

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕАКЦИЙ МЯГКИХ ТКАНЕЙ ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ ТИТАНОВЫХ ИМПЛАНТАТОВ ДЛЯ КРАНИОПЛАСТИКИ. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Мишинов С.В.¹, Копорущко Н.А.¹, Ларионов П.М.², Мухамадияров Р.А.³,
Зайдман А.М.¹, Базлов В.А.¹, Ступак В.В.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, e-mail: nickolai92@mail.ru;

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Новосибирск;

³Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Кемерово

Внедрение трехмерной печати в практическую медицину является важным этапом для реализации концепции персонализированной медицины. Использование индивидуальных имплантатов для закрытия дефектов костей черепа полностью соответствует указанному принципу. Однако в современной научной литературе содержится малое количество данных, описывающих реакции мягких тканей на имплантируемые изделия, полученные методом трехмерной печати. Целью исследования была сравнительная оценка реакций мягких тканей животных, развивающихся в ответ на имплантацию фрагментов титановых пластин для краниопластики, произведенных двумя различными способами: 1) литья, с последующим штампованием и 2) трехмерной печати методом прямого лазерного спекания металла. Исследование проводилось в двух группах: первая была представлена 20 самцами крыс, которым устанавливали фрагменты исследуемых имплантатов в область мягких тканей спины; вторая группа состояла из 10 самцов новозеландских белых кроликов, которым проводили имитацию операции по закрытию дефектов костей черепа с применением титановых имплантатов, полученных двумя различными способами – штампования и трехмерной печати. В группах с различными типами имплантируемых изделий морфологические локальные реакции мягких тканей были однотипны и проходили через стадии локального асептического воспаления, формирования рыхлой соединительной ткани с последующим образованием зрелого соединительнотканного рубца. В случаях имплантации изделия, полученного методом трехмерной печати, отмечалось максимальное сцепление тканей с ним по сравнению с гладким стандартным имплантом, в результате чего регенеративные процессы протекали быстрее. Значительно выраженная биологическая фиксация между индивидуальным шероховатым имплантатом и прилегающими мягкими тканями в сравнении со стандартным гладким имплантатом приводит к максимальному сцеплению тканей с имплантатом, ускорению регенеративных процессов и формированию зрелого соединительнотканного рубца.

Ключевые слова: нейрохирургия, краниопластика, трехмерная печать, морфологическое исследование, реакция на имплантат, сканирующая электронная микроскопия.

MORPHOLOGICAL EVALUATION OF TISSUE REACTION RESPONSE TO THE TITANIUM IMPLANTS FOR CRANIOPLASTY. EXPERIMENTAL STUDY

Mishinov S.V.¹, Koporushko N.A.¹, Larionov P.M.², Mukhamadiyarov R.A.³,
Zaydman A.M.¹, Bazlov V.A.¹, Stupak V.V.¹

¹Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics n.a. Ya.L. Tsivyan, Novosibirsk, email: nickolai92@mail.ru;

²Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk;

³Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Disease Russian Academy of Medical Sciences, Kemerovo

The introduction of three-dimensional printing into practical medicine is an important stage for the implementation of the concept of personalized medicine. The use of individual implants for the skull reconstruction fully complies with this principle. However, the current scientific literature contains a small amount of data describing tissue reactions to implantable products obtained by three-dimensional printing. The aim of the study was to compare the systemic and local tissue reactions that develop in response to the implantation of fragments of titanium plates for cranioplasty, produced by two different ways: 1) casting, followed by stamping and 2) three-dimensional printing by direct metal laser sintering. The study was conducted

in two groups: the first was represented by twenty male rats who were fitted with fragments of the studied implants in the area of the soft tissues of the back; the second group consisted of ten male New Zealand white rabbits who were simulated operations to close the defects of the skull bones using titanium implants obtained by two different methods – stamping and three-dimensional printing. In groups with different types of implantable products, morphological local reactions of soft tissues were the same and went through the stages of local aseptic inflammation, the formation of loose connective tissue, followed by the formation of a mature connective tissue scar. In cases of implantation of a product obtained by three-dimensional printing, the maximum adhesion of tissues to it was noted, compared to a smooth standard implant, as a result of which the regenerative processes were faster. Significantly pronounced biological fixation between an individual rough implant and adjacent soft tissues, in comparison with a standard smooth implant, leads to maximum adhesion of tissues to the implant, acceleration of regenerative processes and the formation of a mature connective tissue scar.

Keywords: neurosurgery, cranioplasty, three-dimensional printing, morphological examination, tissue response, scanning electron microscopy.

Краниопластика – операция, направленная на восстановление утраченной части черепа пациента. Несмотря на ее многовековую историю и неизменность концептуальных принципов самого хирургического вмешательства, по мнению многих авторов, она является актуальной современной проблемой [1–3]. Интерес к подобного рода операциям поддерживается не только эволюцией взглядов [4] на оказываемые клинические эффекты [5–7], но и поиском «идеального имплантата» для закрытия дефекта. За всю историю их было проанализировано огромное множество: от подручных материалов древнейших цивилизаций [8] и отливаемых инками золотых пластин [9] до современных высокотехнологичных полимеров, используемых в аэрокосмической промышленности [3, 10]. Как итог в арсенале современного нейрохирурга имеется внушительный арсенал: PMMA (полиметилметакрилат), PEEK (полиэфирэфиркетон), HA (гидроксипатит), TiAlV (титановый сплав), PE (полиэтилен), TSP (трикальцийфосфат), тканое синтетическое волокно (Codubix®), PU (полимеры полиуретанового ряда). За последние 20 лет в России разработано и введено в клиническую практику два полимерных материала для краниопластики: «Реперен» [11] и «Рекост» [12]. Тем не менее поиск новых материалов и способов изготовления имплантатов продолжается, и в наши дни он обусловлен еще одним фактором – появлением аддитивного производства. Трехмерная печать меняет промышленные парадигмы, что не может не сказываться и на медицинской отрасли. Уже сейчас в промышленных трехмерных принтерах доступно использование двух биосовместимых материалов [13–15]: титанового сплава (TiAlV) и полиэфирэфиркетона (PEEK), что реализовалось в создании индивидуальных медицинских изделий [16–18], в том числе и для проведения реконструктивных операций на костях черепа [19–21]. В связи с этим требуются исследования, направленные на анализ эффектов, оказываемых биосовместимыми имплантатами, полученными методом трехмерной печати.

Целью исследования была сравнительная оценка местных реакций мягких тканей животного, развивающихся в ответ на имплантацию фрагментов титановых пластин для краниопластики, произведенных двумя различными способами: 1) литья, с последующим

штампованием и 2) трехмерной печати методом прямого лазерного спекания металла (DMLS – Direct Metal Laser Sintering).

Исследование состояло из двух блоков: 1) в группе № 1 животным (крысам) изделия имплантировали подкожно в области спины; 2) в группе № 2 животным (кроликам) проводили симуляцию краниопластики – формировали дефект костей черепа, который затем закрывали с помощью указанных изделий.

Материалы и методы исследования

Экспериментальное исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «Новосибирский НИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России (протокол № 094/17-1 от 06.12.2017), проводилось в соответствии с приказом Минздрава России от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики», а также в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях: EST № 123 от 18 марта 1986 г., Страсбург.

