,  $1284,0 \pm 19,92$ ,  $1396,0 \pm 8,34$ , прогрессировала к дальнейшим срокам (рис. 2). С помощью люминесцентной микроскопии было показано, что окраска роданиновым красным, хорошо отображающая клетки с высокой метаболической активностью, наиболее выражена в зоне по периферии костной ткани и во вновь образованной волокнистой ткани, что особенно четко проявлялось в следующей последовательности групп: 2, 3, 4, а также увеличивалось по мере роста экспозиции регенерации.

При изучении микроэлементного состава было показано, что к 14 дням прогрессивно увеличивается содержание натрия в группах 3 ( $1,01 \pm 0,01$ ), а особенно, 4 ( $2,33 \pm 0,01$ ). Содержание магния также максимально в 4-й группе ( $9,69 \pm 0,02$ ). Помимо этого, здесь отмечено максимальное количество фосфора ( $36,97 \pm 0,09$ ), кальция ( $30,35 \pm 0,08$ ). На сроке экспозиции 6 недель кальцификация по-прежнему наблюдалась преимущественно в 3-й группе

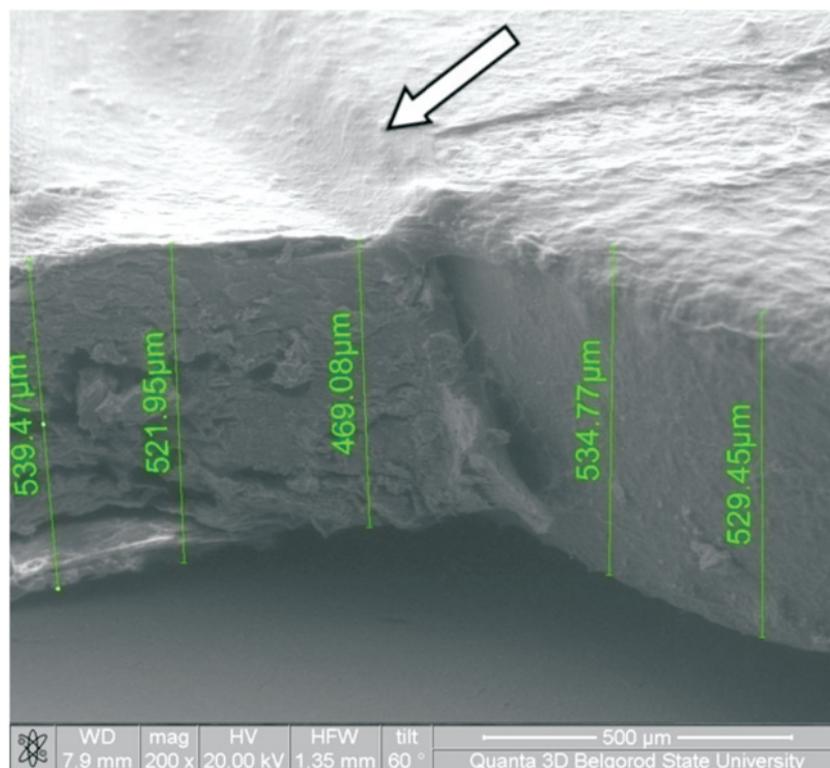


Рис. 2. Фрагмент костной ткани черепа крысы (теменная область) с композитом из нанотитана Grey с пескоструйной обработкой с двумя слоями покрытия:

1 – желатин, декстран; 2 – гидроксиапатит, коллаген, декстран. Экспозиция 12 недель. Вновь образованная ткань покрыта надкостницей. Равномерна по толщине. По периферии сливается с матричной костью. РЭМ. Ув. x 200

