

Регенерация костной ткани при применении наноимплантов

Т.В. ПАВЛОВА, А.В. НЕСТЕРОВ, Л.А. ПАВЛОВА

ГОУ ВПО НИУ «Белгородский государственный университет»

Bone tissue regeneration in the use of nanoimplants

T.V. PAVLOVA, A.V. NESTEROV, L.A. PAVLOVA

Belgorod State University

Изучали регенераторно-репаративные процессы в костной ткани черепа крыс при использовании имплантов из наноструктурированного титана с разными видами покрытия. Для оценки результатов использовали оптическую, люминесцентную, растровую электронную и зондовую микроскопию. Установлено, что при применении нанобиокомпозитов процессы регенерации костной ткани черепа значительно ускорялись.

Ключевые слова: регенерация, наноимпланты.

The authors studied regenerative and reparative processes in the rat skull bone tissue when nanostructured titanium implants with different types of coating were applied. Optical, luminescence, scanning electron, and probe microscopies were used to assess results. The use of biological nanocomposites was established to considerably accelerate skull bone regeneration processes.

Key words: regeneration, nanoimplants.

В последние десятилетия сфера использования наноматериалов постоянно расширяется. Свое применение они находят и в медицине, в частности в нейрохирургии для восстановления целостности костей черепа [1–3]. Помимо этого, сохраняется необходимость оперативных вмешательств по поводу новообразований головного мозга. Современные подходы к лечению сосудистой патологии также диктуют необходимость хирургических вмешательств с дальнейшим воспроизводством архитектоники тканей [4].

Решение задач, связанных с разработкой искусственных материалов для замещения участков поврежденной или отсутствующей костной ткани, представляет сложную комплексную проблему, поскольку функциональная надежность имплантов в значительной мере зависит от их биологической, биохимической и биомеханической совместимости с костной тканью живого организма [5–10]. При этом перспективным является использование биокомпозитных материалов на основе коллаген-гидроксиапатит-декстрановых компонентов, нанесенных на металлическую подложку в связи с выполнением титаном каркасной и протективной функций [8, 10]. Однако имеющиеся материалы нуждаются в дальнейших разработках. Одной из важнейших проблем после внедрения трансплантата является регенерация костной ткани [2–5]. В связи с этим целью нашего исследования явился анализ влияния различных по своему составу биокомпозитов на основе титана в наноструктурном состоянии на регенерацию костной ткани черепа в экспериментальных моделях.

Материал и методы

В эксперименте использовали 140 крыс-самцов Вистар, которые были разделены на 4 группы по 35 особей в

каждой. В 1-ю группу вошли ложнооперированные животные, во 2-ю — особи, которым был имплантирован композит из нанотитана Grey с пескоструйной обработкой без покрытия, в 3-ю — животные, которым вводили композит из нанотитана Grey с пескоструйной обработкой с одним слоем покрытия (композиционный препарат, в состав которого входил желатин и высокомолекулярный декстран), в 4-ю — животные, которым имплантирован биокомпозит из нанотитана Grey с пескоструйной обработкой с двумя слоями покрытия (1-й — желатин, декстран, 2-й — гидроксиапатит, коллаген, декстран). Проведение эксперимента и содержание животных соответствовали общепринятым стандартам. В условиях передозировки эфирного наркоза подопытных животных выводили из эксперимента через 1, 2, 4, 6, 9, 12 нед наблюдения.

Проведено макроскопическое описание с количественной оценкой. Срезы, окрашенные гематоксилином и эозином, изучали с использованием светового микроскопа Topic-T («Ceti-T»). Образцы, обработанные родамином, фотографировали в флуоресцентном микроскопе Микмед-6, вариант 11. Для растровой электронной микроскопии пробы фиксировали в стандартном глутаровом фиксаторе, а затем фотографировали и проводили морфометрический анализ с использованием микроскопа FEI Quanta 200 3D. Для атомно-силовой микроскопии исследовали образцы и выполняли морфометрический анализ с помощью сканирующего зондового микроскопа Ntegra-Aura.

