

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОИНЕРТНОСТИ МАТЕРИАЛОВ ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ В ПАРЕНХИМУ ПОЧКИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

**С.В. ШКОДКИН^{1,2}, А.А. ДОЛЖИНОВ¹
Н.И. ЖЕРНАКОВА¹, В.Н. ДМИТРИЕВ¹
Ю.Б. ИДАШКИН², В.В. ФЕНТИСОВ¹**

*¹⁾ Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет*

*²⁾ Областная клиническая больница
Святителя Иоасафа, г. Белгород*

e-mail: shkodkin-s@mail.ru

В статье описаны морфологические изменения паренхимы почек крыс при имплантации наноструктурных образцов из сплавов титана. Материалы использованы как в исходном состоянии, так и после модификации структуры поверхности. Исследована воспалительная реакция на имплантацию на сроке до месяца. Получены статистически достоверные различия морфологических изменений в зависимости от вида материала.

Ключевые слова: имплантат, биоинертность, воспаление, медицинские материалы.

Частота хирургических вмешательств на мочевыводящих путях, которые требуют оставления временного, а иногда и постоянного внутреннего дренажа, с каждым годом увеличивается [1-6]. Выполняя шинирующие свойства, обеспечивая проходимость анастомоза, рассеченной или дилатированной стриктуры [3, 4, 7], либо реканализированной опухоли [1, 2, 5], внутренние дренажи несут с собой ряд проблем. Подходы к решению части из них (доставки, миграции, удаления стента, адекватности дренирования) базируются на конструктивных особенностях как самих стентов и систем доставки, так и использовании эндоскопического оборудования и навигационных систем визуализации [8, 9, 10, 11].

Немаловажное значение в решении других проблем, связанных с имплантацией стента, имеет материал, используемый для изготовления дренажа, и характеристики его поверхности [12, 13]. Используемые покрытия, особенно при необходимости длительного дренирования не предотвращают адгезии солей, что более выражено при бактериальной обсемененности [14, 15]. Превентивная импрегнация стентов антибиотиками и системная антибактериальная терапия не предотвращают их инфицирования [16]. Биоинертность стента и вероятность дренажных осложнений определяется материалом, используемым для изготовления стента и характеристиками его поверхности.

Цель исследования. Определение биоинертных свойств экспериментальных наноструктурированных материалов в сравнении с традиционными при имплантации в паренхиму почек.

Материал и методы исследования. Экспериментальное исследование биосовместимости испытуемых материалов выполнено на 56 белых лабораторных крысах линии Wistar обоего пола массой 250-300 гр (таблица). Перед началом эксперимента животных выдерживали на карантине в течение 7 суток в стандартных условиях вивария. Для изучения биосовместимости материалов использованы изготовленные из них отрезки проволоки длиной 7 мм, диаметром 0,25 мм. Хирургические вмешательства выполнены в экспериментальной операционной центра «Фармация» БелГУ. Под хлоралгидратным наркозом (300 мг/кг внутривенно) из срединного лапаротомного разреза выполняли имплантацию стерильных отрезков проволоки из испытуемых материалов путем введения в толщу ткани почек (по два имплантата).

В настоящей работе исследована биоинертность сплавов на основе титана (низкомодульный титановый сплав системы Ti-Nb-(X) в наноструктурированном состоянии, сплав с эффектом памяти формы на основе Ti-Ni-(X)), а также наноразмерных покрытий на основе аморфного углерода, азота и атомарного серебра. Биоинертные свойства титана и сплава с эффектом памяти формы на основе Ti-Ni-(X) ранее исследованы применительно к использованию в ортопедии и стоматологии и обусловлены образующейся оксидной пленкой на поверхности имплантата,



последний явился контрольным материалом. Биоинертные свойства указанных наноразмерных покрытий и низкомолекулярного титанового сплава системы Ti-Nb-(X) в наноструктурированном состоянии исследованы впервые.