Типы имплантатов

Каждому испытуемому животному в ходе хирургического вмешательства устанавливали два типа изделий из титан-алюминий-ванадиевого (TiAlV) сплава (далее по тексту – титановые имплантаты), отвечающих ГОСТу Р ИСО 5832-3-2014 [22] «Имплантаты для хирургии. Металлические материалы»: фрагмент стандартного литого штампованного имплантата для краниопластики, имеющего гладкую поверхность, и имплантат, имеющий шероховатую поверхность, изготовленный по технологии прямого лазерного спекания металла (DMLS) на принтере EOS 290 из порошка титанового сплава с размером частицы от 20 до 45 мкм.

Группы исследования, сроки наблюдения, методика хирургических вмешательств, вывод из эксперимента

Группа № 1 была представлена 20 самцами крыс породы «Вистар», возрастом 3 месяца, весом 200–250 г, разделенных на три подгруппы исходя из сроков наблюдения (табл. 1). Техника имплантирования была следующей: испытуемое животное наркотизировали раствором золетил-100 из расчета 30 мг/кг внутривенно. После наступления глубокого сна на спине выбривали и обрабатывали спиртовым раствором поля хирургических вмешательств. Первым этапом в области грудопоясничного отдела позвоночника, парамедианно справа производили разрез мягких тканей до апоневроза длиной 2 см. Здесь же формировали подкожный карман, в который укладывали и фиксировали за отверстия нерассасывающейся нитью 2/0 к апоневрозу и мышцам спины фрагмент стандартного штампованного титанового имплантата. Далее выполняли гемостаз, кожу ушивали внутрикожным швом синтетической рассасывающейся нитью 5/0, накладывали асептическую повязку.

Второй этап операции выполняли аналогично первому, при этом разрез мягких тканей производили в области грудопоясничного отдела позвоночника парамедианно слева. В сформированный карман укладывали титановый имплантат, полученный методом трехмерной печати, и фиксировали к апоневрозу и мышцам нерассасывающейся нитью 2/0 за специальные фиксационные отверстия. После выполненных хирургических вмешательств животных наблюдали в условиях вивария. Вывод животных из эксперимента производили путем ингаляции избытка углекислоты в течение 15 мин, после чего выполняли забор мягких тканей из области хирургического вмешательства с установленными имплантатами единым блоком для дальнейшей морфологической оценки.

Таблица 1

Количество животных на сроках наблюдения в группах

Группы животных	7 суток	14 суток	60 суток	Итого
№ 1 (крысы)	6	7	7	20
№ 2 (кролики)	3	2	5	10

Примечание: сравнительный анализ между группами не проводился.

Группа № 2 была представлена 10 самцами новозеландских белых кроликов, возрастом 4 месяца, весом 3000–3500 г, разделенных на три подгруппы исходя из сроков наблюдения (табл. 1). Техника имплантирования была следующей: испытуемое животное наркотизировали тиопенталом натрия 1000 мг, разведенным на 10 мл 0,9% NaCl из расчета 0,2 мг на 1 кг, через ушную вену. После наступления глубокого сна выбривали и обрабатывали спиртовым раствором поле хирургического вмешательства. Разрез мягких тканей выполняли на своде черепа по средней линии длиной 3,5–4 см, далее производили скелетирование лобной и теменных костей с двух сторон. Края раны фиксировали ранорасширителем Янсена. При помощи высокооборотной дрели с наборами лепестковых фрез парамедианно в левой и правой теменных костях формировали трепанационные окна размерами 1,5x1,5 см, после чего справа устанавливали и фиксировали внахлест кости клеевой композицией (сульфакрилат) фрагмент штампованного титанового имплантата (рис. 1а); слева устанавливали и также фиксировали клеевой композицией титановый имплантат, изготовленный методом трехмерной печати (рис. 1с).

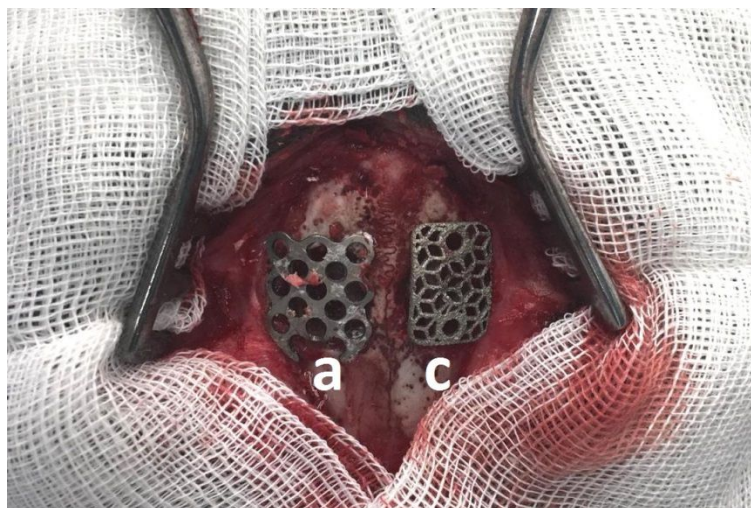


Рис. 1. Имитация краниопластики в эксперименте: парамедианно, в левой и правой теменных костях животного группы № 2 сформированы трепанационные отверстия, справа (а) установлен фрагмент стандартного штампованного имплантата; слева (с) – имплантата, изготовленного методом трехмерной печати

Осуществляли гемостаз, производили послойное закрытие раны. Кожу ушивали внутрикожным швом синтетической рассасывающейся нитью 5/0. Накладывали асептическую повязку. После выполненных хирургических вмешательств животных наблюдали в условиях вивария. Вывод животных из эксперимента производили путем внутрибрюшинного введения летальной дозы тиопентала натрия, после чего выполняли забор мягких тканей из области хирургического вмешательства с установленными имплантатами единым блоком для дальнейшей морфологической оценки.

Методика подготовки тканей и морфологическая оценка полученного материала

Для морфологического исследования в группе № 1 были взяты фрагменты мягких тканей спины над имплантатом, которые в расправленном виде на пластине фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине, затем подвергали стандартной обработке на гистологическом комплексе «MICROM» с последующей заливкой в парафиновые блоки. Срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, толуидиновым синим для выявления железа в клетках по Перлсу, по методу ШИК – гематоксилин – оранжевый G. Препараты исследовали в проходящем свете на микроскопе «Axioskop 40», микрофотографии сделаны фотокамерой AxioCam MRc5 (CarlZeiss, Германия).

После извлечения образцов тканей в группе № 2 их помещали в забуференный (pH 7,4) 10%-ный водный раствор формалина (BioVitrum, Россия). После суточной фиксации в формалине (2 смены раствора формалина по 12 ч каждая) биоматериал постфиксировали 1%-ным тетраоксидом осмия в 0,1M фосфатном буфере в течение 12 ч, затем окрашивали 2%-ным тетраоксидом осмия в бидистиллированной воде в течение 48 ч. Далее образцы

обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации (50%, 60%, 70%, 80% и 95% этанол, все по две смены, каждая смена по 15 мин), окрашивали 2%-ным уранилацетатом (Electron Microscopy Sciences, США) в 95%-ном этаноле (5 ч), обезвоживали 99,7%-ным изопропанолом (Bio Vitrum, Россия) в течение 5 ч и ацетоном (Реахим, Россия) в течение 1 ч, пропитывали смесью ацетона с эпоксидной смолой Epon (Electron Microscopy Sciences, США) в соотношении 1:1 (6 ч), после чего переносили в свежую порцию эпоксидной смолы (на 24 ч) и далее проводили ее полимеризацию в емкостях FixiForm (Electron Microscopy Sciences, США) при 60°C. После этого образцы в эпоксидных блоках подвергали шлифовке и полировке на установке TegraPol-11 (Struers, США). Контрастирование цитратом свинца проводили по Рейнольдсу в течение 7 мин путем нанесения раствора на поверхность шлифованного образца с последующей его отмывкой бидистиллированной водой. Далее проводили напыление на полированную поверхность эпоксидных блоков углерода (толщина покрытия 10–15 нм) с помощью вакуумного напылительного поста (EM ACE200, Leica). Визуализацию структуры образцов при помощи сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах проводили на электронном микроскопе Hitachi-S-3400N (Hitachi, Япония) в режиме BSECOMP при ускоряющем напряжении 10 кВ. На цифровых микрофотографиях оценивали особенности гистологической структуры тканей, окружающих материал имплантата.