Результаты

У ложнооперированных животных диаметр послеоперационного дефекта через 1 нед после операции соста-

Таблица 1. Особенности регенерации костной ткани при введении разных композитов

Показатель	1-я неделя				6-я неделя				12-я неделя			
	Г2	Г3	Г4	Г2	Г3	Г4	Г2	Г3	Г4	Г2	Г3	Г4
Демаркационная зона воспаления, мм	1,4±0,4	1,6±0,35	1,8±0,33	0,6±0,11*	—	—	—	—	—	—	—	—
Высота вновь образованной ткани над поверхностью кости черепа, мм	0,5±0,3	0,9±0,23*	1,2±0,2*	1,3±0,29*	1,4±0,25*	1,5±0,01*	1,4±0,3*	1,5±0,24*	1,7±0,2*	—	—	—
Покрытие вновь образованной тканью имплантата, мм	$(0,3±0,02) \times (0,1±0,01)^*$	$(1,0±0,2) \times (0,4±0,1)^*$	$(2,0±0,3) \times (0,4±0,08)^*$	$(1,8±0,21) \times (3,8±0,1)^*$	$(2,1±0,25) \times (4,2±0,08)^*$	$(2,6±0,2) \times (4,5±0,05)^*$	+	+	+	+	+	+
Соединение ткани с композитом, %	30±15	46±10*	60±5*	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Примечание. Здесь и в табл. 2: Г2, Г3, Г4 — группы животных 2, 3 и 4-я соответственно; + — имплант полностью покрыт вновь образованной тканью по всей поверхности; * — $p > 0,05$.

Таблица 2. Особенности регенерации костной ткани при введении разных видов композитов

Показатель	1-я неделя				6-я неделя				12-я неделя			
	Г2	Г3	Г4	Г2	Г3	Г4	Г2	Г3	Г4	Г2	Г3	Г4
Соединительная ткань по периферии, мм	0,16±0,035	0,17±0,024	0,18±0,016	0,18±0,03	0,19±0,02*	0,2±0,01*	—	—	—	—	—	—
Размер вновь образованной ткани, мм	0,056±0,002	0,07±0,001	0,08±0,007*	0,09±0,002*	0,095±0,001*	0,10±0,007*	+	+	+	+	+	+
Расстояние между центром имплантата и тканью, мм	—	—	—	—	—	—	0,187±0,02*	0,15±0,01*	0,098±0,008*	—	—	—
Толщина вновь образованной ткани, мм	—	—	—	0,037±0,03*	0,049±0,02*	0,113±0,01*	1,167±0,029*	1,284±0,019*	1,396±0,008*	—	—	—

Примечание. * — $p > 0,05$; + — вновь образованная ткань полностью покрывает поверхность имплантата.

