

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КОСТНОЙ ТКАНИ ПРИ ВВЕДЕНИИ КОЛЛАГЕНОВО-ГИДРОКСИАПАТИТНЫХ НАНОКОМПОЗИТОВ

**Т.В. Павлова¹, Ю.А. Мезенцев¹
Л.А. Павлова¹, В.В. Кривецкий²
И.А. Павлов¹, С.В. Паначев³**

*1) Белгородский
государственный
университет*

*2) Медицинский колледж
Белгородского государственного
университета*

*3) Белгородский
онкологический
диспансер*

e-mail: pavlova@bsu.edu.ru

Эксперимент выполняли на 100 крысах линии "Вистар" массой 200-250 грамм. В 8 группах проводили операцию с формированием костного дефекта и имплантацию в него гидроксиапатит-коллагеновых композитов, полученных при помощи нанотехнологий. В двух группах проводили операцию с формированием костного дефекта без заполнения композитом. Через 7 и 21 день исследовали ультраструктуру места имплантации. Был выявлен наиболее лучший композит.

Ключевые слова: имплантация, нанотехнологии, гидроксиапатит, коллаген, ультраструктура.

Поиск новых способов повышения эффективности приживаемости костных имплантов является одной из важнейших задач в ортопедии, хирургии и стоматологии [1]. Наиболее перспективным направлением в остеосинтезе является использование наноматериалов [2, 4]. Благодаря своим особым свойствам наноматериалы и нанокompозиты, включающие наночастицы, обладают большей прочностью, гибкостью, химической устойчивостью. Основным камнем преткновения в развитии этого направления является недостаточно отработанный механизм оценки безопасности и эффективности использования нанокompозитов. Для использования наноматериалов требуются уникальные оценки риска, учитывая новизну и разнообразие продуктов, высокую подвижность и реакционную способность проектируемых наночастиц [3, 5]. Исследования коллаген-гидроксиапатитной матрицы, имитирующей структуру и химические свойства природной костной ткани являются уникальными не только в Российском, но и международном масштабе.

В Государственном учреждении Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Российской академии медицинских наук были разработаны экспериментальные модели нанокompозитов, состоящие из нанокollагена и наногидроксиапатита в различной концентрации.

Задачами научно-исследовательской лаборатории «Экоморфологии» кафедры патологии медицинского факультета Белгородского государственного университета являлось:

- изучение морфофункциональных особенностей регенерации костной ткани при внедрении различных видов нанокompозитов;
- сопоставление различных видов композиционных материалов на основе гидроксилапатита и коллагена с целью поиска оптимальных моделей;
- изучение общей реакции организма на введение композиционных материалов;
- на различных структурных уровнях изучение морфологических особенностей регенераторных процессов костной ткани при применении аллотрансплантатов.



Материалы и методы

Эксперимент выполняли на 100 крысах-самцах линии "Вистар" массой 200-250 г, которые были разделены на 10 групп.

Ввиду инновационности исследования, нам предстояло самостоятельно выбрать участок для имплантации. Наиболее подходящим участком для этих целей с нашей точки зрения можно считать зону теменной кости. Причинами выбора места для имплантации были:

1. Легкая доступность места вмешательства.
2. Невозможность подопытным животным удаления или смещения имплантата.
3. Исключение возможности «несанкционированной», т.е. не обусловленной условиями эксперимента, нагрузки на имплантат.
4. Интерес изучения возможного воздействия на ЦНС подопытного животного имплантата.

