



УДК 617.764.5-089.819.1

## КЛЕТОЧНЫЕ РЕАКЦИИ И ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ МЕДИЦИНСКИХ МАТЕРИАЛОВ В ОТНОШЕНИИ ЛЕЙКОВЗВЕСИ ЧЕЛОВЕКА

**С.В. ШКОДКИН<sup>1,2</sup>, Н.А. БОЧАРОВА<sup>1</sup>  
М.И. КОГАН<sup>3</sup>, С.В. ИВАНОВ<sup>4</sup>  
Ю.Б. ИДАШКИН<sup>2</sup>, Е.Ф. МИХАЙЛОВА<sup>2</sup>  
Н.Г. БАХТИНА<sup>2</sup>, О.В. МИРОШНИЧЕНКО<sup>1</sup>  
А.В. ЛЮБУШКИН<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Белгородский государственный  
национальный исследовательский  
университет

<sup>2</sup>ОГБУЗ «Белгородская областная  
клиническая больница Святого  
Иоасафа»

<sup>3</sup>Ростовский государственный  
медицинский университет

<sup>4</sup>Курский государственный  
медицинский университет

*e-mail: shkodkin-s@mail.ru*

Выраженность воспалительной реакции на медицинские импланты определяется биоинертными свойствами материала и коррелирует с функциональной активностью лейкоцитов. В исследовании изучены цитотоксичность и показатели функциональной активности клеток лейкоцитарного ряда в ответ на имплантацию различных медицинских материалов, используемых для изготовления стентов.

Функциональная активность нейтрофилов и цитотоксическая активность естественных киллеров изменялась в присутствии и зависела от исследуемого импланта. Наибольшая воспалительная реакция отмечена на металлы и полиуретан. Наименьшая отмечена в присутствии наноразмерного покрытия на основе аморфного углерода и атомарного серебра.

Ключевые слова: медицинский имплант, стент, воспаление.

Медицинская имплантология занимает одно из ведущих и перспективных направлений в медицине, особенно это касается минимально инвазивных методик [1, 2]. Являясь чужеродным, любой имплант вызывает типичный патофизиологический процесс – воспаление [3, 4]. Длительность функционирования импланта зачастую определяется способностью минимизировать воспалительные реакции [1, 5, 6, 7], т.е. биоинертностью по отношению к тканям организма.

Реализация иммунных реакций в организме запускается антиген презентующей моноцитарно/макрофагальной системой, межклеточные (лимфоцитарные, эпителиальные и фибробластные) взаимодействия опосредованы секрецией цитокинов [8, 9, 10].

Материалами для стентов полых органов малого диаметра чаще являются полимеры (полиуретан, силикон) с гидрофильными покрытиями [2, 3], перспективным представляется использование титан содержащих сплавов: возможно обеспечение более длительных сроков дренирования [1, 2], оксид титана придает инертность импланту. Из сплавов титана чаще используется нитинол (никелид титана), последний обладает способностью к мартенситному превращению, т.е. к эффекту «памяти формы» [2].

**Цель:** изучение биологической инертности материалов, используемых для изготовления внутренних стентов, в отношении лейкоцитарной массы *in vitro*.

**Материалы и методы.** Для изучения прямой цитотоксичности использовали лейкоцитарную массу, полученную из цельной крови четырех здоровых доноров второй А(II) группы крови по системе АВ0, резус фактор положительный Rh (пол), цитограмма которых не выходила за границы нормальных показателей. Лейкоцитарную массу получали центрифугированием в гемоконе 400,0 мл стабилизированной цельной крови на скорости 500 оборотов в минуту в течение 10 мин. Полученный лейкоцитарный слой около 5 мл отжимали в отдельный гемокон, для обеспечения плазменными факторами иммунного ответа полученный лейкоцитарный слой смешивали с аутоплазмой в соотношении 1:20. Уровень лейкоцитов в лейкоцитарной массе доводили до  $15 \times 10^9$ /мл добавлением физиологического раствора натрия хлорида, подогретого до температуры 37°C. Клеточный состав и показатели цитограммы лейкоцитарной массы определялись автоматизированным способом, и их соотношение не отличалось от нормального ( $p > 0,05$ ). Время приготовления лейкоцитарной массы составило  $20,1 \pm 0,4$  мин. Готовую лейкоцитарную массу разливали в пластиковые стерильные контейнеры по 0,5 мл и с исследуемым материалом помещали в термостат при температуре 37°C.

Испытуемые образцы имели одинаковую площадь поверхности - 20 мм<sup>2</sup>. В качестве контрольных материалов исследовали образцы медицинской стали и полиуретана, конвенци-



ально используемых для изготовления мочеточниковых и эндоваскулярных стентов. В основную группу включены наноструктурированный  $\beta$ -сплав титана, наноразмерные покрытия на основе аморфного углерода (нпС) и на основе аморфного углерода и атомарного серебра №2 (нпСAg№2), имеющие аналогичную площадь поверхности. Биоинертные свойства указанных наноразмерных покрытий и  $\beta$ -сплава титана исследованы впервые. Экспериментальные материалы и покрытия изготовлены НОЦ «Наноструктурные материалы и сплавы» НИУ БелГУ, научный руководитель доктор физико – математических наук, профессор Колобов Ю.Р. и «Лабораторией ионно-плазменного напыления» НИУ БелГУ, научный руководитель кандидат физико – математических наук, профессор Колпаков А.Я.