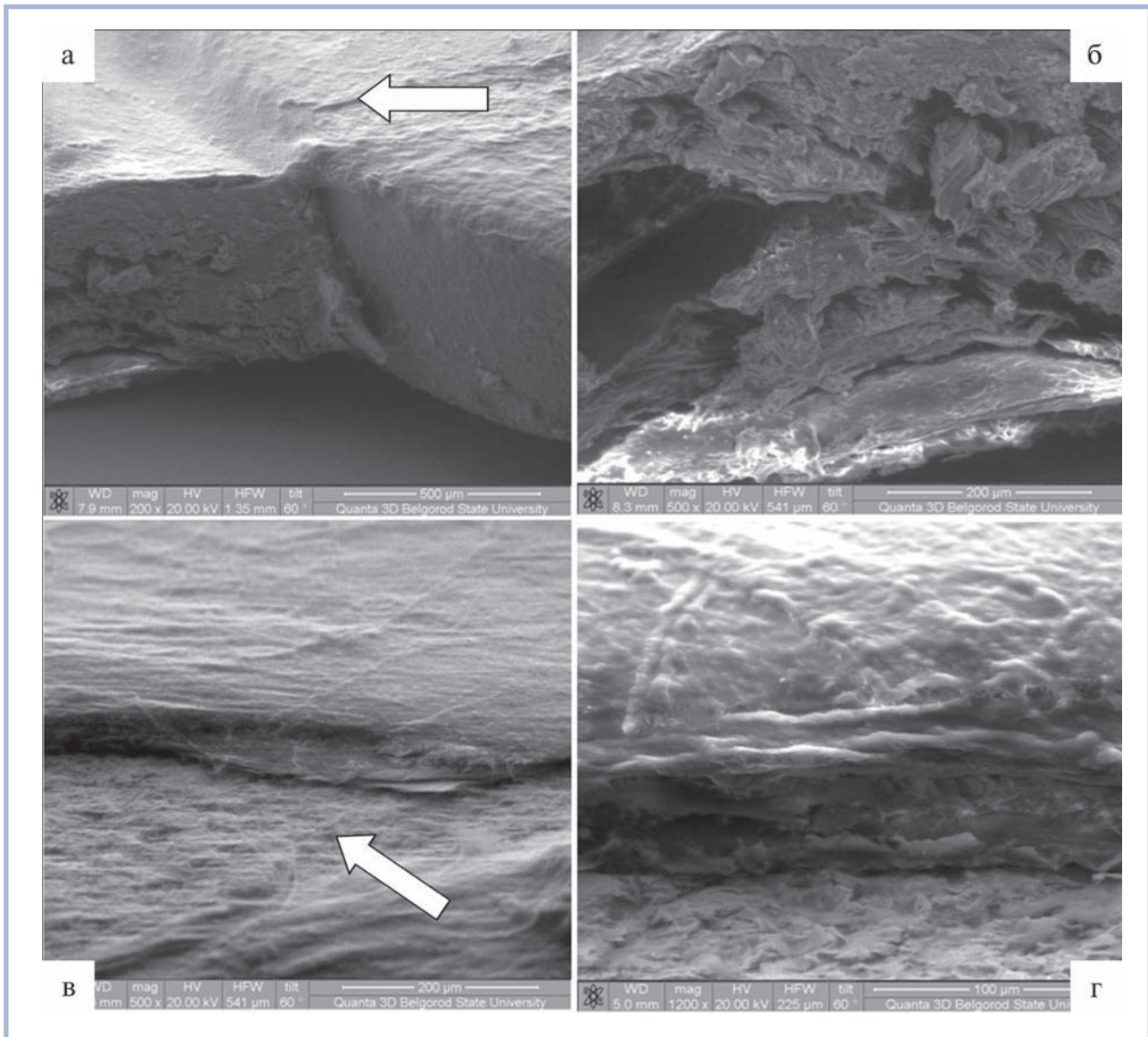


Рис. 1. Наноимплант с двумя слоями покрытия: 12-я неделя экспозиции.

а — фрагмент наноимпланта с вновь образованной тканью над имплантом (стрелка), а также между имплантом и матрицовой костью. $\times 200$; б — часть фрагмента рис. 1, а. $\times 500$; в — вновь образованная ткань под имплантом (стрелка со стороны головного мозга). $\times 500$; г — часть фрагмента рис. 1, в. $\times 1200$.

вил $5,1 \pm 0,3$ мм, к концу 2-й недели — $5,3 \pm 0,15$ мм и к 12-й неделе уменьшился до $2,0 \pm 0,05$ мм, но полного закрытия дефекта не происходило. Ширина демаркационной зоны в 1-ю неделю после операции составляла $1,3 \pm 0,4$ мм, к 9-й неделе данная зона исчезла. Высота вновь образованной ткани над поверхностью кости черепа с 1-й по 4-ю неделю увеличивалась с $0,15 \pm 0,28$ мм до $1,2 \pm 0,15$ мм соответственно, а затем к 12-й неделе уменьшалась до $0,7 \pm 0,07$ мм.