Таблица 1

Сводные данные групп прооперированных животных

Группы	Вид экспозиции	Длительность последствий	Количество животных
1 группа	Оперативное внедрение смеси желатин –ГАП-декстран	7 дней	10
2 группа	Оперативное внедрение смеси желатин –ГАП-декстран	21 день	10
3 группа	Оперативное внедрение смеси коллагена СРН926 «Имтек»	7 дней	10
4 группа	Оперативное внедрение смеси коллагена СРН926 «Имтек»	21 день	10
5 группа	Оперативное внедрение смеси коллаген 2,0 г/л, ГАП-18% «Имтек»	7 дней	10
6 группа	Оперативное внедрение смеси коллаген 2,0 г/л, ГАП-18% «Имтек»	21 день	10
7 группа	Оперативное внедрение смеси коллаген 2,5 г/л, ГАП-15% «Имтек»	7 дней	10
8 группа	Оперативное внедрение смеси коллаген 2,5 г/л, ГАП-15% «Имтек»	21 день	10
9 группа	Оперированные животные без введения композита	7 дней	10
10 группа	Оперированные животные без введения композита	21 день	10

В условиях общего обезболивания ингаляцией паров эфира после выстригания волосяного покрова и туалета операционного поля раствором йодоната производился разрез мягких тканей до кости. Кость скелетировалась распатором на площади необходимой для размещения имплантата. В связи с тонкостью кости трифинация черепа производилась брюшистым скальпелем. Из образованного отверстия микрокусачками выполнялась частичная резекция кости с образованием дефекта свода черепа. Гемостаз осуществляли тампонадой ватниками, смоченными 3% раствором перекиси водорода. В условиях «сухой» раны на костный дефект располагался композит без жесткой фиксации. Рана ушивалась наглухо. Туалет раны осуществлялся раствором бриллиантового зеленого без наложения защитной повязки. Профилактика гнойных осложнений осуществлялась соблюдением правил асептики и антисептики. Животных выводили из опыта через 7 и 21 суток посредством передозировки эфирного наркоза. На аутопсии для гистологического исследования из черепа вырезались прооперированные участки 0,5х0,5 см³, которые затем фиксировали в 10% нейтральном формалине.

Для световой микроскопии тканевые образцы проводили через спирты возрастающих концентраций и заключали в парафин, затем на микротоме готовили срезы с последующей окраской их гематоксилином и эозином. Для сканирующей электронной микроскопии образцы промывали в 2-3 пробах изотонического раствора натрия хлорида. В последней его порции образцы держали в течение 2-3 часов при комнатной



температуре. После этого пробы опускали в 37° фиксирующую смесь: 2% глутаральдегид на 0,15 М фосфатном буфере с pH 7,2-7,4 и затем просматривали в растровом микроскопе FEI Quanta 200 3D.

Результаты исследования

Все прооперированные животные сохранили жизнеспособность до конца исследования. В группах с введением нанокompозитов уже через четыре часа были восстановлены двигательная активность и пищевое поведение. За время проведения эксперимента животные не болели, внешний вид за исключением шва в теменной области соответствовал неоперированным особям. Несколько отличалось поведение оперированных животных без введения нанокompозита. Двигательная активность и пищевое поведение были восстановлены только через 12 часов, однако еще в течение 7 суток оно значительно отличалось от животных, у которых дефект был заполнен нанокompозитом. По истечении 21 суток поведение всех животных было полностью стандартным.

При изучении прооперированных участков в группах с введением нанокompозитов с 7 дневной экспозицией нами была получена следующая картина. Макроскопически отмечено срастание краев кожного лоскута путем первичного натяжения. Отечность тканей практически отсутствует. Полнокровие умеренно выраженное. Достаточно четко выражена зона демаркационного воспаления. Оперированный участок светло-коричневого цвета. Микроскопически было показано начало формирования четкой капсулы вокруг импланта. В жировой клетчатке отмечался умеренный отек, слабая инфильтрация нейтрофильными лейкоцитами и макрофагами. В их цитоплазме иногда видны мелкие гранулы фагоцитированного композита. В образце видны многочисленные фрагменты гидроксиапатита. Часть таких образований делятся на еще более мелкие фрагменты, либо подвергаются распаду. Помимо этого, в импланте видны фрагменты коллагеновых волокон. Имплант пронизан тяжами грануляционной ткани. Вокруг импланта тяжи имели относительно зрелый характер и формировали тонкую соединительно-тонкую капсулу. В тяжах, прорастающих вглубь импланта, ткань менее зрелая, она содержит большое количество макрофагов и единичных многоядерных гигантских клеток, окружающих фрагменты коллагена и скопления гидроксиапатита и принимающая участие в их резорбции. Часто вокруг фрагментов коллагена образуется самостоятельная тонкая микрокапсула. В грануляционной ткани, прорастающей имплант, кроме макрофагов видны новообразованные сосуды калибра капилляров и тяжи пролиферирующих фибробластов. Электронномикроскопически выявлено, что появляются отдельные фибробласты. Внутри композита видны нити четко контурированного коллагена, расположенного внутри гидроксиапатита. Вокруг импланта появляются отдельные новообразованные капилляры, размножающиеся почкованием из предшествующих. Наблюдается начало образования сосудов внутри импланта. Фибробласты в большей степени выражены в области капсулы. Содержание эритроцитов не велико. Обнаруживаются отдельные нейтрофилы и макрофаги, окружающие фрагменты импланта. Снаружи имплант покрывается тонкой надкостницей.