Образец материала помещался в объем 0,5 мл лейкоцезвеси. Лейкоцезвь от каждого донора инкубировалась с десятью образцами каждого из материалов в термостате в течении 24 часов при температуре 37°C с оставлением контроля, распределение групп приведено в таблице 1. Клеточный состав лейкоцезвеси оценивали через 12 и 24 часа (ресуспензировали по пять образцов каждого материала) аппаратным способом и ручным контролем с окраской по Романовскому - Гимзе. Количественные показатели субпопуляций лимфоцитов определяли методом проточной цитометрии.

Таблица 1

**Количество проб по группам наблюдения**

Материал		Количество проб				Итого
		Донор №1	Донор №2	Донор №3	Донор №4	
Исходная цитограмма в лейкоцезвеси		1	1	1	1	4
конт- троль	Медицинская сталь	1(5)+1(5)=2	1(5)+1(5)=2	1(5)+1(5)=2	1(5)+1(5)=2	8
	Полиуретан	1(5)+1(5)=2	1(5)+1(5)=2	1(5)+1(5)=2	1(5)+1(5)=2	8
основная	Наноструктурированный нелигированный титан марки ВТ1-0	1(5)+1(5)=2	1(5)+1(5)=2	1(5)+1(5)=2	1(5)+1(5)=2	8
	Наноразмерное покрытие на основе аморфного углерода	1(5)+1(5)=2	1(5)+1(5)=2	1(5)+1(5)=2	1(5)+1(5)=2	8
	Наноразмерное покрытие на основе аморфного углерода и атомарного серебра №2	1(5)+1(5)=2	1(5)+1(5)=2	1(5)+1(5)=2	1(5)+1(5)=2	8
Контроль		1(2)+1(2)=2	1(2)+1(2)=2	1(2)+1(2)=2	1(2)+1(2)=2	8
Всего						50

Примечание: после ресуспензирования через 12 часов (инкубируемые образцы) + после ресуспензирования через 24 часа (инкубируемые образцы) = всего проб по одному материалу от одного донора.

Для определения активности неспецифического иммунного ответа исследовали фагоцитарную активность нейтрофилов (ФАН) и спонтанную цитотоксическую активность естественных киллеров (СЦАЕК). При изучении фагоцитарной активности полиморфноядерных лейкоцитов в качестве микробной тест-культуры использовали суточную культуру *Staphilococcus epidermidis* штамма 9198. На 30 и 120 минутах инкубации определяли фагоцитарный индекс (ФИ), фагоцитарное число (ФЧ). Рассчитывали коэффициент фагоцитарного числа (КФЧ), как соотношение ФЧ на 30 минуте к ФЧ на 120 минуте инкубации, и индекс бактерицидности нейтрофилов (ИБН) на 120 минуте инкубации, как соотношение числа лизированных бактерий к общему числу поглощенных бактерий. Для изучения СЦАЕК в качестве клеток-мишеней была использована двухсуточная эритромиелобластозидная клеточная линия К-562. Выделенные из лейкоцезвеси мононуклеары и клетки-мишени К-562 в соотношении 20:1 инкубировались в течение 4 часов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. По окончании инкубации пробы ресуспензировали и анализировали на проточном цитометре, СЦАЕК определяли как соотношение числа лизированных клеток-мишеней (исходное число клеток-мишеней минус число клеток после инкубации) к исходному числу клеток-мишеней.

Статистическая обработка полученных данных проводилась на персональном компьютере Pentium 4 с помощью пакета программ Statistica for Windows (версия 6.0, 1996г.). При анализе данных совокупности рассчитывались средние показатели (средняя арифметическая ( $x_{cp}$ ); медиана (Me); мода (Mo)), абсолютные показатели вариации (размах вариации (R); среднее линейное отклонение ( $d_{cp}$ ); дисперсия, ( $\sigma^2$ ); ср. квадратичное отклонение ( $\sigma$ ); квантильное отклонение Гальтона ( $Q=(Q_3-Q_1)/2$ ) и относительные показатели вариации исследуемого признака (коэф. осцилляции ( $V_R=R/x_{cp}$ ); линейный коэф вариации ( $V_{dcp}=d_{cp}/x_{cp}$ ); коэф вариации ( $V_\sigma = \sigma / x_{cp}$ ); квантильный показатель вариации  $K_Q=Q/Me$ ; коэф дифференциации  $K_V=(Q_3-Q_1)/(Q_3+Q_1)$ ). Оценка характера распределения производилась по тестам на нормальность. Нормально распределяемые показатели приводили в их среднем значении со средним квадратичным отклонением:  $M \pm \sigma$ . При ненормальном распределении показатели приведены в значении медианы с



указанием области 50% квартиля: Me (range). Для установления статистической достоверности различий в показателях основной и контрольной групп рассчитывали вероятность по распределению Стьюдента и Фишера. При вероятности меньшей 0,05 различия считали статистически достоверными [11].