Через 1 нед в зоне операции у животных 1-й группы определялись незначительные некротизированные участки костной ткани, скопления лимфоидных клеток, эритроцитов, нитей фибрина. Альтеративные и воспалительные процессы исчезали через 4–6 нед. К концу 1-й недели начинала формироваться грануляционная ткань. К 4-й неделе был сформирован каркас из эластичных и коллаге-

новых волокон, который постепенно заполняет костный дефект. К 9-й неделе дефект от периферии к центру постепенно заполнялся сначала грубоволокнистой, а затем и молодой костной тканью. Постепенно там формировались кровеносные сосуды. На поперечном срезе наблюдалась преимущественно грубоволокнистая ткань с отдельными сосудами толщиной до $0,45 \pm 0,05$ мм. С помощью люминесцентной микроскопии по краю интактной кости в месте оперативного вмешательства определялась активация обменных процессов.

При исследовании образцов имплантов у животных 2-й группы (наноимплант без покрытия) оказалось, что ширина ободка демаркационной зоны воспаления через 1 нед после операции составляла $1,4 \pm 0,4$ мм, через 2 нед — $2,1 \pm 0,25$ мм, и прогрессивно снижаясь к 6-й неделе ($0,6 \pm 0,11$ мм), исчезала через 12 нед (табл. 1). Высота

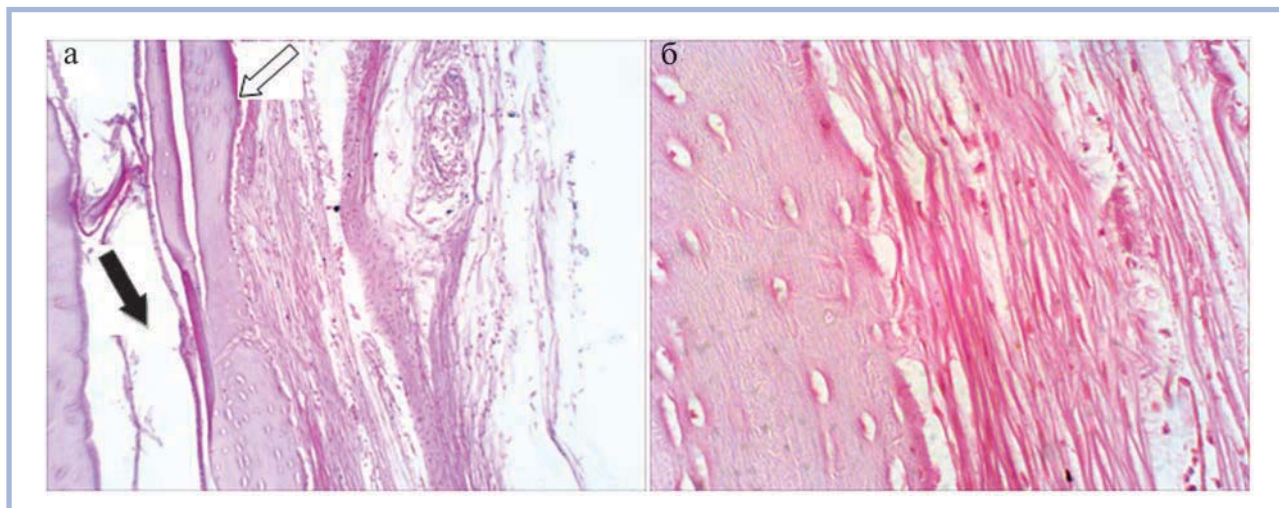


Рис. 2. Наноимплант с двумя слоями покрытия: 12-я неделя экспозиции.

а — вновь образованная костная ткань над имплантом (светлая стрелка), а также между имплантом и матриксовой костью, ложе импланта (черная стрелка). $\times 140$; б — часть фрагмента рис. 2, а. $\times 400$. Окраска гематоксилином и эозином.