С целью объективизации результатов исследования плотности васкуляризации сосудов до 15 мкм в диаметре проводилась их морфометрическая оценка на 1000 мкм² в сроки 7, 14 и 60 суток. Наряду с этим морфометрически на основании 41 замера параметров для каждой группы исследовалась тканевая реакция в области имплантации путем измерения ширины соединительной ткани. Данные анализировались с помощью программного обеспечения OLYMPUS Stream Версия 2.4.2.

Результаты исследования и их обсуждение

Животных обеих групп после оперативных вмешательств наблюдали в условиях вивария. Досрочно выбывших из эксперимента животных зафиксировано не было, послеоперационный период протекал без особенностей, питание было достаточным, поведение – адекватным, раны заживали первичным натяжением, без признаков инфицирования и несостоятельности. Общий статус не страдал, животных с наличием токсических и аллергических реакций зафиксировано не было.

При морфологическом исследовании образцов тканей животных группы № 1 через неделю после проведения операции в зоне контакта стандартного имплантата преобладали два типа тканевой реакции. При первом типе участки с картиной локальной деструкции шириной до 50 мкм были представлены организующимся тканевым дебрисом с единичными

фибробластами. В таких участках наблюдались группы крупных веретенообразных клеток с гиперхромными, удлинёнными ядрами, вероятно, ангиальных предшественников (рис. 2А). При втором типе определялись участки с преобладанием фибропластической реакции и началом формирования упорядоченных соединительнотканых волокон, где также определялись крупные удлинённые гиперхромные клетки (рис. 2Б). Одновременно в прилежающем слое поперечнополосатой мускулатуры наблюдались стромальный отек, плазморрагия и фокальный миолиз волокон (рис. 2В). Одновременно в прилежающем слое поперечнополосатой мускулатуры наблюдались стромальный отек, плазморрагия и фокальный миолиз волокон (рис. 2В).

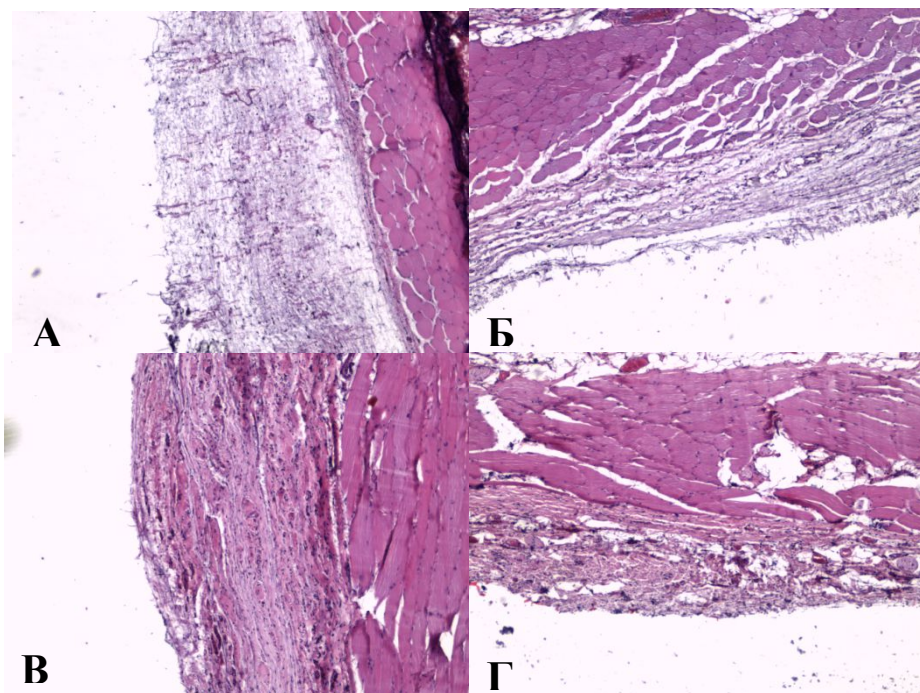


Рис. 2. Участки с картиной локальной деструкции, шириной до 50 мкм, представленные организуемым тканевым дебрисом с умеренной фибробластической реакцией, группами крупных удлинённых веретенообразных клеток с гиперхромными ядрами. Увеличение $\times 40$, группа сравнения (А); участки с преобладанием фибропластической реакции и началом формирования упорядоченных соединительнотканых волокон. Увеличение $\times 40$, группа сравнения (Б); иллюстрация стромального отека, плазморрагии и фокального миолиза в прилежающем слое поперечнополосатой мускулатуры. Замещение волокон рыхлой соединительной тканью. Увеличение $\times 40$, группа сравнения (В); плазморрагия волокон, элементы фокального миолиза и стромального отека с незначительной фибропластической реакцией. Увеличение $\times 40$, исследуемая группа (Г)

В группе с имплантатом, изготовленным методом трехмерной печати, на 7-е сутки после выполненной операции в участках поперечнополосатой мускулатуры наблюдались плазморрагии, элементы фокального миолиза и стромального отека с незначительной

фибропластической реакцией (рис. 2Г). Наряду с этим в значительной части исследуемой области определялась преобладающая фибропластическая реакция. В таких местах выявлялась значительная очаговая ангиоматозная реакция из сосудов, просвет которых был не более 10x15 мкм (рис. 3А).