Таблица

Распределение экспериментальных животных

Материал	Сроки наблюдения		
	14-е сутки	30-е сутки	Всего
Низкомолекулярный титановый сплав системы Ti-Nb-(X) в наноструктурированном состоянии	5	5	10
Сплав с эффектом памяти формы на основе Ti-Ni-(X)	5	5	10
Наноразмерное покрытие на основе аморфного углерода	5	5	10
Наноразмерное покрытие на основе аморфного углерода и азота	5	5	10
Наноразмерное покрытие на основе аморфного углерода и атомарного серебра	8	8	16
ИТОГО	28	28	56

Из эксперимента животных выводили путем передозировки ингаляционного наркоза на 14-е и 30-е сутки после имплантации. Данные сроки выбраны с учетом стандартной динамики течения раневого процесса. На 14-е сутки в основном нивелируются неспецифические воспалительные изменения, обусловленные хирургической травмой и проявляются возможные особенности реакции на имплантаты с различными свойствами. На 30-е сутки в целом должны быть завершены процессы организации и изоляции имплантатов с видимой спецификой реакции тканей в зависимости от природы имплантата.

Извлеченные органы после макроскопического исследования фиксировали в 10% растворе формалина. После внешнего осмотра из фиксированных органов извлекали имплантаты. Кусочки для гистологического исследования из почек вырезали в поперечном к имплантату направлении через всю толщу продольно или поперечно.

При морфологическом исследовании соблюдали максимальную стандартизацию всех подготовительных и аналитических этапов с использованием линейки роботизированного оборудования.

Материал заливали в стандартном режиме. Для обеспечения стандартизации заливку в парафин осуществляли в виде мультиблоков по 5–6 кусочков. Срезы для гистологического исследования толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Для оценки соединительнотканых структур использовали окраску по Маллори.

Описательное исследование гистологических препаратов выполняли под микроскопом Axio Scope A1 (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Германия). Основная часть морфологического исследования выполнена после создания электронной галереи изображений с помощью полуавтоматического сканера микропрепаратов Mirax Desk (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Германия), что позволяло максимально стандартизовать режимы морфометрического исследования. Увеличение сканирующего объектива х20. Увеличение на микрофотографиях и изображениях при анализе варьировало от х20 (при отсутствии программного увеличения) до х800 (при 40-кратном цифровом увеличении).

Измеряли толщину формирующихся реактивных тканевых зон и капсул, производили подсчет относительного количества клеточных элементов, характеризующих различные стадии раневого процесса: полиморфноядерные лейкоциты всех типов, лимфоциты, гистиоциты, фибробласты. Статистическую обработку производили средствами электронной таблицы Ms Excel.

Исследование выполнено в рамках государственного контракта №14.740.11.0182 по теме: «Биомедицинское исследование изменений структур органов и тканей при имплантации стентов нового поколения».

Результаты исследования и их обсуждение. При морфологическом изучении воспалительной реакции со стороны паренхимы почки после имплантации

пяти исследуемых материалов выявлены качественные и количественные отличия, зависящие от свойств имплантата.