вновь образованной ткани над поверхностью матриксовой кости увеличивалась от 1-й ($0,5 \pm 0,3$ мм) до 12-й недели ($1,4 \pm 0,3$ мм). Покрытие импланта вновь образованной мезенхимальной тканью на 1-й неделе составило $(0,3 \pm 0,02) \times (0,1 \pm 0,01)$ мм, через 12 нед имплант был покрыт полностью.

Во 2-й группе ширина соединительной ткани по периферии импланта составляла $0,16 \pm 0,035$ мм и к 12-й неделе вновь образованная соединительная ткань полностью покрывала поверхность импланта (табл. 2).

К 30-м суткам во 2-й группе образцов между матриксовой костью и имплантом сформировались взаимосвязи из нескольких видов тканей — это фиброзная ткань, которая является основой для располагающихся среди нее островков хрящевой ткани. Здесь определялись и вновь образованные сосуды, обнаруживались поля хрящевой ткани неравномерной величины, которые переходили в сеть костных трабекул. Балки располагались хаотично и вытесняли хрящевую ткань. Наиболее четко этот процесс прослеживался к 6-й неделе экспозиции, особенно при наличии биокомпозитов. Вновь образованная ткань снаружи была покрыта хорошо контурированной надкостницей. Остеобласты клеточного слоя лежали преимущественно orderly, последовательно. Компактное вещество костной ткани матриксовой кости имело обычное строение. Остеобласты располагались в полостях. Поверхность над имплантом к 9-й неделе была представлена костной тканью. Определялись компактная кость с грубоволокнистыми костными трабекулами и фрагменты пластинчатой кости. Выявлены новообразованные остеоны. Расстояние между центром импланта и вновь образованной тканью через 9 нед составляло $0,45 \pm 0,028$ мм. К 12-й неделе уменьшилось до $0,187 \pm 0,02$ мм. Регенерирующая ткань полностью заполнила просвет между матриксовой костью и имплантом к 12-й неделе. Через 12 нед она была представлена костной тканью (рис. 1).

При изучении регенерации костной ткани у животных 3-й группы (наноимпланты с одним слоем покрытия) оказалось, что ширина ободка демаркационной зоны вос-

паления через 1 нед составляла $1,6 \pm 0,35$ мм, и к 6-й неделе снижалась более прогрессивно, чем во 2-й группе, и отсутствовала на поздних сроках (см. табл. 1). Высота вновь образованной ткани над поверхностью матриксовой кости также увеличивалась с $0,9 \pm 0,23$ мм к концу 1-й недели до $1,5 \pm 0,24$ мм к 12-й неделе. На 1-й неделе имплант был покрыт мезенхимальной тканью на $(1,0 \pm 0,2) \times (0,4 \pm 0,1)$ мм, и полностью — через 12 нед. Ширина соединительной ткани по периферии импланта составляла $0,17 \pm 0,024$ мм. К 12-й неделе вновь образованная ткань полностью покрывала поверхность биокомпозита, что наглядно отражает ускорение процессов регенерации по сравнению со 2-й группой (см. табл. 2).

При изучении регенерации костной ткани в 4-й опытной группе, в которой применялся нанотитан с двумя слоями покрытия, установлено, что ширина ободка демаркационной зоны воспаления через 1 нед составляла $1,8 \pm 0,33$ мм, и к 6-й неделе снижалась более прогрессивно, чем во 2-й группе (см. табл. 1). Высота вновь образованной ткани над поверхностью матриксовой кости также увеличилась от $1,2 \pm 0,2$ мм на 1-й неделе до $1,7 \pm 0,2$ мм к 12-й неделе. Покрытие импланта с $(2,0 \pm 0,3) \times (0,4 \pm 0,08)$ мм на 1-й неделе увеличилось до $(2,6 \pm 2,0) \times (4,5 \pm 0,05)$ к 6-й неделе, а к 12-й неделе имплант был полностью покрыт (рис. 2). Соединительная ткань по периферии импланта на 1-й неделе составляла $0,18 \pm 0,016$ мм и к 12-й неделе вновь образованная ткань полностью покрывала поверхность биокомпозит, что наглядно отражает ускорение процессов регенерации по сравнению с остальными экспериментальными группами. Мы исследовали метаболическую активность с помощью окраски роданиновым красным и просмотром с использованием люминесцентного микроскопа. Выявлена высокая активность по периферии вновь образованной волокнистой ткани, которая была выше в группах с применением наноимплантов и максимальной при применении двойного покрытия нанотитана Grey. Через 12 нед выявлено активное свечение во вновь образованной ткани над имплантом, что получило наибольшую выраженность в группах с биокомпозитом.

