

УДК 616-003.93 + 578.089.843 + 576.7

## МАТРИЧНЫЙ ГИСТОГЕНЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ ПРИ ИХ РЕГЕНЕРАЦИИ НА ИМПЛАНТАТАХ СО СЛОИСТОЙ ПЕРИОДИЧЕСКОЙ СТРУКТУРОЙ

<sup>1</sup>Никитюк И.Е., <sup>2</sup>Петраш В.В., <sup>3</sup>Кубасов В.А., <sup>4</sup>Захарова Н.Г., <sup>2</sup>Ильина Л.В.

<sup>1</sup>Научно-исследовательский детский ортопедический институт им. Г.И. Турнера  
Минздравоохранения, Санкт-Петербург, e-mail: turner01@mail.ru;

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт промышленной и морской медицины Федерального  
медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, e-mail:spbism@mail.ru;

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт электрофизической аппаратуры им. Д.В. Ефремова,  
Санкт-Петербург, e-mail: niiefamit@mail.ru;

<sup>4</sup>Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями Комитета  
по здравоохранению Санкт-Петербурга, Санкт Петербург, e-mail: aidscentr@zdrav.spb.ru

Впервые проведено исследование характера регенерации соединительной ткани на имплантированных многослойных твердотельных биоструктурах. Исследование выполнено на кроликах породы шиншилла. В опытной группе ( $n = 6$ ) для имплантатов были использованы биогенные слоистые периодические структуры (СПС) – чешуи рыбы (сазана) со средним диаметром 25 мм. В контрольной группе ( $n = 6$ ) для имплантатов использовали монослойные пластины аналогичной формы и размеров из фторопласта. Имплантаты после стерилизации фиксировали лигатурами под кожей на спине животного. Извлечение имплантатов с прилежащими к ним мягкими тканями осуществляли под местным обезболиванием через 2 и 4 недели. Прилежащие к имплантату ткани изучали гистологическим методом. В контрольной группе в области ложа имплантата развились рубцово-спаечные процессы, где сформировалась бугристая, неэластичная рубцовая ткань. В опытной группе наблюдали формирование вокруг имплантата специфической соединительнотканной капсулы, имевшей гладкую поверхность, характеризующуюся прозрачностью и чрезвычайной эластичностью. Гистологическое исследование выявило в ней упорядоченное расположение коллагеновых волокон, однонаправленную ориентацию фибробластов, среди которых наблюдалось наличие вытянутых и ориентированных вдоль поверхности имплантата клеток. Полученные результаты наглядно показывают, что имплантированный материал с СПС обеспечивает матричный эффект, детерминирующий цитоархитектонику вновь образующейся биологической ткани.

**Ключевые слова:** имплантат, регенерация, гистогенез, матричный механизм, слоистые периодические структуры

## THE BIOLOGICAL TISSUES MATRIX HISTOGENESIS WITH THEIR REGENERATION AT THE IMPLANTS WITH LAYERED PERIODIC STRUCTURE

<sup>1</sup>Nikityuk I.E., <sup>2</sup>Petrash V.V., <sup>3</sup>Kubasov V.A., <sup>4</sup>Zakharova N.G., <sup>2</sup>Ilna L.V.

<sup>1</sup>The Turner Research Institute for Children's Orthopedics,  
St. Petersburg, e-mail: KravchenkoStom@mail.ru;

<sup>2</sup>The Research Institute of Industrial and Marine Medicine, Saint-Petersburg, e-mail: spbism@mail.ru;

<sup>3</sup>The Efremov Research Institute for Electrophysical Apparatus, Saint-Petersburg, e-mail: niiefamit@mail.ru;

<sup>4</sup>The Center on Preventive Measures and Struggle with AIDS and Infectious Diseases  
of the Committee on Public Health of St. Petersburg, e-mail: aidscentr@zdrav.spb.ru