14-е сутки исследования. В серии с имплантацией проволочных отрезков из низко модульного титанового сплава системы Ti-Nb-(X) в наноструктурированном состоянии и сплава с эффектом памяти формы на основе никелида титана Ti-Ni-(X) в толще почек четко идентифицируются места введения имплантатов – их ложе, в виде полости (отверстия на гистологических срезах) диаметром 220-250 мкм, соответствующим диаметру использованных имплантатов. Участков некрозов в зоне имплантации не выявлено ни в одном наблюдении, что, с одной стороны, говорит об атравматичности способа установки образцов, с другой – об отсутствии прямой цитотоксичности у исследуемых материалов. Причем, морфометрическое исследование не выявило статистически достоверных различий в зависимости от имплантируемого сплава (низко модульный титановый сплав системы Ti-Nb-(X) в наноструктурированном состоянии, сплав с эффектом памяти формы на основе Ti-Ni-(X)). Это подтверждает литературные данные о том, что биоинертность титана обусловлена защитными свойствами быстро образующейся оксидной пленки [13,15]. При проведении дальнейшего статистического анализа данные группы объединены в группу «сплавы титана» (табл. 1). Вокруг места расположения имплантата четко определяется зона реактивных изменений, по ходу введения проволочных отрезков наблюдаются «дорожки» из незрелой грануляционной ткани (рис. 1А). Отграничительная реактивная зона имеет ширину $35,3 \pm 6,8$ мкм, сформирована на сроке 14 суток несколькими слоями незрелой соединительной ткани с заметным количеством фибробластов ($173 \pm 32,5$ клеток в поле зрения), гистиоцитов ($58 \pm 8,4$ клеток в поле зрения) и элементов воспалительного инфильтрата. Последние представлены преимущественно малыми лимфоцитами ($134 \pm 22,9$ клеток в поле зрения), с примесью немногочисленных полиморфноядерных лейкоцитов, представленных эозинофилами ($38 \pm 7,1$ клеток в поле зрения). Элементы воспалительного инфильтрата равномерно диффузно распределены в толще формирующейся соединительнотканной капсулы, но основная его часть расположена в наружных слоях реактивной зоны – на границе с паренхимой почек. В последней, на данном сроке эксперимента не выявлено признаков повреждения. Формирующаяся соединительнотканная капсула содержит единичные мелкие кровеносные сосуды (рис. 1А).

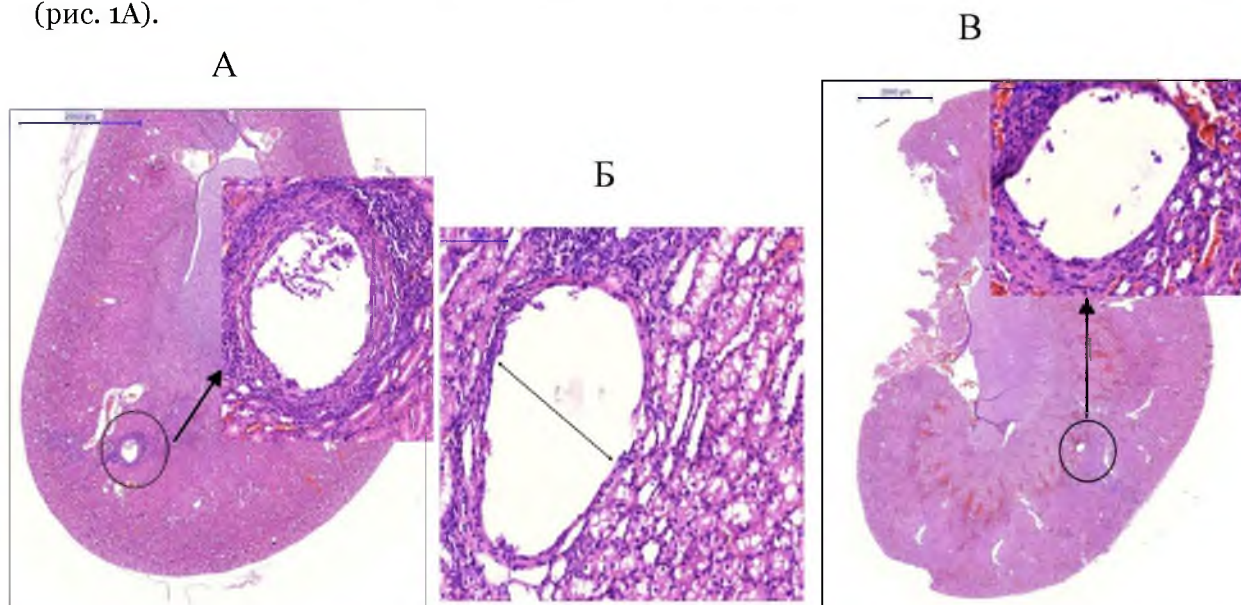


Рис. 1. Общая картина почки на 14-е сутки после введения имплантата: А – из титанового сплава с эффектом памяти формы на основе Ti-Ni-(X); Б – с наноразмерным покрытием на основе аморфного углерода; В – с наноразмерным покрытием на основе аморфного углерода и атомарного серебра. Окр. гематоксилином и эозином. Микрофото. Ув. А – 1 и 20 (цифровое) x 20 (сканирующий объектив); Б – 20 (цифровое) x 20 (сканирующий объектив); В – 1 и 20 (цифровое) x 20 (сканирующий объектив). Пояснения в тексте.