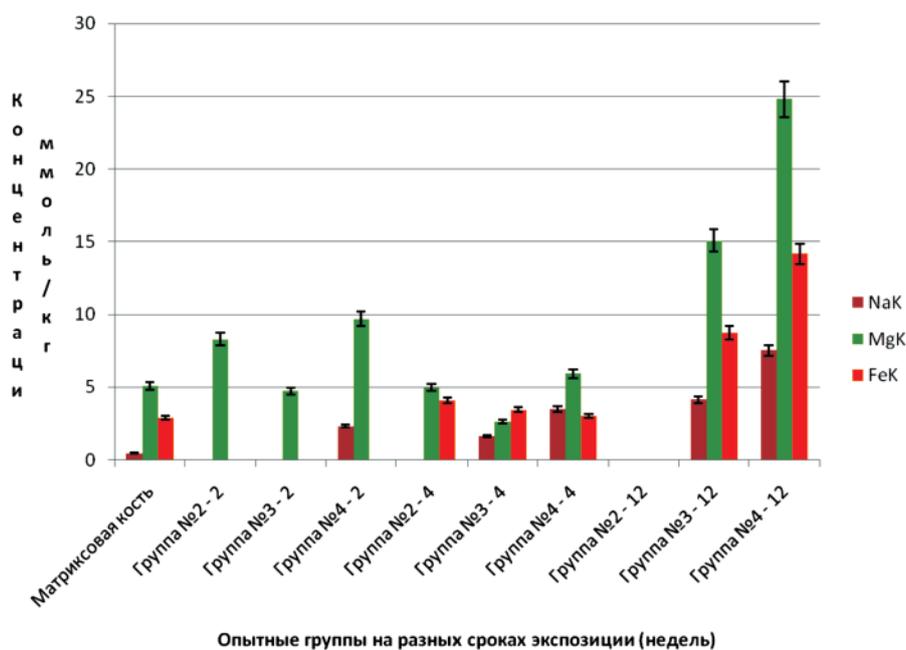


Рис. 3. Динамика микроэлементного состава (магний, железо, натрий).  
 Группа № 2 – нанотитан Grey с пескоструйной обработкой без покрытия.  
 Группа № 3 – нанотитан Grey с пескоструйной обработкой с одним слоем покрытия (композиционный препарат, в состав которого входил желатин и высокомолекулярный декстран). Группа № 4 – нанотитан Grey с пескоструйной обработкой с двумя слоями покрытия (1-желатин, декстран, 2- гидроксиапатит, коллаген, декстран)

(470,63 ± 1,18), при 123,95 ± 0,31 в 1-й и 114,5 ± 0,29 – во 2-й группе. Увеличение содержания натрия во 2-й (1,65 ± 0,01) и 3-й (3,49 ± 0,01) группах (рис. 3). Появляется железо (4,07 ± 0,01) (3,46 ± 0,01) (3,04 ± 0,01). Содержание фосфора в 3 группе также максимально и составляло 266,16 ± 0,67. Содержание натрия прогрессивно возрастало, особенно при покрытии биокомпозитом: 12 недель 7,52 ± 0,02. То же самое можно сказать о магнии: 24,81 ± 0,06. Но особо следует отметить увеличение количества кальция: 966,46 ± 2,42 (см. рис. 3).

Таким образом, можно отметить, что регенерация плоских костей черепа осуществлялась в полном объеме лишь при наличии подложки из наноимпланта (группы №№ 2, 3, 4), но наиболее показательны в группе с нанокомпозитом. В контрольной группе (ложнооперированные животные) полного восстановления целостности костей свода черепа не происходило.