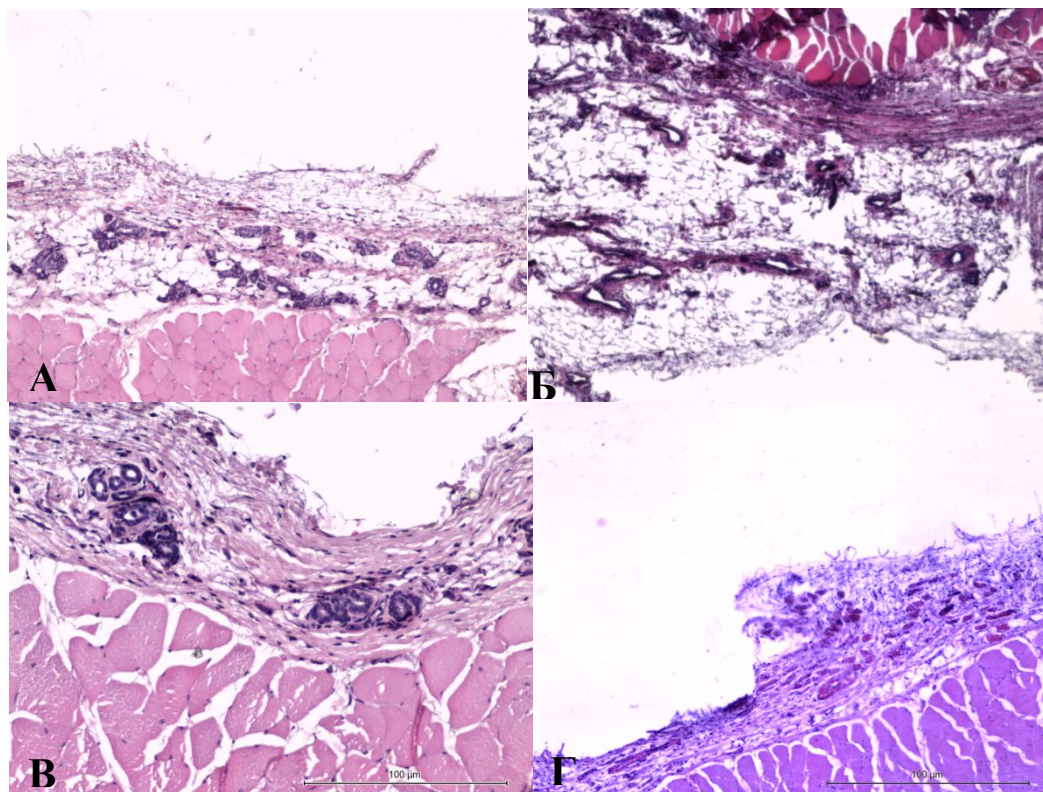


Рис. 3. Значительная очаговая ангиоматозная реакция из групп сосудов, просвет которых не более 10x15 мкм. Увеличение x40, исследуемая группа (А); рыхлая соединительная ткань в зоне контакта. Сосуды преимущественно щелевидной формы, эндотелий сосудов резко гиперхромен, медиальный слой сосудистых стенок акцентирован. Увеличение x150, группа сравнения (Б); зрелая соединительная ткань с очаговым ангиоматозом в месте контакта с имплантатом. Увеличение x150, группа сравнения (В); зрелая соединительная ткань с равномерно распределенными сосудистыми образованиями, овальной формы, с диаметрами просветов не более 15–20 мкм. Увеличение x150, исследуемая группа (Г)

На сроках 14 суток в группе стандартного имплантата в половине участков в зоне контакта отмечалась рыхлая соединительная ткань, замещавшая слой поперечнополосатой мускулатуры, преобладали сосуды щелевидной формы, располагавшиеся группами, неравномерно. Эндотелий сосудов резко гиперхромный, медиальный слой сосудистых стенок акцентирован (рис. 3Б). В другой половине формировалась зрелая соединительная ткань с очаговым ангиоматозом (рис. 3В).

На идентичных сроках наблюдения в группе индивидуального имплантата характерной чертой морфологического материала являлась относительно мономорфная реакция: зрелая соединительная ткань с равномерно распределенными сосудистыми образованиями, овальной формы, с диаметрами просветов не более 15–20 мкм (рис. 3Г и 4А).

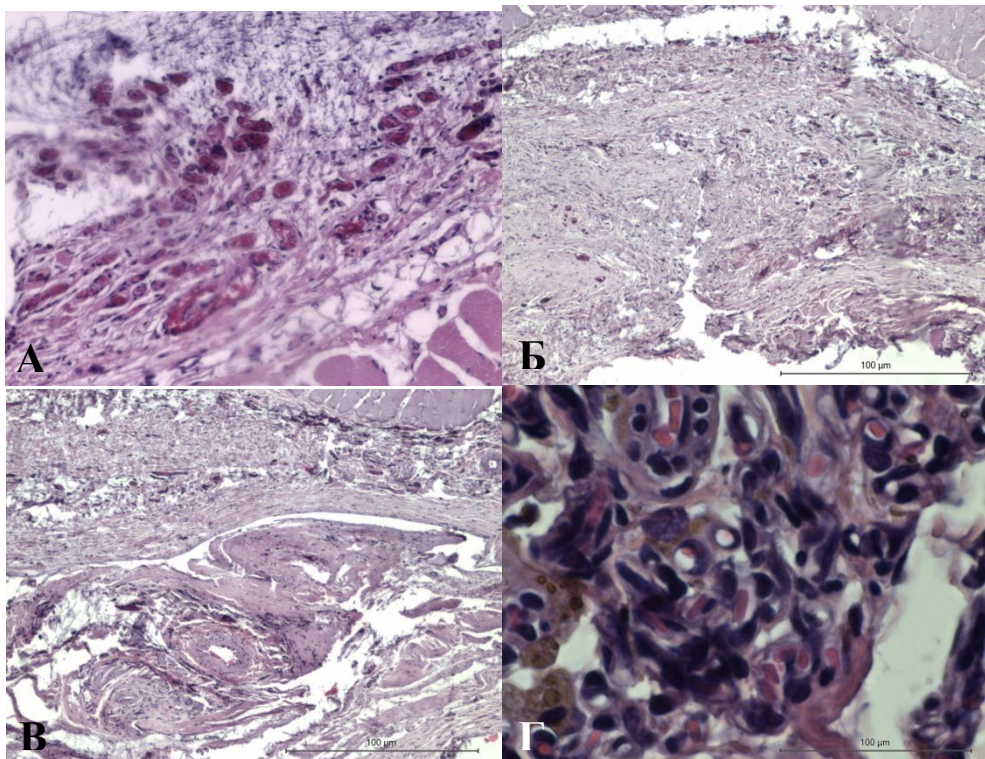


Рис. 4. Зрелая соединительная ткань с равномерно распределенными сосудистыми образованиями высокой плотности с диаметрами просветов не более 15–20 мкм. Увеличение $\times 380$, исследуемая группа (А); зрелая соединительная ткань с незначительной васкуляризацией, сосудами с диаметрами просветов не более 10–15 мкм. Увеличение $\times 150$, группа сравнения (Б); сформированный ангиоматоз представлен клубками толстостенных сосудов в фиброзированной ткани. Увеличение $\times 150$, группа сравнения (В); сформированный ангиоматоз, представленный мелкими, медузообразно ветвящимися сосудами с гиперхромным эпителием. Увеличение $\times 380$, группа сравнения (Г)

Через 60 суток после операции с использованием стандартного имплантата основной характеристикой места контакта являлась неоднородность формирования ткани. Определялись участки зрелой соединительной ткани с незначительной васкуляризацией сосудами не более 10–15 мкм (рис. 4Б). Другой тип тканевой реакции был представлен сформированным ангиоматозом, клубками толстостенных сосудов в фиброзированной ткани (рис. 4В), а также формирующимся ангиоматозом в виде мелких, медузообразно ветвящихся сосудов с гиперхромным эпителием (рис. 4Г).

В зоне контакта мягких тканей с индивидуальным имплантатом через 2 месяца после вмешательства характерной морфологической картиной являлось равномерное распределение толстостенных сосудов с диаметром небольшого просвета, от 10 до 15 мкм, в зрелой соединительной ткани; более того, часть просветов таких сосудов была облитерирована (рис. 5).