В сериях с использованием имплантатов с покрытием на основе аморфного углерода и сочетания аморфного углерода и азота имелись схожие статистически не значимые морфологические изменения, что, вероятно, обусловлено отсутствием влияния азота на течение воспалительной реакции. Это позволило объединить обе серии наблюдений в группу – «покрытия на основе аморфного углерода» (см. таблицу). В данной группе обнаружены существенные отличия от металлических имплантатов сплавов титана без покрытия. В почках существенно меньше выражены реактивные изменения. Зона формирующейся отграничительной капсулы толщиной менее 20 мкм, в среднем $17,4 \pm 4,2$ мкм ($p < 0,05$). Структура ее представлена несколькими компактными слоями незрелой волокнистой соединительной ткани, содержащей фибробласты – $114 \pm 23,7$ клеток в поле зрения ($p < 0,05$) и расположенной снаружи зоной очаговой лимфоидной инфильтрации (рис. 4). В составе инфильтратов немногочисленные полиморфноядерные лейкоциты, представленные эозинофилами – $12 \pm 4,7$ клеток в поле зрения ($p < 0,01$). Гистиоциты представлены в инфильтратах в количестве $28 \pm 5,8$ клеток в поле зрения ($p < 0,01$), малые лимфоциты – $87 \pm 17,2$ клеток в поле зрения ($p < 0,01$, рис. 1Б).

В группе имплантатов с покрытием на основе аморфного углерода и атомарного серебра степень морфологических изменений оказалась еще меньшей, чем в предыдущих сериях, в том числе имелись статистически значимые различия по сравнению с покрытием на основе аморфного углерода и сплавов титана без покрытия. При обзорном микроскопическом исследовании вокруг мест расположения имплантатов – отверстий в гистологических срезах – заметная реактивная зона не определяется ($p < 0,01$, рис. 3В). На 14-е сутки капсула толщиной $13,4 \pm 3,1$ мкм – достоверно меньше, чем при использовании непокрытых металлических имплантатов ($p < 0,01$), но не отличается от серии с имплантацией материалов с углеродным покрытием. Уже на этом сроке структура капсулы достаточно зрелая и представлена 1-2 слоями компактно расположенных коллагеновых волокон и равномерно распределенными фибробластическими элементами ($64 \pm 8,5$ клеток в поле зрения) ($p < 0,01$). Единичные очаговые лимфоидные инфильтраты не содержат полиморфноядерных лейкоцитов. Количество малых лимфоцитов составляет $48 \pm 6,8$ клеток в поле зрения ($p < 0,01$), гистиоцитов – $16 \pm 4,4$ клеток в поле зрения ($p < 0,05$, рис. 3В). Участками соединительная ткань непрерывно переходит в окружающие стромальные структуры.

30-е сутки исследования. На 30-е сутки эксперимента в почках выявлена завершенная отграничительная реакция на имплантаты из низкомолекулярного титанового сплава системы Ti-Nb-(X) в наноструктурированном состоянии и сплава с эффектом памяти формы на основе никелида титана Ti-Ni-(X). Средняя толщина капсулы уменьшается вдвое, составляя $15,8 \pm 2,7$ мкм. Структура ее гомогенная и представлена 4-7 слоями зрелых коллагеновых волокон без дифференциации на зоны, что наиболее заметно при окраске по Маллори, содержит как фиброциты ($63,0 \pm 5,2$ клеток в поле зрения), так и зрелые фибробласты ($32,0 \pm 4,1$ клеток в поле зрения) (рис. 3А). Умеренные, диффузно расположенные клеточные инфильтраты представлены малыми лимфоцитами ($52,0 \pm 7,5$ клеток в поле зрения) и единичными эозинофилами ($3,0 \pm 0,7$ клеток в поле зрения), гистиоцитарный компонент представлен в количестве $12,0 \pm 3,8$ клеток в поле зрения (рис. 2А).