Нами было выявлено, что из представленных образцов процессы репарации протекали лучше всего вокруг нанокompозитов «смесь коллаген 2,0 г/л, гидроксиапатит-18% Имтек» и «смесь коллаген 2,5 г/л, гидроксиапатит 15% Имтек». При изучении самого композита в нем выявлено большее содержание коллагена, который является хорошим связывающим звеном между гидроксиапатитом и костями черепа. Асептическое воспаление здесь выявлено в меньшей степени, чем в первом образце. В лучшей степени в данной группе определяется начинающаяся формироваться фиброзная капсула, как и замена нанокompозита мезенхимальной тканью. Быстрее идет растворение гидроксиапатита.

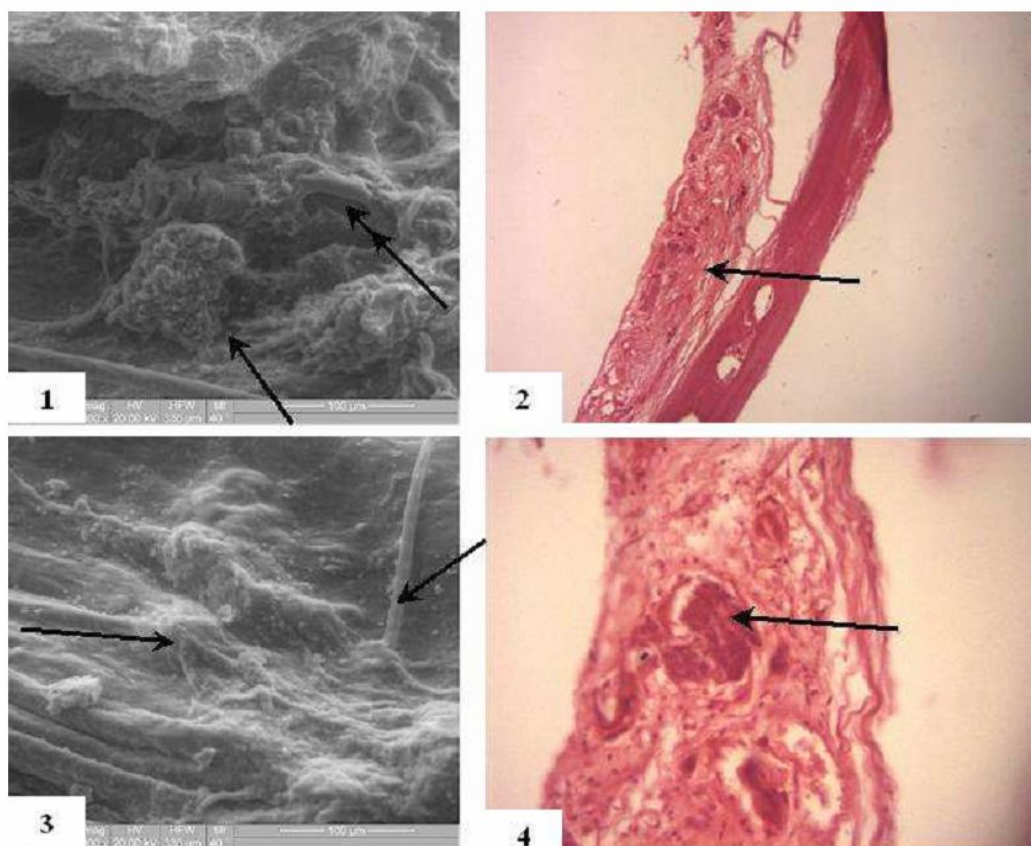


Рис. 1. Оперативное внедрение «смесь collagen 2,0 г/л, ГАП-18%». н. Экспозиция 21 день

К 21-му дню макроскопически снаружи уже виден шов, заросший путем первичного натяжения. При вскрытии кожного лоскута место оперативного дефекта, заполненного нанокompозитами «смесь collagen 2,0 г/л, гидроксиапатит-18% Имтек» и «смесь collagen 2,5 г/л, гидроксиапатит 15% Имтек» почти не отличалось от окружающих участков, в остальных группах было малозаметным. Композит покрывала хорошо сформированная накость с собственными сосудами. Микроскопически отсутствует граница между имплантом и окружающей костной тканью, что рассматривается нами как остеоинтеграция. Гидроксиапатит практически полностью резорбирован макрофагами. В их цитоплазме иногда видны мелкие гранулы фагоцитированного композита. Композит почти полностью замещен грануляционной тканью и collagenовыми волокнами и заселен фибробластами костной ткани. В периферических отделах наблюдались клетки росткового уровня костной системы: остеобласты, остециты, остеокласты. Начинается оссификация импланта по периферии. В импланте имеются новообразованные collagenовые волокна, располагающиеся рыхло и беспорядочно с межклеточным матриксом. Вокруг и внутри импланта развитая сеть новообразованных сосудов. Электронномикроскопически выявлены единичные, без четких контуров остатки гидроксиапатита. Collagenовые волокна композита разволокненные, наполовину разрушенные макрофагами. Значительно отличаются от них