Исследование выполнено в рамках государственного контракта по теме: «Исследование закономерностей воспалительной и иммунологической реакции на имплантаты из наноструктурированных материалов и материалов без модифицирования свойств».

**Результаты и их обсуждение.** После стандартизации количества лейкоцитов в лейкозвеси на уровне  $15 \times 10^9/\text{л}$  содержание гранулоцитов в лейкозвеси составило  $6,8 \pm 0,48 \times 10^9/\text{мл}$ , лимфоцитов –  $6,45 \pm 0,84 \times 10^9/\text{мл}$ , моноцитов –  $1,7 \pm 0,06 \times 10^9/\text{мл}$ , тромбоцитов –  $954 \pm 108 \times 10^9/\text{мл}$ . Концентрация эритроцитов не превышала  $0,09 \pm 0,0024 \times 10^{12}/\text{мл}$ , гемоглобина –  $3,1 \pm 0,08$  г/л, уровень гематокрита –  $0,92 \pm 0,04$  %. Исходное относительное содержание субпопуляций Т-лимфоцитов, тесты ФАН и СЦАЕК не отличались от нормальных величин ( $p > 0,05$ ). Их средние значения и показатели среднеквадратичных отклонений приведены в таблице 2.

Через 12 часов инкубации в контрольных эпидорфах (без материала) не выявлено статистически значимых изменений уровня гранулоцитов, моноцитов, общего количества лимфоцитов и их субпопуляций. Так же не отмечено изменений ФАН и СЦАЕК (табл. 3). В то же время в исследуемых материалах на этом сроке уже имелись статистически значимые различия. Наибольшие изменения отмечены в группе с медицинской сталью. Последние проявились статистически значимым цитолизом гранулоцитов  $5,69 \pm 0,46 \times 10^9/\text{мл}$ , относительно исходных данных  $6,82 \pm 0,48 \times 10^9/\text{мл}$  и контроля  $6,72 \pm 0,27 \times 10^9/\text{мл}$  ( $p < 0,05$ ). На данном сроке наблюдения не зарегистрировано лимфоцитоза (табл. 3). Цитолиз гранулоцитов в этой группе сопровождался ростом функциональной активности как нейтрофилов, так и естественных киллеров, причем статистически достоверные различия получены для ФИ и ФЧ на обоих временных интервалах ( $p < 0,05$ ), не зарегистрировано роста КФЧ –  $1,12 \pm 0,05$  и ИБН –  $65,4 \pm 3,46$ , по сравнению с исходными данными –  $1,17 \pm 0,04$  и  $59,2 \pm 3,1$  и контролем  $1,03 \pm 0,05$  и  $59,2 \pm 3,08$  соответственно ( $p > 0,05$ , табл. 3). В этой группе наблюдения отмечается появление нейтрофилов с дегранулированными ядрами и азурофильной (токсической) зернистостью цитоплазмы (рис. 1).

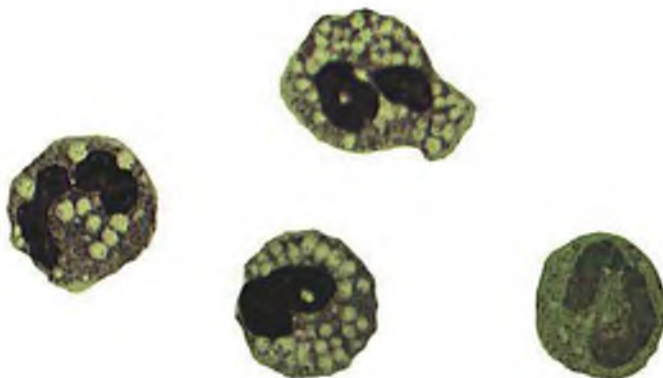


Рис. 1. Токсическая зернистость, вакуолизация цитоплазмы нейтрофилов. Окраска по Романовскому-Гимзе, увеличение  $\times 1000$ .

На этом временном промежутке в остальных группах не отмечено статистически значимого цитолиза. Функциональное состояние неспецифического звена иммунитета характеризовалось ростом СЦАЕК, ФАН и производных индексов, но эти показатели статистически не отличались от контроля кроме, как уже упоминалось, группы с медицинской сталью (табл. 3). Достоверных различий между исследуемыми материалами нами не отмечено. В группе с полиуретаном отмечен статистически достоверный рост фагоцитарной активности на 120 минуте (ФИ<sub>120</sub>, ФЧ<sub>120</sub>) и соответственно снижение КФЧ ( $81,03 \pm 3,27\%$ ,  $13,47 \pm 0,81$  мкб. тел,  $0,67 \pm 0,15$ ), по сравнению с экспериментальными материалами, данные показатели для наноразмерного покрытия на основе аморфного углерода и атомарного серебра №2 составили –  $67,32 \pm 4,42\%$ ,  $8,56 \pm 0,29$  мкб. тел,  $1,03 \pm 0,05$  ( $p < 0,05$ , табл. 3). Повышение данных показателей ФАН на 120 минуте зарегистрировано и для  $\beta$ -сплава  $76,07 \pm 7,26\%$ ,  $9,4 \pm 1,8$  мкб. тел, но достоверных различий с контролем не установлено ( $p > 0,05$ , табл. 3). Содержание субпопуляций лимфоцитов на этом сроке наблюдения не претерпело изменений и не отличалось от контроля.