На 30-е сутки после имплантации материалов с покрытием на основе аморфного углерода динамика изменений аналогична предыдущей серии эксперимента и проявляется в завершении организации отграничительной капсулы, уменьшении ее толщины в среднем вдвое – $9,2 \pm 3,7$ мкм. В почках капсулы вокруг имплантатов образованы 3-4 слоями коллагеновых волокон, содержащими фиброциты ($46 \pm 9,5$ клеток в поле зрения) и единичные фибробласты ($12,0 \pm 3,8$ клеток в поле зрения) ($p < 0,05$). В окружающих участках паренхимы определяются единичные мелкие очаги лимфоидной инфильтрации, содержащие гистиоциты ($6,0 \pm 1,2$ клеток в поле зрения) и малые лимфоциты ($37,0 \pm 7,8$ клеток в поле зрения; $p < 0,05$) (рис. 2Б).

Через месяц после имплантации материала с углерод-серебряным покрытием капсула практически не определяется при окраске гематоксилином и эозином, отчетливо видна при селективной окраске по Маллори, представлена 1-2 слоями

тонких коллагеновых волокон толщиной $6,1 \pm 0,4$ мкм и фиброцитами в количестве $19,0 \pm 5,7$ клеток в поле зрения ($p < 0,05$). Лимфоидные инфильтраты и полиморфноядерные лейкоциты отсутствуют (рис. 2В, 3В). Количество диффузно расположенных гистиоцитов составляет $4,0 \pm 0,2$, малых лимфоцитов $22,0 \pm 4,8$ клеток в поле зрения ($p < 0,05$).

Сводные результаты количественной оценки клеточного состава соединительной ткани вокруг имплантатов представлены на рис. 4 и 5.

Полученные результаты и их анализ позволяют сделать следующие выводы.

1. С четырнадцатых суток выраженность воспалительной реакции со стороны почечной паренхимы на имплантат определяется имплантируемым материалом.
2. К тридцатым суткам завершается образование соединительнотканной капсулы вокруг имплантатов, воспалительная реакция минимальна.
3. Имеются статистически достоверные различия морфологических изменений почечной паренхимы в месте имплантации в зависимости от используемого материала.
4. Минимальные показатели биоинертности отмечены у незащищенных металлических имплантатов.
5. Наилучшие показатели биоинертности получены у имплантатов с наноразмерным покрытием на основе аморфного углерода и атомарного серебра.