For the first time, it has been carried out the study of the regeneration of the conjunctive tissue on the implanted multilayered solid bio-structures. This study has been chosen the rabbits of the chinchilla breed. In experimental group (e.g.  $n = 6$ ) species for implantation the biogenic layered periodical structures (LPS) have been used, namely, the scales of fish (e.g. the European carp), with the average diameter of 25 mm. In the control group (e.g.  $n = 6$ ) species for implantation the single layer plates of similar shape and size have been used, but made of the fluoroplastic. After sterilization, the implants have been fixed by the ligatures under the skin on the animal's spine. The implants extraction with adjacent soft tissues has been made under the local anesthesia after 2 and 4 weeks (e.g. 14 and 28 days). Adjacent to the implant tissues have been studied by the histological method. In the control group, in the area of the implant bed, the scar-adhesions have been developed processes, which formed the lumpy, inelastic scar tissue. In experimental group, it has been observed the formation around implant the specific connective –tissue capsule, having possessed the smooth surface and featured by the transparency and the extreme elasticity. Histological examination has been revealed in it the ordered arrangement of the collagen fibres and the unidirectional orientation of the fibroblasts, among which the elongated cells oriented along the implant surface have been observed. The results obtained in this study have obviously been shown, that the implanted material with LPS provides the matrix effect development, having determined the cyto –architectonic of the newly formed biological tissue.

**Keywords:** implant, regeneration, histogenesis, the matrix mechanism, layered periodic structures

Мысль о том, что органы для трансплантации можно выращивать, не нова, однако ее осуществление связано с необходимостью выполнения одного из важных условий – создания объемной матрицы,

своего рода каркаса для направленного гистогенеза тканей. Развитие «каркасной» технологии проходит в рамках концепции регенеративной медицины. При использовании пластиковых и иных каркасов из

искусственных материалов удается получить регенерацию полых органов: сосудов, мочеточника, пищевода, гортани, мочевого пузыря. Матричную регенерацию на так называемом каркасе можно наблюдать и в естественных условиях. Например, кожа, покрывающая рога – «каркас» у оленей, хорошо регенерирует, полностью восстанавливаясь после глубоких повреждений как цитоархитектонику слоев, так и волосяной покров с железами [5]. Известно, что многие биополимеры (рога, чешуя), являющиеся производными наружных покровов животных, имеют многослойную периодическую структуру и могут рассматриваться как фотонные кристаллы, способные выполнять функции активной преобразующей среды [1, 2, 8]. Свойства подобных биоматериалов практически не изучены, однако, исходя даже из немногочисленных работ в этом направлении,

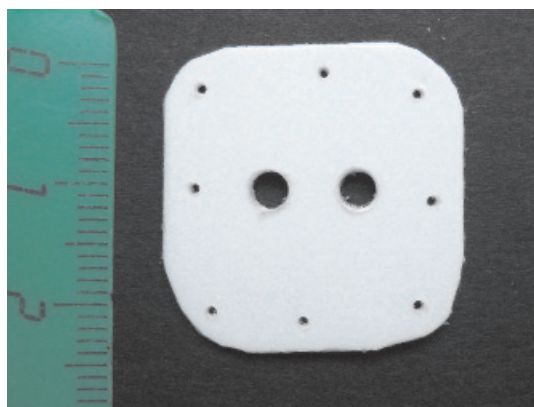
можно предполагать перспективность их применения для регенеративной медицины [6, 8].

Целью данной экспериментальной работы являлось исследование характера регенерации соединительной ткани на имплантированных многослойных твердотельных биоструктурах.

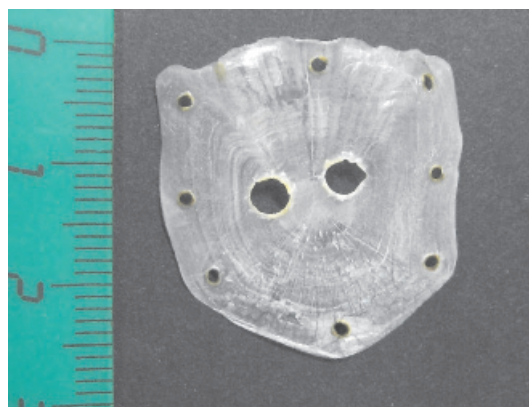
#### Материал и методы исследования

Исследование проведено на 12 разнополых кроликах породы шиншилла в возрасте от 3 до 4 месяцев. Животные были разделены на две группы – опытную ( $n = 6$ ) и контрольную ( $n = 6$ ), при этом для каждой группы предварительно были подготовлены свои имплантаты.