появившиеся короткие тонкие нити новообразованного collagenа, который в большом количестве присутствует в композите. Композит покрыт хорошо развитой надкостницей. Внутри импланта появились отдельные новообразованные капилляры. Сосудистая сеть вокруг импланта полностью восстановлена. Фибробласты густо заселили периферические части композита и в небольшом количестве присутствуют в центральных частях (рис. 1).



1. В композите наблюдаются остатки ГАП (стрелка) и частично разрушенные коллагеновые волокна с фиброзной и грануляционной тканью (двойная стрелка) Композит пророс коллагеновой и грануляционной тканью. РЭМ. Ув. × 1200.

2. Композит (указано стрелкой) почти полностью замещен мезенхимальной тканью. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. × 200.

3. Фиброзная капсула с фиброцитами (стрелка) и волокнами. РЭМ. Ув. × 2400.

4. Остаток ГАП в заполненном дефекте. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. × 400.

Из представленных образцов по истечении 21 дня лучше всего костеобразовательные процессы протекали вокруг нанокompозита «смесь коллаген 2,0 г/л, гидроксиапатит-18% Имтек». Также выраженный остеогенезом отличался образец «смесь коллаген 2,5 г/л, гидроксиапатит 15% Имтек», несколько уступая из-за большего количества нерезорбированного коллагена и меньшей активности остеοидного вещества.

При изучении материала, полученного при декапитации группы ложнооперированных животных по истечении 7 и 21 дня после проведенной операции, нами было показано, что морфологическая картина значительно отличалась от групп, где дефект костной ткани был заполнен нанокompозитом.

При изучении прооперированных участков в группе животных без введения композита с 7 дневной экспозицией нами была получена следующая картина. Макроскопически дефект и окружающие ткани были выражено гиперемированы. Сохранялся дефект костной ткани около 90%. Кожный лоскут, покрывающий дефект был отечным. Микроскопически была выявлена выраженная лейкоцитарная и макрофагальная инфильтрация была обнаружена в костной ткани и окружающей клетчатке. Электронномикроскопически были определены участки обширного гемолиза и некроза костной ткани.