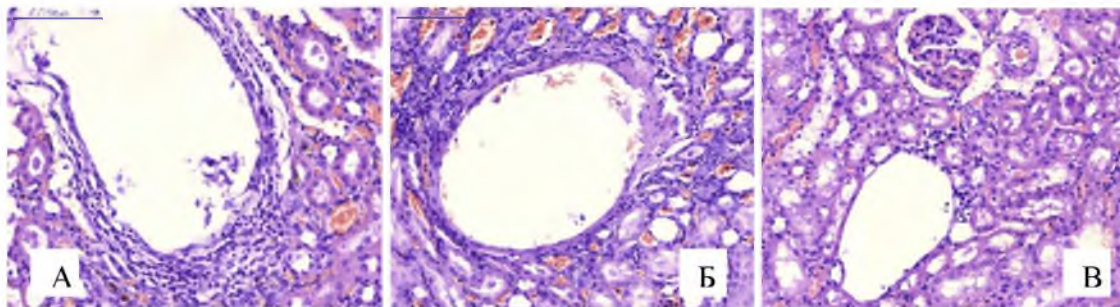


Рис. 2. Общая картина почки на 30-е сутки после введения имплантата: А – из низко модульного титанового сплава системы Ti-Nb-(X) в наноструктурированном состоянии; Б – с наноразмерным покрытием на основе аморфного углерода; В – с наноразмерным покрытием на основе аморфного углерода и атомарного серебра. Окр. гематоксилином и эозином. Микрофото. Ув. А – 20 (цифровое) x 20 (сканирующий объектив); Б – 20 (цифровое) x 20 (сканирующий объектив); В – 10 (цифровое) x 20 (сканирующий объектив). Пояснения в тексте.

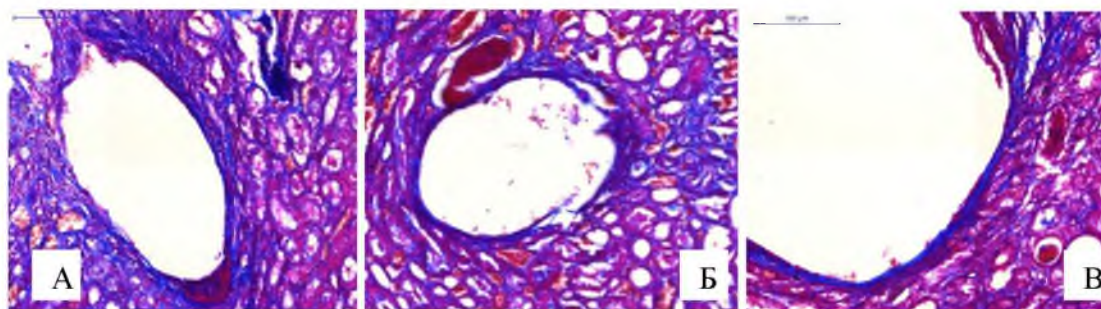
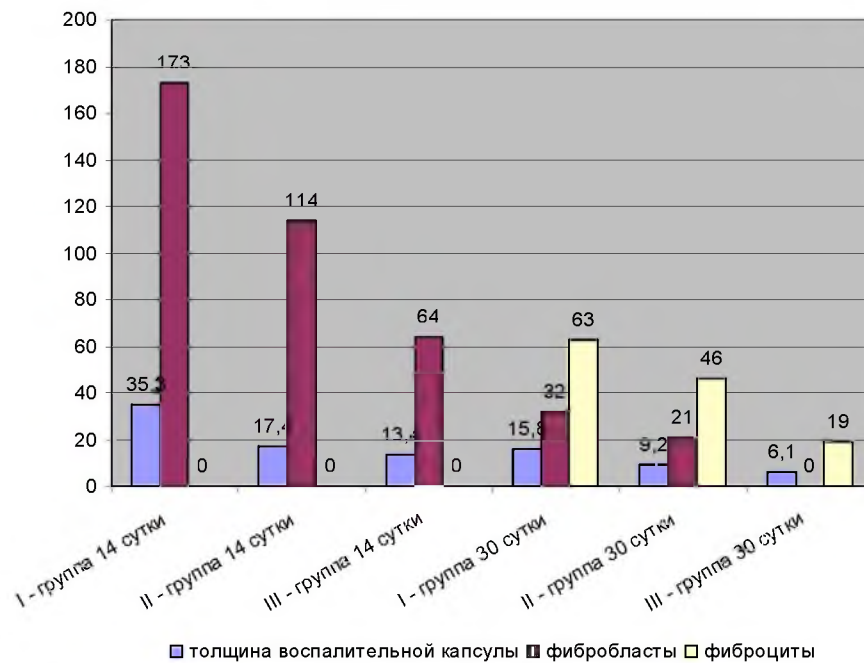


Рис. 3. Выраженность фиброзной капсулы на 30-е сутки после введения имплантата в паренхиму почки: А – из низко модульного титанового сплава системы Ti-Nb-(X) в наноструктурированном состоянии; Б – с наноразмерным покрытием на основе аморфного углерода; В – с наноразмерным покрытием на основе аморфного углерода и атомарного серебра. Окр. Маллори. Микрофото. Ув. А и Б – 20 (цифровое) x 20 (сканирующий объектив), В – 40 (цифровое) x 20 (сканирующий объектив). Пояснения в тексте.