Имплантаты *опытной* группы были представлены природными слоистыми периодическими структурами – высушенными чешуями рыбы (сазана) со средним диаметром 25 мм. Крепление имплантатов лигатурами к тканям обеспечивали с помощью 8 отверстий диаметром 1 мм, выполненных по краям каждой пластины (чешуйки), для дренажа предусматривали 2 отверстия диаметром 3 мм в центральной области пластин (рис. 1б).



а



б

Рис. 1. Типы пластинчатых имплантатов:

а – в контрольной группе – из синтетического полимера (фторопласта);

б – в опытной группе – биоматериал со слоистой периодической структурой (чешуя рыбы)

В качестве материала для имплантатов *контрольной* группы был выбран биологически инертный материал – искусственный полимер фторопласт. Из листов фторопласта толщиной 1 мм вырезали квадратные пластинки со стороной 25 мм, которым скругляли края. После этого в полимерных имплантатах проделывали функциональные отверстия, аналогичные по размерам и расположению таковым в опытной группе (рис. 1а), после чего помещали их на хранение в 96%-й раствор этилового спирта.

Непосредственно перед проведением экспериментов вопросы обеспечения стерильности для имплантатов обеих групп решали одинаково: за 2 часа до опытов все имплантаты помещались при комнатной температуре в водный раствор цефтриаксона – антибиотика широкого спектра действия (в концентрации 1 г препарата на 3 мл воды).

У кролика каждой группы на спине, на уровне грудного отдела, выстригали шерсть, обрабатывали антисептиком и в соответствии с Международными требованиями и Европейской Конвенцией по гуманному отношению к экспериментальным животным проводили местную анестезию кожи 0,25%-м раство-

ром новокаина. По средней линии делали продольный разрез кожи длиной 3 см до фасции, с помощью крючков отводили правый край раны и в образовавшийся карман между кожей и грудной клеткой вводили по одному имплантату. Для уменьшения мобильности и предотвращения миграции имплантата в тканях, над имплантатом с помощью 3–4 кетгуттовых швов фиксировали внутренние слои кожи к фасциально-мышечному слою грудной клетки. На рану накладывали дополнительные швы. Извлечение имплантатов с прилежащими к ним мягкими тканями осуществляли под местным обезболиванием через 2 и 4 недели в каждой группе. Процессы, происходящие в дермальных тканях, исследовали классическим гистологическим методом, срезы окрашивали гематоксилином – эозином.

#### Результаты исследования и их обсуждение

Предварительные гистологические исследования имплантата, изготовленного из чешуи рыбы, показали, что чешуя имеет

слоистое периодическое строение и ее структура состоит из 40–50 тонких параллельных пластин толщиной порядка 5 мкм (рис. 2).

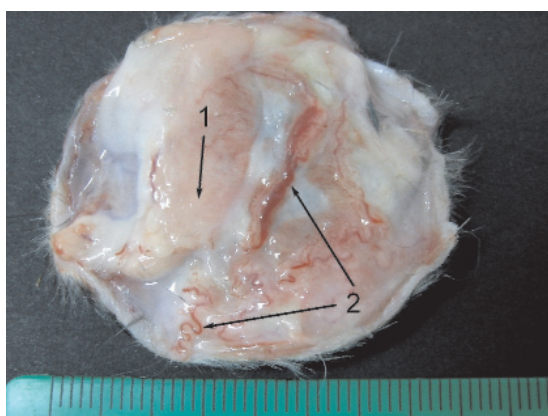


Рис. 2. Поперечный гистологический срез имплантата, изготовленного из чешуи рыбы, на котором отчетливо видна многослойность структуры (СМ-микрофото, окраска гематоксилином и эозином, ув. 100 (объектив – 10, окуляр – 10))

В контрольной группе животных при использовании имплантатов из искусствен-

ного полимера, несмотря на его биологическую инертность за весь период наблюдения развились рубцово-спаечные процессы в области ложа имплантата. Через 4 недели не произошло нарастания соединительной ткани на имплантат, однако прилежащие мягкие ткани ложа, преимущественно на стороне внутреннего слоя кожных покровов, были представлены бугристой, непрозрачной, неэластичной рубцовой тканью, богато пронизанной кровеносными сосудами (рис. 3а).

Проведенное на 2-й неделе гистологическое исследование показало, что в области ложа имплантата формируется клеточно-волоконистая фиброзная ткань, представленная молодыми соединительнотканскими клетками – фибробластами с овальными умеренно базофильными ядрами (рис. 4а). Местами определялись очаги с неравномерно выраженной инфильтрацией лейкоцитов, что не являлось признаком воспаления, то есть гистологическая картина была представлена обычной тканевой реакцией, характерной для образования рубца.