Через сутки наблюдения отмечен умеренный цитолиз в контрольных эпидорфах за счет клеток гранулоцитарного ряда, что сопровождалось изменением ФАН. Так, зарегистрирован статистически достоверный рост ФИ и ФЧ на обоих временных интервалах (ФИ<sub>30</sub> –



74,49±5,87%, ФИ<sub>120</sub> – 76,59±6,91%, ФЧ<sub>30</sub> – 10,76±0,84 мкб. тел, ФЧ<sub>120</sub> – 11,04±1,63 мкб. тел) по сравнению с исходными данными (ФИ<sub>30</sub> – 63,4±4,5%, ФИ<sub>120</sub> – 61,9±3,8%, ФЧ<sub>30</sub> – 8,83±0,69 мкб. тел, ФЧ<sub>120</sub> – 8,83±0,69 мкб. тел) и показателями контроля через 12 часов (ФИ<sub>30</sub> – 64,15±4,26%, ФИ<sub>120</sub> – 64,03±2,93%, ФЧ<sub>30</sub> – 8,63±0,69 мкб. тел, ФЧ<sub>120</sub> – 8,56±0,29 мкб. тел) (p<0,05, табл. 2-4). Показатели КФЧ и ИБН не изменились, а повышение СЦАЕК не имело статистически значимых различий в данных группах наблюдения (p>0,05, табл. 2-4).

Таблица 2

**Исходные показатели цитогаммы и клеточной активности неспецифического звена иммунитета лейкозвеси доноров**

Исследуемые показатели	Донор №1	Донор №2	Донор №3	Донор №4	среднее арифметич.± ср. кв. откл.
Эритроциты, x10 <sup>12</sup> /л	0,089	0,087	0,092	0,092	0,09±0,0024
Гемоглобин, г/л	3,17	3,14	3,12	2,99	3,1±0,08
Гематокрит, %	0,96	0,93	0,91	0,87	0,92±0,04
Тромбоциты, x10 <sup>9</sup> /л	995	812	1068	941	954±108
Лейкоциты, x10 <sup>9</sup> /л	15	15	15	15	15±0
Гранулоциты, x10 <sup>9</sup> /л; %	6,93	6,12	6,98	7,23	6,8±0,48
Моноциты x10 <sup>9</sup> /л; %	1,64	1,8	1,67	1,69	1,7±0,07
Лимфоциты, x10 <sup>9</sup> /л; %	6,43	7,08	6,35	6,08	6,49±0,42
Т-лимф.(CD3+CD19-), x10 <sup>9</sup> /л; %	4,81; 74,81	5,36; 75,71	5,15; 81,10	4,93; 81,09	5,06±0,24; 78,17±3,39
Т-хелп.(CD3+CD4+), x10 <sup>9</sup> /л; %	2,93; 45,57	3,26; 46,05	3,17; 49,92	2,84; 46,71	3,05±0,19; 47,06±1,96
Т-супр.(CD3+CD8+), x10 <sup>9</sup> /л; %	1,37; 21,31	1,54; 21,75	1,48; 23,31	1,57; 25,82	1,49±0,09; 23,05±2,04
Индекс CD4/CD8	1,99	2,02	2,10	2,07	2,05±0,05
Т-НК (CD3+CD[16+56]+), x10 <sup>9</sup> /л; %	0,23; 3,58	0,29; 4,10	0,25; 3,94	0,22; 3,62	0,25±0,03; 3,81±0,25
Т-актив. (CD3+HLA_DR+), x10 <sup>9</sup> /л; %	0,28; 4,35	0,27; 3,81	0,25; 3,94	0,3; 4,93	0,28±0,02; 4,26±0,51
В-лимф.(CD3-CD19+), x10 <sup>9</sup> /л; %	0,83; 12,91	0,92; 12,99	0,69; 10,87	0,67; 11,02	0,78±0,12; 11,95±1,16
НК (CD3-CD[16+56]+), x10 <sup>9</sup> /л; %	0,79; 12,29	0,8; 11,30	0,51; 8,03	0,48; 7,89	0,65±0,17; 9,88±2,25
ФИ <sub>30</sub> , %	62	60	67	58	61,9±3,8
ФИ <sub>120</sub> , %	69	67	60	61	64,4±4,5
ФЧ <sub>30</sub> , мкб. тел	9,83	8,75	8,28	8,45	8,83±0,69
ФЧ <sub>120</sub> , мкб. тел	8,19	7,53	7,00	7,56	7,57±0,48
КФЧ	1,20	1,16	1,18	1,12	1,17±0,04
ИБН	56,19	57,26	62,97	60,40	59,2±3,1
СЦАЕК, %	33,07	38,74	34,73	33,78	35,1±2,5