Таким образом, наличие покрытия из коллаген-гидроксипатитно-декстранового соединения увеличивает скорость процессов регенерации. Это связано с созданием

депо ионов кальция. Такой наноимплант выполняет опорную функцию для вновь образованной ткани за счет коллаген-декстранового компонента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Павлова Л.А., Нестеров А.В., Бокова Е.Н., Немыкин О.Н., Павлова Т.В. Анализ структуры тяжелой черепно-мозговой травмы, тактики оперативного вмешательства и вариантов выполнения краниопластики. *Фунд. исслед.* 2009; 10: 25–7.
2. Павлова Т.В., Нестеров А.В., Павлова Л.А., Жерновой М.Г. Черепно-мозговая травма у пациентов пожилого возраста и способы ее коррекции (клинико-экспериментальное исследование). *Научные ведомости БелГУ.* 2010; 22 (93) Выпуск 12/1: 78–82.
3. Pavlova T.V., Pavlova L.A., Bokova E.N., Pavlov I.A., Nemykin O.N., Nesterov A.V. Traumatic brain injury: structure, tactics of operative operation (clinically-experimental research). *Eur. J. Natural History.* 2010; 4: 4–7.
4. Чехонацкий А.А. Современные вопросы консервативного и хирургического лечения нарушений мозгового кровообращения. *Ремедиум Приволжье.* 2009; 9: 52–4.
5. Павлова Л.А., Кривецкий В.В., Нестеров А.В., Павлова Т.В. Характеристика репаративных процессов при применении биокомпозитов, содержащих ввр-2 на основе имплантов наноструктурного титана на ранних стадиях регенерации. Системный анализ и управление в биомедицинских системах. 2010; 9 (1): 200–3.
6. Павлова Л.А., Павлова Т.В., Нестеров А.В., Колесников Д.А., Гончаров И.Ю., Жерновой М.Г. Морфологический анализ костного дефекта при использовании импланта титана, обработанного пескоструйным методом с различными композитными покрытиями в динамике первого месяца регенерации. *Научные ведомости БелГУ.* 2010; 4 (75) Выпуск 9: 58–63.
7. Павлова Л.А., Павлова Т.В., Нестеров А.В. Современное представление об остеоиндуктивных механизмах регенерации костной ткани. Обзор состояния проблемы. *Научные ведомости БелГУ.* 2010; 10 (81) Выпуск 10: 5–11.
8. Павлова Т.В., Мезенцев Ю.А., Павлова Л.А., Нестеров А.В., Колесников Д.А. Особенности регенерации костной ткани при введении коллагеново-гидроксипатитных нанокомпозитов *Фунд. исслед.* 2009; 8: 25–8.
9. Gomoll A.H., Fitz W., Scott R.D., Thornhill T.S., Bellare A. Nanoparticulate fillers improve the mechanical strength of bone cement. *Acta Orthop.* – 2008; 79(3): 421–7.
10. Tanaka K., Tamura J., Kawanabe K., Nawa M., Oka M., Uchida M. et al. Ce-TZP/Al₂O₃ nanocomposite as a bearing material in total joint replacement. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002; 63: 262–70.

Поступила 12.11.2012