а



б

Рис. 3. Макропрепарат мягких тканей, прилежащих к имплантату:  
а – однослойный полимерный имплантат в контроле через 4 недели после его удаления:  
1 – непрозрачная рубцовая ткань; 2 – кровеносные сосуды;  
б – соединительнотканная капсула на многослойном биологическом имплантате в опыте через 4 недели (кровеносные сосуды не выражены, сквозь толщу капсулы просвечивает имплантат)

На 4-й неделе гистологическое исследование формирующегося рубца показало дальнейшее созревание фиброзной соединительной ткани, состоящей главным образом из беспорядочно расположенных коллагеновых волокон. Количество клеточных элементов было значительно меньше, по сравнению с таковым в 2-недельных регенератах, зато сосудистая сеть была более выраженная. В некоторых местах встречались единичные лейкоциты. Таким образом, при гистологическом исследовании тканей

ложа, прилежащих к полимерному имплантату, определялась хаотичная, беспорядочная, разнонаправленная ориентация как фиброцитов, так и плотно расположенных пучков коллагеновых волокон, характерная для грубоволокнистой рубцовой ткани (рис. 4б).

Таким образом, при подкожном использовании однослойного имплантата из искусственного полимера создались условия, характерные для течения рубцово-спаечного процесса в прилежащих тканях.



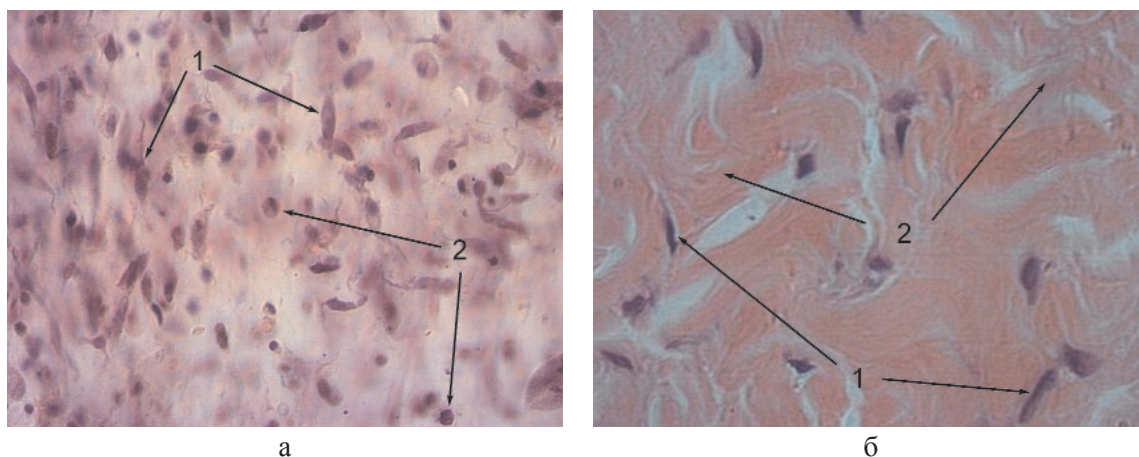


Рис. 4. Гистологический срез рубцовой ткани ложа, прилежащей к однослойному полимерному имплантату в контроле:

а – через 2 недели: 1 – фибробласты; 2 – лейкоциты; б – через 4 недели: 1 – хаотично расположенные фиброциты; 2 – массивы разнонаправленных коллагеновых волокон (СМ-микрофото, окраска гематоксилином и эозином, ув. 600 (объектив – 40, окуляр – 15))

У кроликов *опытной* группы отличительной особенностью явилось быстрое формирование вокруг имплантата соединительнотканной капсулы, имеющей специфическое строение. На 2-й неделе капсула плотно прилегала к имплантату, но не была спаяна с ним, имела гладкую поверхность, характеризовалась прозрачностью и чрезвычайной эластичностью. Визуально кровеносные сосуды в капсуле не определялись, даже спустя 4 недели она сохраняла прозрачность, при значительной толщине (рис. 3б). Характерной особенностью являлось формирование капсулы сплошным покрытием, «не замечая» отверстий в пластине чешуи.