В эпиндорфах с материалами цитолиз был менее специфичен и более выражен по сравнению с контролем, статистически достоверное снижение уровня лейкоцитов отмечено в группах с медицинской сталью, полиуретаном и β-сплавом, что составило 9,21±0,43x10<sup>9</sup>/л, 10,57±0,43x10<sup>9</sup>/л, 10,75±0,65x10<sup>9</sup>/л соответственно (p<0,05, табл. 4). По сравнению с контролем в группах нпС и нпСAg№2, содержание лейкоцитов не имело достоверных различий и находилось в этих группах на уровне 13,48±1,12x10<sup>9</sup>/л, 13±0,18x10<sup>9</sup>/л и 13,48±1,12x10<sup>9</sup>/л соответственно (p>0,05, табл. 4). При анализе иммунограмм в группах медицинской стали, полиуретана и β-сплава установлено отсутствие достоверных различий в абсолютных уровнях моноцитов, В-лимфоцитов и субпопуляций Т-лимфоцитов по сравнению с контролем и корреляция по содержанию клеток гранулоцитарного ряда и естественных киллеров, уровень которых был статистически ниже контроля и групп с покрытиями (p<0,05, табл. 4). Если содержание НК-клеток не различалось в этих группах наблюдения, составив 0,29±0,08 x 10<sup>9</sup>/л, 0,34±0,12 x 10<sup>9</sup>/л, 0,28±0,11 x 10<sup>9</sup>/л, соответственно (p>0,05, табл. 4), то уровень гранулоцитов в группе медицинской стали имел минимальные значения и достоверно отличался от групп полиуретана и β-сплава, что составило 3,32±0,49 x 10<sup>9</sup>/л, 4,52±0,34 x 10<sup>9</sup>/л, 4,56±0,25 x 10<sup>9</sup>/л соответственно (p<0,05, табл. 4). Для группы с медицинской сталью была характерна токсигенная зернистость нейтрофилов, вакуолизация цитоплазмы и дегрануляция ядер последних (рис. 1). Показатели цитолиза в группах нпС и нпСAg№2 достоверно не отличались между собой и контролем (p>0,05, табл. 4).

Таблица 3

## Показатели цитограммы и клеточной активности неспецифического звена иммунитета лейкозвеси доноров через 12 часов

Исследуемые показатели	Исследуемые материалы											
	сталь		полиуретан		β-сплав		нпС		нпСAg№2		контроль	
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	0,09±0,002		0,083±0,0091		0,091±0,0165		0,089±0,0172		0,087±0,0106		0,089±0,0063	
Гемоглобин, г/л	3,09±0,023		2,98±0,11		3,06±0,1		3,02±0,13		3,02±0,11		3,05±0,1	
Гематокрит, %	0,89±0,019		0,78±0,13		0,81±0,055		0,89±0,11		0,82±0,05		0,82±0,054	
Тромбоциты, $\times 10^9/л$	828,25±81,72		828,08±65,24		788,61±72,13		806,85±83,3		808,16±79,06		772,56±52,53	
Лейкоциты, $\times 10^9/л$	14,08±0,67		14,57±0,49		14,49±0,53		14,82±0,39		15,05±0,17		14,66±0,49	
Гранулоциты, $\times 10^9/л$ ; %	5,69±0,46*	40,47±3,33	6,32±0,29	43,39±1,7	6,45±0,2	44,51±0,70	6,64±0,21	44,85±2,18	6,7±0,13	44,85±2,18	6,72±0,27	45,86±1,74
Моноциты $\times 10^9/л$ ; %	1,62±0,07	11,5±0,78	1,57±0,08	10,78±0,34	1,57±0,04	10,81±0,35	1,65±0,04	11,13±0,23	1,65±0,03	11,13±0,23	1,61±0,06	11,01±0,59
Лимфоциты, $\times 10^9/л$ ; %	6,77±0,78	48,03±4,03	6,68±0,34	45,83±1,46	6,48±0,34	44,67±0,96	6,53±0,48	44,02±2,16	6,7±0,21	44,02±2,16	6,33±0,47	43,13±2,24
Т-лимф.(CD3+CD19-), $\times 10^9/л$ ; %	4,97±0,45	73,56±2,98	5,08±0,23	76,19±5,37	4,96±0,06	76,75±3,88	5,17±0,31	79,26±3,16	5,19±0,27	79,26±3,16	5,15±0,37	81,51±3,63
Т-хелп.(CD3+CD4+), $\times 10^9/л$ ; %	2,88±0,17	42,74±2,36	2,89±0,05	43,15±1,52	2,86±0,07	44,21±1,62	2,93±0,16	44,95±1,23	2,98±0,14	44,95±1,23	2,91±0,06	46,16±3,56
Т-супр.(CD3+CD8+), $\times 10^9/л$ ; %	1,45±0,13	21,43±1,65	1,44±0,15	21,47±1,12	1,43±0,11	22,20±2,61	1,51±0,07	23,23±2,57	1,56±0,11	23,23±2,57	1,46±0,11	23,16±2,47
Индекс CD4/CD8	2±0,11		2,02±0,17		2,01±0,17		1,95±0,19		1,92±0,17		2±0,16	
T-NK (CD3+CD[16+56]+), $\times 10^9/л$ ; %	0,29±0,06	4,32±0,72	0,25±0,03	3,73±0,59	0,24±0,02	3,64±0,18	0,26±0,01	3,96±0,34	0,23±0,03	3,96±0,34	0,27±0,04	4,32±0,69
T-актив. (CD3+HLA_DR+), $\times 10^9/л$ ; %	0,35±0,21	5,06±2,72	0,51±0,3	7,84±4,64	0,43±0,1	6,70±1,56	0,47±0,18	7,13±2,34	0,43±0,33	7,13±2,34	0,51±0,3	7,88±4,19
В-лимф.(CD3-CD19+), $\times 10^9/л$ ; %	0,72±0,07	10,84±2,07	0,69±0,06	10,27±0,73	0,62±0,06	9,56±0,89	0,67±0,08	10,34±1,48	0,69±0,04	10,34±1,48	0,62±0,07	9,82±0,43
NK (CD3-CD[16+56]+), $\times 10^9/л$ ; %	1,08±0,44	15,61±4,88	0,91±0,41	13,54±5,33	0,9±0,32	13,69±4,24	0,69±0,3	10,40±4,40	0,82±0,27	10,40±4,40	0,55±0,23	8,67±3,52
ФИ <sub>30</sub> , %	80,75±4,03*		72,71±8,65		70,3±8,14		67,47±2,99		61,32±5,56		64,15±4,26	
ФИ <sub>120</sub> , %	81,25±2,99*		81,03±3,27*		76,07±7,26		72,47±4,35		66,52±8,1		64,03±2,93	
ФЧ <sub>30</sub> , мкб. тел	11,25±0,58*		9,97±1,39		9,65±1,79		8,44±1,05		9,01±1,64		8,63±0,69	
ФЧ <sub>120</sub> , мкб. тел	10,1±0,75*		13,47±0,81*		9,4±1,8		8,94±0,9		9,25±1,75		8,56±0,29	
КФЧ	1,12±0,05		0,67±0,15*		1,07±0,32		0,95±0,1		0,98±0,12		1,03±0,05	
ИБН	65,4±3,46		63,64±5,69		67,1±7,31		65,3±5,52		62,08±5,6		59,2±3,08	
СЦАЕК, %	45,43±2,3*		39,15±6,34		40,39±3,79		35,85±3,56		36,17±4,24		34,04±2,98	