#### Список литературы

1. Верещагин Н.В. Церебролизин в лечении когнитивных расстройств при атеросклерозе и артериальной гипертензии. // Лечение нервных болезней – 2001 – №1 – С. 15–18.
2. Характеристика репаративных процессов при применении биокомпозитов, содержащих ВМР-2 на основе имплантов из наноструктурированного титана на ранних стадиях регенерации / Л.А. Павлова, В.В. Кривецкий, А.В. Нестеров, Т.В. Павлова // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. – 2010. – Т. 9, №1. – С. 200–203.
3. Анализ структуры тяжелой черепно-мозговой травмы, тактики оперативного вмешательства и вариантов выполнения краниопластики / Л.А. Павлова, А.В. Нестеров, Е.Н. Бокова, О.Н. Немыкин, Т.В. Павлова // Фундаментальные исследования. – 2009. – №10. – С. 25–27.
4. Морфологический анализ костного дефекта при использовании импланта титана, обработанного пескоструйным методом с различными композитными покрытиями в динамике первого месяца регенерации / Л.А. Павлова, Т.В. Павлова, А.В. Нестеров, Д.А. Колесников, И.Ю. Гончаров, М.Г. Жерновой // Научные ведомости БелГУ. – 2010. – Вып. 9, № 4 (75). – С. 58–63.
5. Павлова Л.А., Павлова Т.В., Нестеров А.В. Современные представления об остеоиндуктивных механизмах регенерации костной ткани. Обзор состояния проблемы // Научные ведомости БелГУ № 10 (81). – 2010. – Вып. 10. – С. 5–11.
6. Павлова Т.В. Особенности черепно-мозговой травмы у пациентов пожилого возраста и способы ее коррекции (клинико-экспериментальное исследование) / Т.В. Павлова, А.В. Нестеров, Л.А. Павлова, М.Г. Жерновой // Геронтологический журнал им. В.Ф. Купревича. – 2010. – № 2. – С. 51–52.
7. Павлова Т.В. Черепно-мозговая травма у пациентов пожилого возраста и способы ее коррекции (клинико-экспериментальное исследование) / Т.В. Павлова, А.В. Нестеров, Л.А. Павлова, М.Г. Жерновой // Научные ведомости БелГУ. – 2010. – Вып. 12/1, № 22 (93). – С. 78–82.
8. Особенности регенерации костной ткани при введении коллагеново-гидроксиапатитных нанокомпозитов / Т.В. Павлова, Ю.А. Мезенцев, Л.А. Павлова, А.В. Нестеров, Д.А. Колесников // Фундаментальные исследования. – 2009. – №8. – С. 25–28.
9. Чехонацкий А.А. Современные вопросы консервативного и хирургического лечения нарушений мозгового кровообращения / З.А. Суслина, С.Л. Тиммербаева, А.А. Чехонацкий и др. // Ремедиум Приволжье. – 2009. – №9.
10. Шукри А.А., Берснев В.П., Рябуха Н.П. Эпидемиология черепно-мозговой травмы в г. Адене, Йемен // Нейрохирургия. – 2006. – № 1. – С. 50–52.
11. Gomoll A.H. Nanoparticulate fillers improve the mechanical strength of bone cement / A.H. Gomoll, W. Fitz, R.D. Scott, T.S. Thornhill, A. Bellare // Acta Orthop. – 2008 Jun. – №79(3). – С. 421–7.
12. Kannan R.Y. Silsesquioxane nanocomposites as tissue implants / R.Y. Kannan, H.J. Salacinski, J.E. Ghanavi, A. Narula, M. Odlyha, H. Peirovi, P.E. Butler // Plast Reconstr Surg. – 2008 Nov. – 122(5):1599-600. – author reply 1600-1.
13. Kleihues P, Divas RL, Ohgaki H et al. Diffuse astrocytoma. In: Kleihues P, Cavenee WK (eds). Pathology and Genetics of Tumors of the Nervous System. IARC Press. – Lyon, 2000. – P. 22–8.
14. Lee K.W. Physical properties and cellular responses to crosslinkable poly(propylene fumarate)/hydroxyapatite nanocomposites / K.W. Lee, S. Wang, M.J. Yaszemski, L. Lu // Biomaterials. – 2008 Jul. – 29(19). – P. 2839-48.
15. Pavlova T.V., Pavlova L.A., Bokova E.N., Pavlov I.A., Nemikin O.N., Nesterov A.V. / Craniocerebral trauma: structure, tactics of operative intervention (clinical and experimental research) // European Journal Of Natural History. – 2010. – №4. – P. 4–7.

#### Рецензенты:

Парфенов И.П., д.м.н., профессор, зав. хирургическим отделением №1 БОКБ Св. Иоасафа, г. Белгород;

Луценко В.Д., д.м.н., профессор, главный врач МУЗ «Городская больница №2», г. Белгород.