Образцы с 21 дневной экспозицией напоминали аналогичное состояние у животных, прооперированных с введением композита через 7 дней. Так, макроскопически это проявлялось в сохранении костного дефекта, его покраснения и отечности окружающих тканей. Следует отметить, что дефект тканей превышал 30%, что было значительно больше, чем в предыдущих группах. Микроскопически нами показано, что в месте оперативного дефекта выявлялись проявления воспаления в виде полнокровия сосудов венозного русла в области подлежащей дермы и подкожной жировой клетчатки. Лейкоцитарная и макрофагальная реакции соответствовали картине образцов с заполнением дефекта нанокompозитом с экспозицией 7 дней. Электронномикроскопически выявлено, что наростая на дефект надкостница была гистологически незрелой. Строение межклеточных контактов нарушено. Наблюдается увеличение просвета между клетками, что также усиливает диapedез и развитие эксудации. Наблюдается начало образования сосудов внутри надкостницы. Начинает формироваться фиброзная капсула. Фибробласты в большей степени выражены в области капсулы. Полость выслана грануляционной тканью, в центре – новообразующиеся коллагеновые волокна и эритроциты. Последние в отдельных участках собираются в тромбы. Часть из эритроцитов – гемолизирована.

Таким образом, регенерация костной ткани при заполнении дефекта нанокompозитами идет значительно быстрее, чем без их применения, что доказывает отсутствие местного токсического влияния нанокompозитов и их остеогенетические свойства. Сохранение нормальной двигательной активности и пищевого поведения указывает на отсутствие общего токсического влияния на организм лабораторных животных. Особенно эффективным с нашей точки зрения является композит фирмы «ИМТЕК «смесь коллаген 2,0 г/л, ГАП-18%».

Литература

1. Васильев М.Г., Снетков А.И., Цуканов В.Е. и др. // Детская хирургия – 2006. – №2. – С. 44-48.
2. Павлова Т.В., Павлова Л.А., Павлов И.А. и др. // Систем. анализ и управл. в биомедицинск. системах. – 2007 Т. 6. № 2. – С. 364-366.



3. Павлова Т.В., Павлова Л.А., Павлов И.А., Кривецкий В.В. и др. // Международ. научно-практическая конференция «Достижения супрамолекулярной химии и биохимии в ветеринарии и зоотехники» – 2008. – Москва. – С. 131-138.

4. Снетков А.И., Лекишвили М.В., Касымов И.А. и др. // Вестн. Травматол. И ортопед. – 2003. – № 4. – С. 103-122.

5. Фарзин Н. И. // Реакция тканей на коллаген и гликозаминогликан – содержащие остеопластические материалы с костным гидроксиапатитом: Автореф. дисс...– 2004. Москва. – 27 с.

MORPHOFUNCTIONAL CONDITION OF THE BONE AT THE INTRODUCTION OF COLLAGEN-HYDROXYAPPATITE NANOCOMPOSITES

**T.V. Pavlova¹, Y.A. Mezentsev¹
L.A. Pavlova¹, V.V. Krivetskiy²
I.A. Pavlov¹, S.V. Panachev³**

*1) Belgorod
State
University*

*2) Medical college of Belgorod
State University*

*3) Belgorod regional oncology
dispanser*

e-mail: pavlova@bsu.edu.ru

Experiment was carried out on 100 rats of line "Wistar" weightning 200-250 gram. In 8 groups rats were operated with formation of bone defect and implantation into it hydroxyapatite-collagen composites received by means of nanotechnologies. In two groups operation was made with formation of bone defect without filling in a composite. After 7 and 21 days ultrastructure of a place of implantation was investigated. The best composite has been revealed.

Key words: implantation, nanotechnologies, hydroxyapatite, collagen, ultrastructure.