Примечание: \* - имеются статистически достоверные различия с контролем и исходными данными ( $p < 0,05$ ).

Таблица 4

## Показатели цитограммы и клеточной активности неспецифического звена иммунитета лейкоцитарии доноров через 24 часа

Исследуемые показатели	Исследуемые материалы											
	сталь		полиуретан		β-сплав		нпС		нпСAgN <sup>o</sup> 2		контроль	
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	0,091±0,006		0,089±0,012		0,084±0,007		0,087±0,015		0,082±0,008		0,092±0,016	
Гемоглобин, г/л	2,92±0,126		2,93±0,24		2,96±0,16		3,05±0,08		3,09±0,17		2,97±0,15	
Гематокрит, %	0,87±0,136		0,84±0,14		0,82±0,11		0,87±0,13		0,84±0,07		0,81±0,092	
Тромбоциты, $\times 10^9 /л$	648,46±60,95		671,31±44,69		694,76±32,87		782,1±34,25		777,16±103,27		768,42±19,22	
Лейкоциты, $\times 10^9 /л$	9,21±0,43*		10,57±0,43*		10,75±0,65*		13,13±0,79		13±0,18		13,48±1,12	
Гранулоциты, $\times 10^9 /л$ ; %	3,32±0,49*	35,88±3,68	4,52±0,34*	42,72±2,3	4,56±0,25*	37,65±2,19	5,89±0,73	44,75±3,48	5,6±0,32	43,06±2,16	5,85±0,67	43,3±1,84
Моноциты $\times 10^9 /л$ ; %	0,92±0,16	10,03±2,01	1,08±0,09	10,21±0,79	1,49±0,14	13,91±1,19	1,39±0,16	10,67±1,65	1,3±0,11	10,03±0,8	1,48±0,18	10,94±0,99
Лимфоциты, $\times 10^9 /л$ ; %	4,98±0,1	54,09±1,79	4,97±0,25	47,07±2,02	5,19±0,15	48,43±3,53	5,85±0,53	44,58±3,41	6,1±0,18	46,92±1,53	6,16±0,38	45,76±1,2
Т-лимф.(CD3+CD19-), $\times 10^9 /л$ ; %	4,02±0,08	80,8±2,34	3,96±0,09	79,69±2,72	4,28±0,2	82,41±2,18	4,3±0,22	73,74±5,03	4,46±0,18	73,13±2,18	4,72±0,34	76,58±3,25
Т-хелп.(CD3+CD4+), $\times 10^9 /л$ ; %	2,14±0,09	43,02±2,08	2,25±0,11	45,44±4,64	2,38±0,18	45,77±1,42	2,34±0,11	40,31±4,07	2,55±0,29	41,76±1,85	2,43±0,26	39,57±4,04
Т-супр.(CD3+CD8+), $\times 10^9 /л$ ; %	1,04±0,04	20,84±0,9	1,12±0,08	22,52±2,02	1,16±0,13	22,41±2,88	1,26±0,11	21,73±2,98	1,23±0,03	20,1±0,75	1,22±0,17	19,8±2,18
Индекс CD4/CD8	2,06±0,02		2,02±0,17		2,07±0,27		1,87±0,25		2,08±0,12		2±0,11	
Т-NK (CD3+CD[16+56]+), $\times 10^9 /л$ ; %	0,21±0,03	4,16±0,64	0,27±0,01	5,46±0,48	0,25±0,02	4,88±0,54	0,24±0,02	4,18±0,58	0,23±0,01	3,85±0,33	0,25±0,03	4,08±0,3
Т-актив. (CD3+HLA_DR+), $\times 10^9 /л$ ; %	0,64±0,22	12,78±4,28	0,32±0,21	6,27±4,19	0,49±0,3	9,35±5,42	0,43±0,24	7,51±3,49	0,45±0,21	7,42±3,39	0,81±0,28	13,12±3,97
В-лимф.(CD3-CD19+), $\times 10^9 /л$ ; %	0,68±0,09	13,68±1,65	0,67±0,05	13,61±1,54	0,64±0,02	12,23±0,23	0,71±0,08	12,16±0,51	0,73±0,1	12,03±1,64	0,75±0,1	11,86±2,18
NK (CD3-CD[16+56]+), $\times 10^9 /л$ ; %	0,29±0,08*	5,52±1,53	0,34±0,12*	6,7±2,04	0,28±0,11*	5,36±2,19	0,84±0,36	14,1±4,86	0,9±0,04	14,84±0,55	0,72±0,25	11,56±3,46
ФИ <sub>30</sub>	24,02±4,08*		51,56±2,03*		53,03±6,95*		71,66±6,2		75,27±3,79		74,49±5,87	
ФИ <sub>120</sub>	25,1±4,08*		48,18±4,96*		51,93±2,99*		76,79±5,8		78,14±2,82		76,59±6,91	
ФЧ <sub>30</sub>	3,66±2,31*		4,81±1,15*		6,73±0,42*		10,29±1,71		9,82±1,16		10,76±0,84	
ФЧ <sub>120</sub>	3,44±2,37*		6,29±1,05*		7,11±0,76*		9,68±0,96		10,38±1,59		11,04±1,63	
КФЧ	1,13±0,25		0,78±0,25		0,95±0,07		1,06±0,1		0,97±0,23		0,99±0,15	
ИБН	13,32±1,64*		31,91±2,61*		38,27±4,33*		59,66±1,72		58,85±4,79		62,03±4,6	
СЦАЕК	9,08±1,75*		18,99±3,29*		22,62±3,28*		31,82±1,13		30,6±2,28		30,24±3,56	