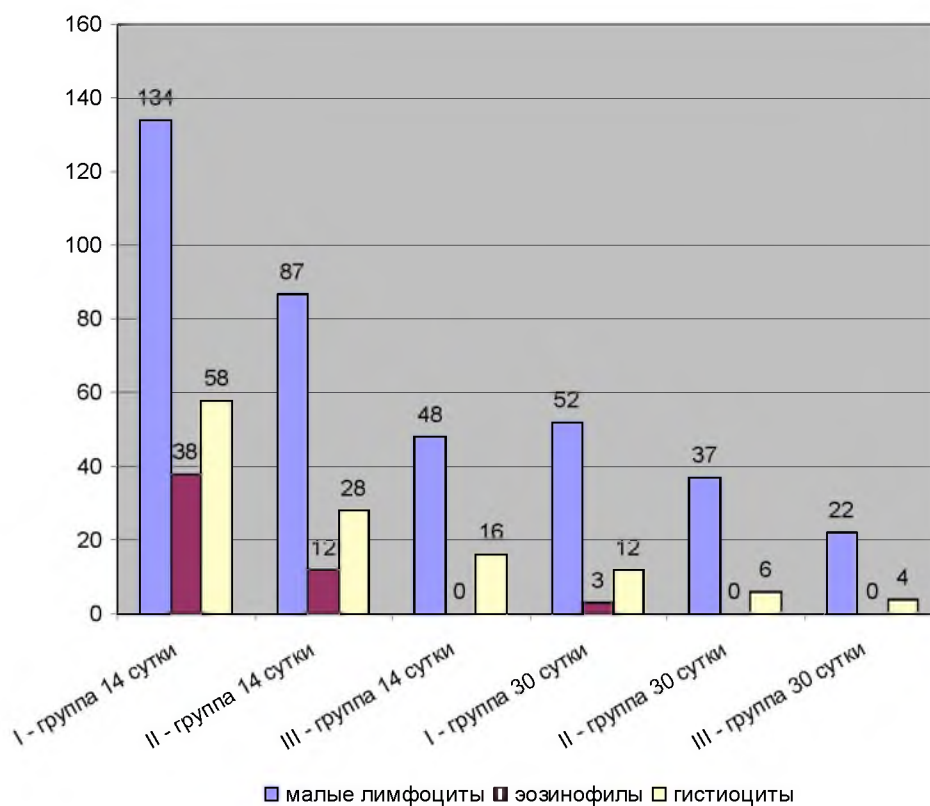


I – сплавы титана;

II – покрытия на основе аморфного углерода;

III – покрытие на основе аморфного углерода и атомарного серебра.

Рис. 4. Динамика изменения толщины (в мкм) и клеточного состава фиброзной капсулы вокруг имплантатов различного типа в почке.



I – сплавы титана;

II – покрытия на основе аморфного углерода;

III – покрытие на основе аморфного углерода и атомарного серебра.

Рис. 5. Динамика изменений клеточного состава воспалительного инфильтрата в паренхиме почки вокруг имплантатов различного типа