Гистологическое исследование соединительнотканной капсулы многослойного имплантата уже на 2-й неделе выявило строго упорядоченную, однонаправленную ориентацию фибробластов, ранее появлению слоисто расположенных коллагеновых волокон (рис. 5а). Отличительной особенностью популяции фибробластов является наличие среди основного количества их овальных форм единичных клеток, сильно вытянутых и ориентированных вдоль поверхности имплантата. На 4-й неделе гистологически определялось сохранение упорядоченной, однонаправленной ориентации как коллагеновых волокон, так и фиброцитов, большая часть которых имела вытянутую форму (рис. 5б).

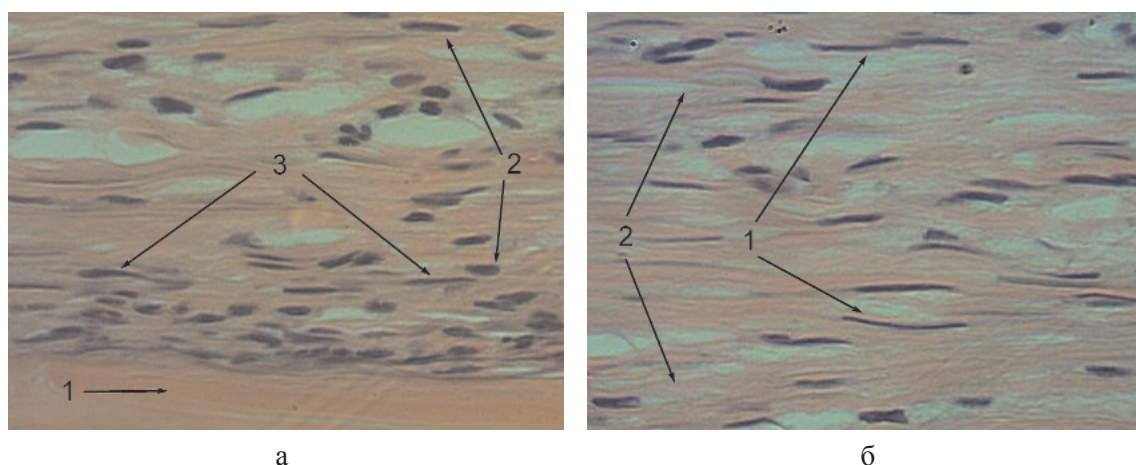


Рис. 5. Гистологический срез соединительнотканной капсулы, покрывающей многослойный биологический имплантат в опыте:  
а – через 2 недели: 1 – поверхность имплантата; 2 – упорядоченная ориентация фибробластов; 3 – вытянутые фибробласты;  
б – через 4 недели: 1 – упорядоченная ориентация вытянутых фиброцитов; 2 – упорядоченно расположенные коллагеновые волокна (СМ-микрофото, окраска гематоксилином и эозином, ув. 600 (объектив – 40, окуляр – 15))

Проведенные эксперименты с использованием биогенного имплантата со слоистой периодической структурой продемонстрировали возможность достижения эффекта пространственной упорядоченности регенерирующих клеток. В данном случае биогенный имплантат выполнил роль матричного структуризатора, обеспечивающего наличие управляющего воздействия.

Матричный механизм, когда физические свойства субстрата влияют на ориентацию, гистологию и общее поведение расположенных на нем клеток, присущ биологическим системам в целом [3, 4]. Этот эффект впервые был обнаружен Гаррисоном в 1914 году [7]. Было выявлено, что в культуре формирующейся ткани клетки ориентировались вдоль очень тонких волокон, представленных паутиновыми нитями, которые были предварительно протянута в питательной среде.

Исходя из известных научных фактов, становится объяснимой возможность формирования биологических тканей с высокой степенью упорядоченности структуры на матрицах, имеющих кристаллическое строение, к которым относятся также фотонные кристаллы, представленные в данной работе чешуей рыбы. Анализ структурного построения чешуи дает все основания предполагать, что в процессе взаимодействий между клетками тканевого ложа и имплантатом-структуризатором в локальной области над поверхностью многослойного имплантата могут возникать электростатические, акустические и резонансные явления или их совокупности, которые определяют высокую упорядоченность ориентации клеток вновь формирующейся ткани.