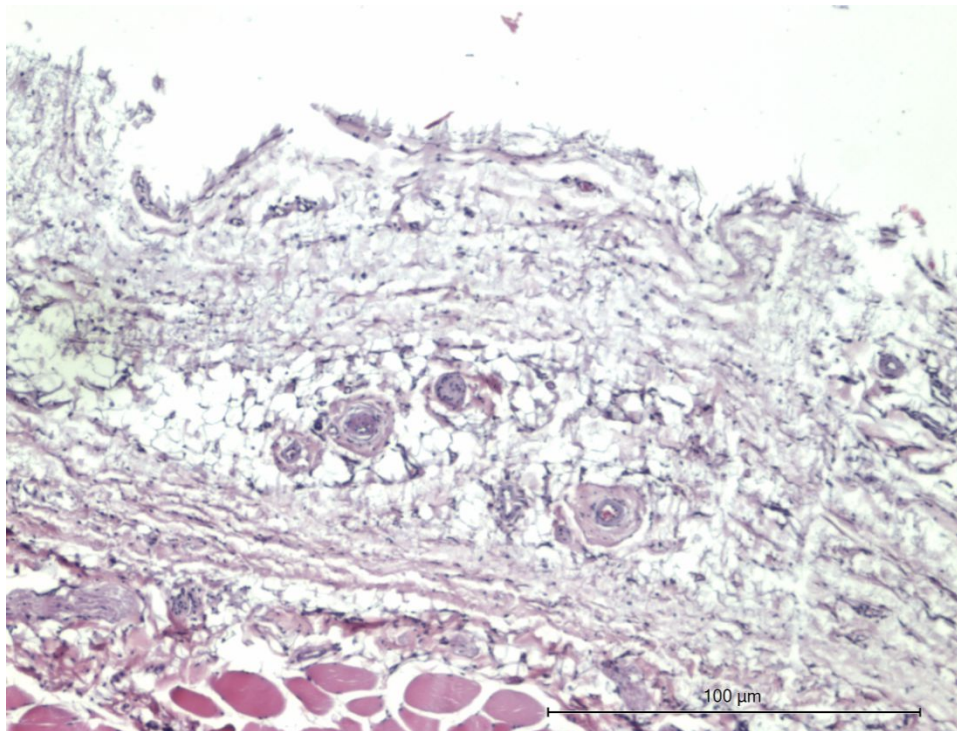


Рис. 5. Равномерное распределение толстостенных сосудов с диаметром небольшого просвета (от 10 до 15 мкм) в зрелой соединительной ткани, часть просветов таких сосудов облитерирована. Увеличение $\times 150$, исследуемая группа

Морфометрические результаты исследования плотности васкуляризации сосудами до 15 мкм в диаметре представлены в таблице 2.

Таблица 2

Сопоставление морфометрических результатов плотности васкуляризации сосудами диаметром до 15 мкм в зоне контактов стандартных и индивидуальных имплантатов на 1000 мкм² на сроках 7, 14 и 60 суток

Сроки наблюдения	Плотность васкуляризации в зоне контактов мягких тканей и имплантатов на 1000 мкм ²	
	Стандартный	Индивидуальный
7 суток	–	25±8
14 суток	94±10	132±14
	$p < 0,05$	
60 суток	53±9	10±1
	$p < 0,05$	

Примечание. *Результаты достоверны при $p \leq 0,05$ по критерию Стьюдента

С целью исследования реакции мягких тканей в области имплантации была изучена зона адаптации имплантатов к тканям с измерением ширины соединительной ткани (табл. 3). Выполнено по 41 замеру параметров для каждой группы.

Таблица 3

Результаты измерения ширины соединительной ткани в области установки имплантатов

Сроки наблюдения	Группа исследования	Среднее значение ± Стандартная ошибка, мкм	Значение p
7 суток	Индивидуальный имплантат	57,5±12,2	p<0,05
	Стандартный имплантат	94,9±22,9	
14 суток	Индивидуальный имплантат	69,8±21,6	p<0,05
	Стандартный имплантат	88,3±45,1	
60 суток	Индивидуальный имплантат	128,5±44,1	p<0,05
	Стандартный имплантат	179,3±69,9	

Примечание: t-критерия Стьюдента для независимых выборок p≤0,05

При интерпретации объективных данных микроскопического исследования препаратов на стороне имплантации фрагментов стандартных титановых сеток было отмечено увеличение объема образующейся соединительной ткани на фоне выраженной сосудистой реакции с формированием межтканевого отека, что явилось следствием травматизации вышележащих мягких тканей. Это объяснялось тем, что биологическая фиксация в области имплантации штампованных титановых сеток из-за их гладкой поверхности минимальна, в результате чего возникала постоянная подвижность мягких тканей над имплантатом, это и приводило к повреждению гладкомышечного слоя с формированием межтканевого отека и нарушению заживления в области хирургического вмешательства.

В гистологических препаратах, взятых из областей, где были использованы титановые пластины, изготовленные методом трехмерной печати, отчетливо визуализировалась рыхлая соединительная ткань с минимальным наличием межтканевой жидкости и формированием оформленной, зрелой ткани в зоне имплантации. Это было связано с тем, что установка титанового имплантата с шероховатой поверхностью приводит к значительно выраженной биологической фиксации между поверхностью и прилегающими тканями за счет увеличения площади контакта в идентичном объеме ткани. Данный факт способствовал максимальному

сцеплению тканей с имплантатом и его максимальной ретенции, минимизируя дополнительную подвижность кожи и прилегающих структур. Как следствие, регенеративные процессы на стороне использования напечатанных имплантатов протекали быстрее по сравнению со стороной, где устанавливали фрагменты стандартной титановой сетки. Полученные результаты свидетельствуют о статистически значимых различиях.

Морфологическая оценка материала в группе № 2 проводилась при помощи сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах на электронном микроскопе (увеличение $\times 100-1000$). На сроках 7 суток после установки фрагмента стандартного имплантата в окружающих мягких тканях наблюдали минимальные проявления реакции организма на наличие инородного материала, которые проявлялись в виде присутствия небольшого количества диффузно расположенных лейкоцитов, не контактирующих с материалом имплантата, что, вероятно, было обусловлено реакцией на оперативное вмешательство. Вблизи образца присутствовал сплошной слой соединительно-жировой ткани, не имеющей плотного контакта с материалом изделия. Исследование тканей, окружающих индивидуальный имплантат на аналогичных сроках после проведенного оперативного вмешательства, продемонстрировало плотный контакт рыхлой соединительной ткани с поверхностью изделия. Реакция на имплантацию, так же как и в случае с фрагментом стандартного имплантата, была минимальной, выражалась в виде присутствия небольшого количества диффузно расположенных лейкоцитов. Сам имплантат имел неровную поверхность, эти неровности были разнообразны по форме. При малых увеличениях большая их часть имела очертания округлых выпуклостей, чередующихся с углублениями. Углубления имели различную форму, направление и протяженность. При больших увеличениях отмечали, что поверхность образца имеет значительные неровности.

На 14-е сутки после имплантации на стороне стандартного имплантата плотная соединительная ткань имела различные степени примыкания. Часть поверхности имплантата не имела прямого контакта с поверхностью сплава, между ней и соединительной тканью находилось пространство, не содержащее в своем составе электронно-плотных элементов (рис. 6А). В области углов, во внутренней структуре окружающей ткани, наблюдали наличие клеток, относящихся к воспалительной группе, главным образом макрофагов. Этот участок был окружен плотной соединительной тканью, содержащей в своем составе крупные кровеносные сосуды. Другая часть поверхности имела тесный контакт с плотной соединительной тканью. В третьем варианте на границе со сплавом наблюдали наличие тонкого слоя рыхлой соединительной ткани. В этом случае плотный контакт отсутствовал, на границе отмечалось большое количество пустот. Кроме того, в этой области наблюдали присутствие макрофагов, содержащих большое количество вакуолей.