Литература

1. Новикова Е.Г., Теплов А.А., Смирнова С.В., Оношко В.Ф., Русаков И.Г. Стриктуры мочеточников у больных раком шейки матки. Российский онкологический журнал. 2009. № 3. С. 28-34.
2. Осложнения лучевой терапии рака шейки матки. Методы дренирования мочевых путей при постлучевых повреждениях мочеточников/Л.А. Синякова//Материалы III конгресса российского общества онкоурологов. Москва, 2008.
3. Гулиев Б.Г. Реконструктивные операции при органической обструкции верхних мочевыводящих путей: Дис.... д-ра мед. наук. -СПб., 2008.
4. Котовский А.Е., Глебов К.Г. Эндоскопическое транспапиллярное стентирование желчных протоков. Анналы хирургической гепатологии. 2008. Т. 13. № 1. С. 66-71.
5. Шиповский В.Н., Цициашвили М.Ш., Джуракулов Ш.Р., Хуан Ч., Магомедов Ш.Г. Стентирование (СТЕНТ-ГРАФТ) гепатикохоледоха при механической желтухе опухолевой этиологии. Кремлевская медицина. Клинический вестник. 2009. № 2. С. 79-80.
6. Дорончук Д.Н., Трапезникова М.Ф., Дутов В.В. Выбор метода дренирования верхних мочевых путей при мочекаменной болезни. Урология. 2010. № 3. С. 7-10.
7. Уренков С.Б. Антеградное стентирование мочеточника пересаженной почки в лечении урологических осложнений у больных после трансплантации с помощью чрескожных оперативных вмешательств. Альманах клинической медицины. 1998. № 1. С. 350-356.
8. Мартов А.Г., Ергаков Д.В., Корниенко С.И. и др. Улучшение качества жизни пациентов с внутренними стентами путем изменения их формы. Урология. 2011. № 2. С. 7-13.
9. Мартов А.Г., Маслов С.А., Салюков Р.В., Лисенок А.А. Рентгеноэндоскопическое лечение мочеточниково-влагалищных и мочеточниково-маточных свищей //Урология: двухмесячный научно-практический журнал. 2006. № 1. С. 11-15.
10. Трапезникова М.Ф., Дутов В.В., Румянцев А.А., Русанова Е.В., Злобин А.Н., Беляев В.В. // Выбор способа дренирования мочевыводящих путей. – Урология. 2011. – № 2. С. 3-7.
11. Auge V. K., Sarvis J. A., L'Esperance J. O., Preminger G. Practice patterns of ureteral stenting after routine ureteroscopic stone surgery: A survey of practicing urologists. J. Endourol. 2007; 21: 1287-1291.
12. Monga M. Ureteral stents: New materials and designs. In: Williams J. C., Evans A., Lingeman J., eds. Renal stone disease. 2-nd ed. Melville, N. Y.: American Institute of Physics; 2008. 173-181.
13. Kay A. Boston Scientific/Microvasive®'s Polaris™ dual durometer ureteral stent: The next generation in stent materials and design [abstract]. J Endourol 2002; 16(suppl): 8.
14. Metallic stents Ravi Kulkarni 1 st edition -Shanghai 2008 World Congress on Endourology. P. 9.
15. Шкуратов С.И., Феофилов И.В., Гюнтер В.Э., Исаенко В.И. Временные и постоянные никелид-титановые стенты при перкутанных операциях по поводу стриктур лоханочно-мочеточникового сегмента. Урология. 2007. № 4. С. 31-34.
16. Мудрая И. С. Функциональные состояния верхних мочевых путей при урологических заболеваниях: Дис.... д-ра мед. наук. -М., 2002.

THE STUDY OF BIOINERTNESS MATERIALS IMPLANTED IN THE PARENCHYMA OF THE KIDNEYS IN THE EXPERIMENT

**S. V. SHKODKIN^{1,2}, A. A. DOLZHIKOV¹
N. I. ZHERNAKOVA¹, U. N. DMITRIEV¹
Y. B. IDASHKIN², V. V. FENTISOV¹**

¹⁾ *Belgorod National Research University*

²⁾ *Regional clinical hospital of St. Ioasaf, Belgorod*

The article describes the morphological changes of the parenchyma of the kidney of rats under implantation of nanostructured samples of titanium alloys. The materials used in the initial state and after the modification of the structure of the surface. Investigated the acute inflammatory response to implant for up to a month. Obtained is statistically reliable difference of morphological changes depending on the type of material.

Key words: implant, bioinertness, inflammation, medical materials.

e-mail: shkodkin-s@mail.ru