Примечание: \* - имеются статистически достоверные различия с контролем ( $p < 0,05$ ).



В группе с медицинской сталью отмечено выраженное угнетение ФАН на обоих временных интервалах и СЦАЕК (ФИ<sub>30</sub> – 24,02±4,08%, ФИ<sub>120</sub> – 25,1±4,08%, ФЧ<sub>30</sub> – 3,66±2,31 мкб. тел, ФЧ<sub>120</sub> – 3,44±2,37 мкб. тел, СЦАЕК – 9,08±1,75%) не только по сравнению с другими группами, но и с исходными показателями (ФИ<sub>30</sub> – 61,9±3,8%, ФИ<sub>120</sub> – 64,4±4,5%, ФЧ<sub>30</sub> – 8,83±0,69 мкб. тел, ФЧ<sub>120</sub> – 7,57±0,48 мкб. тел, СЦАЕК – 35,1±2,5 %) (p<0,05, табл. 2, 4). Так же статистически значимое снижение ФАН (особенно на 120 минуте) и СЦАЕК по сравнению с наноразмерными покрытиями и контролем зарегистрировано в группах с полиуретаном и β-сплавом (p<0,05, табл. 4).

В полученных результатах отсутствуют специфические изменения уровня В-лимфоцитов и субпопуляций Т-лимфоцитов, что связано, как с малыми сроками наблюдения, так и с отсутствием иммуногенности у исследуемых имплантатов. Снижение уровня этих клеток носило неспецифический характер, что было связано с вторичным цитолизом и практически не отличалось в группах наблюдения.

Клеточные реакции на имплантаты были реализованы за счет неспецифического звена иммунитета, что проявилось изменением функциональной активности нейтрофилов и естественных киллеров. При этом, в группах с низкими показателями биоинертности (медицинской стали, полиуретана и β-сплава) отмечен выраженный рост ФАН и СЦАЕК уже через 12 часов инкубации, который в группе медицинской стали сопровождался цитолизом нейтрофилов. Через сутки наблюдения в этих группах преобладают процессы цитолиза, главным образом за счет нейтрофилов и естественных киллеров, сопровождающиеся снижением ФАН и СЦАЕК. В группах с наноразмерными покрытиями клеточные реакции имели аналогичный характер, но явления цитолиза статистически достоверно были менее выражены, не отмечалось угнетения ФАН и СЦАЕК на исследуемых сроках наблюдения. Это позволяет сделать заключение об их лучшей биосовместимости. Конечно же, данная модель не отражает всего многообразия клеточных реакций на импланты в организме, но, на наш взгляд, помогает обосновать использование имплантов с лучшими показателями биоинертности. Попытки увеличения сроков наблюдения на данной модели не увенчались успехом, что было связано с массивным цитолизом и, соответственно, неспецифическим ростом содержания цитокинов. Использование консервирующих сред не дало положительного эффекта. Решение данной проблемы возможно либо в разработке способов длительного *in vitro* культивирования лейкоцитов с аутоплазмой, либо в создании экспериментальной модели на животных. Последний вариант нами расценен как более перспективный, т.к., не ограничиваясь в сроках наблюдения, имелась бы возможность прижизненной оценки уровня как системной (определение цитограммы и уровня цитокинов сыворотки), так и, что более важно, местной (определение цитограммы и уровня цитокинов в моче при имплантации стента из исследуемого материала в мочевые пути) воспалительной реакции, а так же возможность изучения морфологических изменений в месте имплантации и органах иммунной системы.