Таким образом, реально существует ряд физических механизмов и вариантов их совместного действия, способных обеспечить эффект матричного регулирования гистогенеза биологических тканей. Исследования в данном направлении позволяют не только выявить новые свойства многослойных периодических структур, углубленно изучить механизмы их воздействия на ткани, но и с новых позиций подойти к разработке методов стимуляции регенерации биологических тканей. Практическая значимость такого подхода будет оценена дальнейшими экспериментальными исследованиями.

#### Выводы

1. Впервые получен эффект матричного гистогенеза соединительной ткани на автономном биогенном имплантате со слоистой периодической структурой.

2. Упорядоченность ориентации клеток вновь формирующейся ткани определяется физическими свойствами слоистой периодической структуры имплантата.

3. Использование материалов из многослойных периодических структур представляется перспективным для дальнейшей разработки и применения в травматологии, хирургии, трансплантологии и др. для повышения качества регенерации поврежденных тканей.

#### Список литературы

1. Архипкин В.Г., Гуняков В.А., Мысливец С.А. Одномерные фотонные кристаллы с планарно-ориентированным слоем нематина: температурные и угловые зависимости спектров дефектных мод // Журнал экспериментальной и теоретической физики. – 2008. – Т. 133, Вып. 2. – С. 447–459.
2. Ильинский А.В., Сильва-Андрате Ф., Шадрин Е.Б. и др. Биологические структуры как фотонные объекты // Биофизика. – 2006. – Т.51, Вып. 4. – С. 743–748.
3. Кольцов Н.К. Организация клетки. – М., Л.: «Биомедгиз», 1936. – 652 с.
4. Костецкий Э.Я., Алексанов С.А. О возможности синтеза нуклеопротеидов на матрице апатита // Доклады Академии Наук СССР. – 1981. – Т.260, № 4. – С. 1013–1018.
5. Лиознер Л.Д. Изменение тканей и регенерация органов. – М.: «Знание», 1970. – 48 с.
6. Петраш В.В., Никитюк И.Е., Кубасов В.А. Дистанционное взаимодействие слоистых периодических структур с биологическими объектами // Актуальные проблемы биофизической медицины: материалы VI Междунар. симпозиума. – Киев, 2009. – С. 71–72.
7. Поликар А. Поверхность клетки и ее микросреда. – М.: Мир, 1975. – 108 с.
8. Vukusic P., Roy Sambles J. Photonic structures in biology // Nature. – 2003. – Vol.424, №6950. – P. 852–855.

#### References

1. Arkhipkin V.G., Guniakov V.A., Myslivets S.A. *Zhurnal eksperimental'noy i teoreticheskoy fiziki*, 2008, vol.133, no. 2, pp. 447–459.
2. Ilinskiy A.V., Silva-Andrade F., Shadrin E.B., Samoylov V.O., Orbeli A.L. *Biofizika*, 2006, vol.51, no. 4, pp. 743–748.
3. Koltsov N.K. *Organizatsiya kletki* [Organization of the cell]. Moscow, Leningrad, Biomedgiz Publ., 1936, 652 p.
4. Kostetskiy J.Y., Aleksanov S.A. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 1981, vol.260, no. 4, pp. 1013–1018.
5. Liozner L.D. *Izmenenie tkaney i regeneratsiya organov* [Change of tissues and regeneration of organs]. Moscow, Znanie Publ., 1970, 48 p.
6. Petrash V.V., Nikityuk I.E., Kubasov V.A. *Materialy 6 Mezhdunarodnogo Simpoziuma «aktualnyeh probleme biofizicheskoy meditsiny»* (Proc. 6th Int. Symp. «Actual problems of the biophysical medicine»). Kiev, 2009, pp. 71–72.
7. Polikar A. *Poverkhnost kletki i ee mikrosreda* [Surface of the cell and its microenvironment]. Moscow, Mir Publ., 1975, 108 p.
8. Vukusic P., Roy Sambles J. *Nature*, 2003, vol. 424, no. 6950, pp. 852–855.

#### Рецензенты:

Богданов А.А., д.м.н., профессор, старший научный сотрудник научно-исследовательского отдела организации научной деятельности ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова» МЧС РФ, г. Санкт-Петербург;

Марусанов В.Г., д.м.н., профессор кафедры скорой медицинской помощи ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздравсоцразвития РФ, г. Санкт-Петербург.

Работа получена редакцией 25.06.2012.