К этому сроку на стороне индивидуального имплантата последний находился в составе соединительной ткани, представленной преимущественно фиброцитами. В отличие от стороны, где устанавливали стандартный имплантат, наблюдали плотный контакт вновь образованной ткани с поверхностью изделия (рис. 6Б).

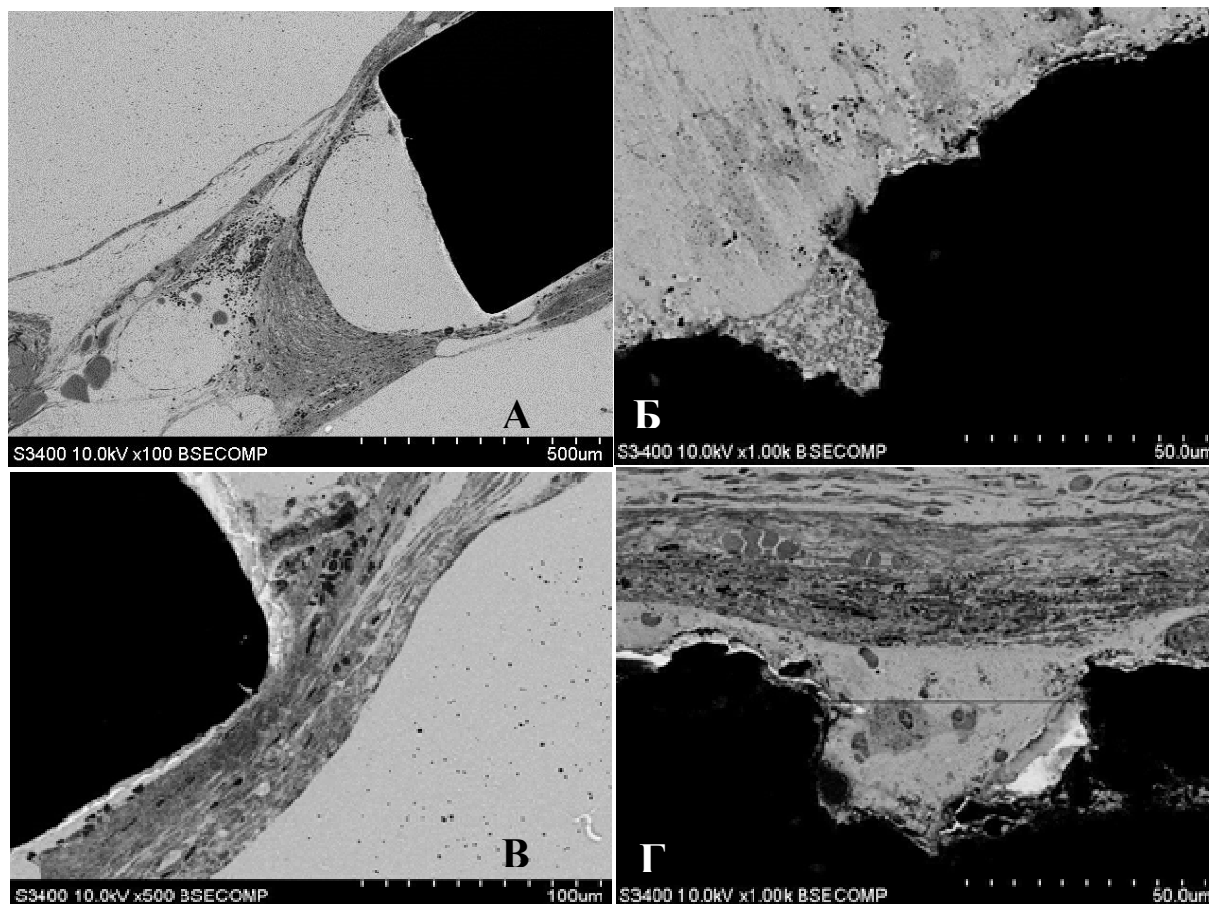


Рис. 6. Контакт тканей с фрагментом стандартного имплантата (А – увеличение $\times 100$) и индивидуального имплантата (Б – увеличение $\times 1000$), полученного методом трехмерной печати, на сроке 14 суток после выполненного хирургического вмешательства; контакт тканей с фрагментом стандартного имплантата (В – увеличение $\times 500$) и полученного методом трехмерной печати (Г – увеличение $\times 1000$) на сроке 60 суток после проведения оперативного вмешательства

В образцах материалов с фрагментом стандартного штампованного имплантата на 60-е сутки исследования последний находился в составе биологических тканей и был окружен неравномерным слоем соединительной ткани. Наиболее плотный контакт вновь образованной ткани наблюдался на внешних поверхностях имплантата, наименьший – на боковых. На угловых частях имплантата отмечали плотное примыкание соединительной ткани с внешней стороны, переходящей в слой рыхлой соединительной ткани, содержащей макрофаги, а затем – в тонкий слой уплотненного материала, контактирующего с боковой поверхностью (рис. 6В). Между этим слоем и плотной соединительной тканью находилось

свободное пространство. На указанном сроке имплантации сохранялся слабо выраженный процесс пролиферативного воспаления и формирования окружения из плотной соединительной ткани.

В образцах тканей с установленным индивидуальным имплантатом на сроке 60 суток структурные элементы были окружены неравномерным слоем соединительной ткани. По всему периметру образца отмечался плотный контакт соединительной ткани с материалом сплава (рис. 6Г), в ее составе часто наблюдалось присутствие кровеносных сосудов.

Ежегодно количество медицинских имплантатов, изготавливаемых путем аддитивных технологий, увеличивается, растет их использование в клинической практике, что позволяет в полной мере реализовывать концепцию персонализированной медицины [23–25]. Производственный процесс при трехмерной печати отличается от традиционного литейного: титановый сплав (TiAlV) в виде порошка подается в рабочую камеру трехмерного принтера в количествах, необходимых для нанесения одного слоя. Специальный валик выравнивает поданный порошок в ровный слой и удаляет излишний материал из камеры, после чего лазерная головка спекает частицы свежего порошка между собой и с предыдущим слоем согласно контурам, определенным цифровой моделью. После завершения вычерчивания слоя процесс повторяется: валик подает свежий материал, и лазер начинает спекать следующий слой [26]. Так слой за слоем формируется объект заданной формы. Изделия, получаемые данным способом, имеют шероховатую поверхность, показатели которой соответствуют Rz 20–50 мкм.

Несмотря на значительное количество работ [27–29], в основном в области стоматологии, травматологии и ортопедии, по изучению реакции тканей человека и животных [30], а также остеоинтеграции титановых имплантатов [31–33], проведение эксперимента было продиктовано необходимостью исследования реакций мягких тканей организма на новые типы изделий, получаемых методом трехмерной печати. В области нейрохирургии изучение морфологических изменений в окружающих имплантат мягких тканях имеет больший приоритет, чем при интеграции имплантата в плоские кости черепа. Это объясняется тем, что имплантаты для краниопластики не испытывают постоянной динамической нагрузки, они статичны и защищают мозг от воздействия внешних причин. В то же время количество научных работ, фокусирующихся на указанной проблеме, не так велико [34–35]. В отличие от большинства имплантатов, используемых в травматологии и ортопедии, которые, как правило, прикрыты слоем мышц и сухожилий, имплантаты черепа контактируют с апоневрозом головы. Последний, в свою очередь, подвержен трофическим дегенеративным изменениям, являющимся следствием предыдущих нейрохирургических вмешательств. Помимо этого, после краниопластики развивается сокращение кожно-

апоневротического лоскута, и после установки имплантата может наблюдаться натяжение тканей. Перечисленные обстоятельства повышают риски трофических нарушений мягких тканей головы с формированием свищей и обнажением установленных краниальных имплантатов [36]. Эти данные явились дополнительным основанием для проведения морфологических исследований по изучению реакции мягких тканей на имплантат, изготовленный методом трехмерной печати.