#### **Выводы:**

1. На данных сроках наблюдения иммунные реакции на исследуемые импланты реализовались за счет неспецифического звена иммунного ответа.
2. Незащищенные металлы и полиуретан вызывали статистически значимое повышение ФАН и СЦАЕК в первые 12 часов инкубации, которые сменялись угнетением этих показателей и значимым цитолизом к концу суток наблюдения.
3. Наноразмерные покрытия нпС и нпСAg№2 не вызывали массивного цитолиза и угнетения ФАН и СЦАЕК на данных сроках наблюдения, т.е., имели лучшие показатели биосовместимости.
4. Необходимо дальнейшее изучение биоинертных свойств наноразмерных покрытий.

#### **Литература**

1. Мацко Д.Е. Экспериментальное исследование биологической инертности сплава никеля и титана с памятью формы / Мацко Д.Е., Омельченко А.В., Жанайдаров Ж.С., Давыдов Е.Л., Климан Л.В. // Морфология, 2005.-N 6.-С.57-60
2. Лысенко Л.Н. Биоматериалы: вклад в прогресс современных медицинских технологий // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2005. - №2.-С.32-38.
3. Бебуришвили А.Г. Отдаленные результаты и качество жизни у больных после операций внутреннего дренирования желчевыводящих путей / Бебуришвили А.Г., Зюбина Е.Н., Рубайлова Н.Ю. // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета, 2004.-N 10.-С.64-67
4. Мартов А.Г. Влияние мочеточниковых стентов на перистальтику верхних мочевых путей / Мартов А.Г., Зенков С.С., Кирпатовский В.И., Мудрая И.С. // Урология и нефрология, 1998.-N 5.-С.31-35
5. Мартов А.Г. Внутреннее протезирование мочеточника Мартов А.Г., Кирпатовский В.И., Мудрая И.С., Обухова Т.В. // Урология и нефрология, 2000.-N 2.-С.28-34



6. Пугачев А.Г. Состояние уродинамики верхних мочевых путей после пластических операций на мочеочнике / Пугачев А.Г., Кириатовский В.И., Мудрая И.С., Обухова Т.В., Москалев И.Н. // Урология, 2001.-N 5.-С.12-16
7. Лопаткин Н.А. Рациональная фармакотерапия в урологии/ под редакцией Н. А. Лопаткина, Т. С. Перепановой – М.: Литтерра, 2006. – 466 с.
8. Земсков, А.М. Клиническая иммунология: учебник для вузов / А.М. Земсков, В.М. Земсков, А.В. Караулов – «ГЭОТАР-Медиа», 2008. – 432 с.
9. Иммунометаболические эффекты регуляторов энергетического обмена при нарушении гомеостаза / Л.Г Прокопенко [и др.]; под ред. Л.Г. Прокопенко. – Курск, 2006 – 329 с.
10. Хайтов, Р.М. Руководство по клинической иммунологии: иммунодиагностика заболеваний иммунной системы / Р.М. Хайтов, А.А. Ярилин, Б.В. Пинегин – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 352 с.
11. Гублер, Е.В. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях / Е.В. Гублер, А.А. Генкин – Л.: Медицина, 1973. – 141 с.

## **CELLULAR RESPONSES AND CYTOTOXICITY MEDICAL MATERIALS WITH RESPECT TO HUMAN LEUKOCYTE**

**S.V. SHKODKIN<sup>1,2</sup>, K.A. BOCHAROVA<sup>1</sup>  
M.I. KOGAN<sup>3</sup>, S.V. IVANOV<sup>4</sup>  
Y.B. IDASHKIN<sup>2</sup>, E.F. MICHAILOVA<sup>2</sup>  
N.G. BAHTINA<sup>2</sup>, O.V. MIROSHNICHENKO<sup>1</sup>  
A.V. LUBUSHKIN<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Belgorod National  
Research University*

*<sup>2</sup>Belgorod Regional  
Hospital St. Joasaph*

*<sup>3</sup>Rostov State Medical University*

*<sup>4</sup>Kursk State Medical University*

*e-mail: shkodkin-s@mail.ru*

The intensity of the inflammatory reaction on medical implants is determined by the bioinert properties of the material and correlates with functional activity of leukocytes. The study presents the results cytotoxicity and functional activity of leukocytes in response to implantation various medical materials used for the manufacture of stents.

The functional activity of neutrophils and cytotoxic activity of NK-cells are varied in the presence of the test implant. Most inflammatory reaction marked metal and polyurethane. Lowest observed in the presence of nanosized layer of amorphous carbon and atomic silver.

Key words: medical implant, stent, inflammation.