В ходе формирования дизайна эксперимента нами была выдвинута гипотеза, что шероховатая поверхность имплантата будет способствовать лучшей интеграции изделия в окружающие мягкие ткани. В остальном не ожидалось, что реакции организма на имплантаты будут различаться, поскольку, хоть они и были изготовлены двумя различными способами: литья и трехмерной печати, но производились из идентичного титан-алюминий-ванадиевого (TiAlV) сплава, разрешенного для использования в клинической практике.

Подтверждение этому предположению было получено в проведенном эксперименте: раны у всех исследуемых животных заживали первичным натяжением, без признаков инфицирования и несостоятельности. Локальные реакции были схожи и проходили через стадии локального асептического воспаления, формирования рыхлой соединительной ткани и последующего формирования зрелого соединительнотканного рубца. На стороне имплантации изделий, полученных методом трехмерной печати, отмечались плотный контакт окружающих тканей ко всем шероховатостям имплантата, а также более выраженная пролиферация сосудов. Это, как нам представляется, объясняется значительно выраженной биологической фиксацией индивидуального шероховатого имплантата к прилегающим мягким тканям в сравнении со стандартным гладким имплантатом, что приводит к максимальному сцеплению тканей с имплантатом и минимизирует дополнительную подвижность кожи и прилегающих структур. В результате этого регенеративные процессы протекают быстрее по сравнению с группой сравнения.

Полученные результаты подтверждены объективными морфометрическими методами исследования плотности васкуляризации сосудов и изучением ширины соединительной ткани в зоне имплантации. Они свидетельствуют о статистически значимых различиях и преимуществе индивидуального имплантата, изготовленного методом трехмерной печати из титанового порошка, который быстрее и полноценнее интегрируется с окружающими мягкими тканями животных.

Выводы

1. В группах с различными типами имплантируемых изделий морфологические локальные реакции мягких тканей были однотипны и проходили через стадии локального

асептического воспаления, формирования рыхлой соединительной ткани с последующим образованием зрелого соединительнотканного рубца.

2. Значительно выраженная биологическая фиксация индивидуальных шероховатых имплантатов к прилегающим мягким тканям в сравнении со стандартным гладким имплантатом приводит к максимальному сцеплению тканей с имплантатом, ускорению регенеративных процессов и формированию зрелого соединительнотканного рубца.

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов, связанных со статьей.

Список литературы

1. Feroze A.H., Walmsley G.G., Choudhri O., Lorenz H.P., Grant G.A., Edwards M.S. Evolution of cranioplasty techniques in neurosurgery: historical review, pediatric considerations, and current trends. *Journal of Neurosurgery*. 2015. vol. 123. no 4. P. 1098-1107. DOI: 10.3171/2014.11.JNS14622.
2. Колмогоров Ю.Н., Успенский И.В., Маслов А.Н., Новиков А.Е., Тарасов Д.А., Мячин Н.Л., Гончаров А.Ю., Корзун А.С., Латыпов Т.Ф., Ядыков Д.А., Балязин-Парфенов И.В. Костнозамещающие имплантаты из материала «Рекост-М» на основе 3D-моделирования для закрытия посттравматических дефектов черепа: доклинические и клинические исследования // *Современные технологии в медицине*. 2018. Т. 10. № 3. С. 70-77. DOI: 10.17691/stm2018.10.3.11.
3. Harris D.A., Fong A.J., Buchanan E.P., Monson L., Khechoyan D., Lam S. History of synthetic materials in alloplastic cranioplasty. *Neurosurgery Focus*. 2014. vol. 36. no. 4. E20. DOI: 10.3171/2014.2.FOCUS13560.
4. Halani S.H., Chu J.K., Malcolm J.G., Rindler R.S., Grossberg J.A., Pradilla G., Ahmad F.U. Effects of cranioplasty on cerebral blood flow following decompressive craniectomy: a systematic review of the literature. *Neurosurgery*. 2017. vol. 81. no. 2. P. 204-216. DOI: 10.1093/neuros/nyx054.
5. Di Stefano C., Rinaldesi M.L., Quinquinio C., Ridolfi C., Vallasciani M., Sturiale C., Piperno R. Neuropsychological changes and cranioplasty: a group analysis. *Brain Injury*. 2016. vol. 30. no. 2. P. 164-171. DOI: 10.3109/02699052.2015.1090013.
6. Shahid A.H., Mohanty M., Singla N., Mittal B.R., Gupta S.K. The effect of cranioplasty following decompressive craniectomy on cerebral blood perfusion, neurological, and cognitive outcome. *Journal of Neurosurgery*. 2018. vol. 128. no. 1. P. 229-235. DOI: 10.3171/2016.10.JNS16678.

7. Синбухова Е.В., Кравчук А.Д., Лубнин А.Ю., Данилов Г.В., Охлопков В.А., Степнова Л.А. Динамика когнитивных функций у пациентов с дефектами черепа после проведения реконструктивных вмешательств // Архивъ внутренней медицины. 2017. vol. 7. no. 2. P. 131-138. DOI: 10.20514/2226-6704-2017-7-2-131-138.
8. Aydin S., Kucukyuruk B., Abuzayed B., Aydin S., Sanus G.Z. Cranioplasty: Review of materials and techniques. *Journal of Neurosciences in Rural Practice*. 2011. vol. 2. no. 2. P. 162-167. DOI: 10.4103/0976-3147.83584.
9. Shah A.M., Jung H., Skirboll S. Materials used in cranioplasty: a history and analysis. *Neurosurgery Focus*. 2014. vol. 36. no. 4. P. 1-7. DOI: 10.3171/2014.2.focus13561.
10. Kwarcinski J., Boughton P., Ruys A., Doolan A., Gelder J.V. Cranioplasty and craniofacial reconstruction: a review of implant material, manufacturing method and infection risk. *Applied Sciences*. 2017. vol. 7. no. 3. P. 276. DOI: 10.3390/app7030276.
11. Тихомиров С.Е., Цыбусов С.Н., Кравец Л.Я., Фраерман А.П., Балмасов А.А. Пластика дефектов свода черепа и твердой мозговой оболочки новым полимерным материалом Реперен // Современные технологии в медицине. 2010. №2. С. 6-11.
12. Колмогоров Ю.Н., Успенский И.В., Маслов А.Н., Тарасов Д.А., Мячин Н.Л., Гончаров А.Ю., Корзун А.С., Латыпов Т.Ф., Ядыков Д.А., Балязин-Парфенов И.В. Костнозамещающие имплантаты из материала «Рекост-М» на основе 3D-моделирования для закрытия посттрепанационных дефектов черепа: доклинические и клинические исследования // Современные технологии в медицине. 2018. 10 (3). С. 70–77. DOI: 10.17691/stm2018.10.1.0.
13. Francaviglia N., Maugeri R., OdiernaContino A., Meli F., Fiorenza V., Costantino G., Giammalva R.G., Iacopino D.G. Skull bone defects reconstruction with custom-made titanium graft shaped with electron beam melting technology: preliminary experience in a series of ten patients. *Acta Neurochirurgica, Supplement*. 2017. no. 124. P. 137-141. DOI: 10.1007/978-3-319-39546-3_21.
14. Mundinger G.S., Latham K., Friedrich J., Louie O., Said H., Birgfeld C., Ellenbogen R., Hopper R.A. Management of the repeatedly failed cranioplasty following large postdecompressive craniectomy: establishing the efficacy of staged free latissimus dorsi transfer/tissue expansion/custom polyetheretherketone implant reconstruction. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2016. vol. 27. no. 8. P. 1971-1977. DOI: 10.1097/SCS.0000000000003043.
15. Haleem A., Javaid M. Polyether ether ketone (PEEK) and its 3D printed implants applications in medical field: An overview. *Clinical Epidemiology and Global Health*. 2019. vol. 7. no. 4. P. 571-577. DOI: 10.1016/j.cegh.2019.01.003.
16. O'Reilly E.B., Barnett S., Madden C., Welch B., Mickey B., Rozen S. Computed-tomography modeled polyether ether ketone (PEEK) implants in revision cranioplasty. *Journal of*

Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery. 2015. vol. 68. no. 3. P. 329-338. DOI: 10.1016/j.bjps.2014.11.001.

17. Berretta S., Evans K., Ghita O. Additive manufacture of PEEK cranial implants: manufacturing considerations versus accuracy and mechanical performance. *Materials & Design*. 2018. V. 139(5). P. 141-152. DOI: 10.1016/j.matdes.2017.10.078

18. Кравчук А.Д., Потапов А.А., Панченко В.Я., Комлев В.С., Новиков М.М., Охлопков В.А., Маряхин А.Д., Дувидзон В.Г., Латышев Я.А., Чёлушкин Д.М., Чобулов С.А., Александров А.П., Шкарубо А.Н. Аддитивные технологии в нейрохирургии // Вопросы нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко. 2018. Т. 82. № 6. С. 97-104. DOI: 10.17116/neiro20188206197.

19. Lim J.Y., Kim N., Park J.C., Yoo S.K., Shin D.A., Shim K.W. Exploring for the optimal structural design for the 3D-printing technology for cranial reconstruction: a biomechanical and histological study comparison of solid vs. porous structure. *Child's Nervous System*. 2017. vol. 33. no. 9. P. 1553-1562. DOI: 10.1007/s00381-017-3486-y.

20. Parthasarathya J., Starlya B., Ramana S., Christensen A. Mechanical evaluation of porous titanium (Ti6Al4V) structures with electron beam melting (EBM). *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2010. vol. 3 no. 3. P. 249-259. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2009.10.006.

21. Копорушко Н. А., Мишинов С. В., Кангельдиев А.Э., Ступак В. В. Косметические результаты реконструктивных нейрохирургических вмешательств на черепе // Политравма/Polytrauma. 2020. № 1. С. 35-43. DOI: 10.24411/1819-1495-2020-1000.

22. ГОСТ Р ИСО 5832-3-2014 Имплантаты для хирургии. Металлические материалы. Часть 3. Деформируемый сплав на основе титана, 6-алюминия и 4-ванадия (с Поправкой). [Электронный ресурс]. URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200116339> (дата обращения 24.06.2020).

23. Honeybul S., Morisson D.A., Ho K.M., Lind C.R.P., Geelhoed E. A randomized controlled trial comparing autologous cranioplasty with custom-made titanium cranioplasty. *Journal of Neurosurgery*. 2017. no. 126. P. 81-90. DOI: 10.3171/2015.12.jns152004.

24. Mishinov S.V., Stupak V.V., Koporushko N.A., Samokhin A.G., Panchenko A.A., Krasovskii I.B., Desyatykh I.V., Kiselev A.S. Titanium patient-specific implants in reconstructive neurosurgery. *Biomedical Engineering*. 2018. vol. 52. no. 3. P. 152-155. DOI: 10.1007/s10527-018-9802-3.

25. Gilardino M. S., Karunanayake M., Al-Humsi T., Izadpanah A., Al-Ajmi H., Marcoux, J., Atkinson J., Farmer J.-P. A comparison and cost analysis of cranioplasty techniques. *The Journal of Craniofacial Surgery*. 2015. vol. 26. no. 1. P. 113-117. DOI:10.1097/scs.0000000000001305.

26. Fereiduni E., Ghasemi A., Elbestawi M. Characterization of composite powder feedstock from powder bed fusion additive manufacturing perspective. *Materials (Basel)*. 2019. vol. 12. no. 22. P. 3673. DOI: 10.3390/m.
27. Казбанов В.В., Баталов М.С., Вишневский А.А., Кульчицкий В.А., Чекан Н.М. Реакция здоровой костной ткани кроликов на контакт с титановыми имплантатами без покрытия и с алмазоподобными покрытиями в эксперименте // *Научные стремления*. 2015. №14. С. 5-9.
28. Mangano F., Chambrone L., Van Noort R., Miller C., Hatton P., Mangano C. Direct Metal Laser Sintering Titanium Dental Implants: A Review of the Current Literature. *International Journal of Biomaterials*. 2014. Vol. 2014. Article ID 461534, 11 p. DOI: 10.1155/2014/461534.
29. Ferraz E.P., Sverzut A.T., Freitas G.P., Sa J.C., Alves C.Jr., Beloti M., Rosa A. Bone tissue response to plasma-nitrided titanium implant surfaces. *Journal of applied oral science: revista FOB*. 2015. V. 23(1). P. 9-13. DOI: 10.1590/1678-775720140376.
30. Park J.W., Song C.A., Kang H.G., Kim J.H., Lim K.M., Kim H.S. Integration of a Three-Dimensional-Printed Titanium Implant in Human Tissues: Case Study. *Applied Sciences*. 2020. vol. 10. no 2.P. 553. DOI: 10.3390/app10020553.
31. Shehadeh A.M., Isleem U., Abdelal S., Salameh H., Abdelhalim M. Surgical Technique and Outcome of Custom Joint-Sparing Endoprosthesis as a Reconstructive Modality in Juxta-Articular Bone Sarcoma. *Journal of Oncology*. 2019. Vol.2019. Article ID 9417284.P. 13. DOI: 10.1155/2019/9417284.
32. Lal H., Patralekh M.K. 3D printing and its applications in orthopaedic trauma: A technological marvel. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*. 2018. Vol. 2018. P.1-9 DOI: 10.1016/j.jcot.2018.07.022.
33. Fang C., Cai H., Kuong E., Chui E., Siu Y.C., Ji T., Drstvensek I. Surgical applications of three-dimensional printing in the pelvis and acetabulum: from models and tools to implants. *Unfallchirurg*. 2019. 122. P. 278–285. DOI: 10.1007/s00113-019-0626-8.
34. Тихомиров С.Е., Цыбусов С.Н., Кравец Л.Я. Изучение реакции мягких тканей на имплантацию полимера «Реперен» // *Нейрохирургия*. 2012. №3. С. 45-52.
35. Баранник М.И. Морфологические реакции тканей на имплантацию различных материалов (клинико-экспериментальное исследование): автореф. дис. ... докт. мед. наук. Новосибирск, 2014. 34 с.
36. Rienzo A.D., Pangrazi P.P., Riccio M., Colasanti R., GhettiI., Iacoangeli M. Skin flap complications after decompressive craniectomy and cranioplasty: Proposal of classification and treatment options. *Surgical Neurology International*. 2016. V. 7(Suppl 28). P737–745. DOI: 10.4103/2152-7806.193724.