

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ



УДК 67.089.6:616-089.843

ТЕСТИРОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ НЕОРГАНИЧЕСКИХ ИМПЛАНТАТОВ

Т. А. Алексеева, И. В. Гомоляко, О. Н. Лазаренко, П. М. Литвин, В. А. Тиньков, В. И. Сморгжевский

Научно—практический центр профилактической и клинической медицины Государственного управления делами, Национальный институт хирургии и трансплантологии имени А. А. Шалимова НАМН Украины, Институт химии поверхности имени А. А. Чуйко НАН Украины, Институт физики полупроводников им. В. Е. Лашкарева НАН Украины, Национальная медицинская академия последипломного образования имени П. Л. Шупика МЗ Украины, г. Киев

THE BIOCOMPATIBILITY TESTING OF VARIOUS TYPES OF NONORGANIC IMPLANTS

T. A. Alekseyeva, I. V. Gomolyako, O. N. Lazarenko, P. M. Litvin, V. A. Tihnkov, V. I. Smorzhevskiy

Применение имплантатов для восстановления утраченных способностей человека является ключевым направлением современной медицины. Вначале в качестве материала для имплантатов использовали нержавеющую сталь, которая обладает химической стойкостью к различным средам. Диапазон жизнедеятельности организма лежит в пределах pH 6—8. Вне этих параметров возникает необратимая деструкция тканей. При вынужденном удалении протезов из—за утраты их функциональности и/или возникновения выраженного асептического воспаления вокруг него обнаружено, что поверхность имплантата подвергалась селективному растворению, изменялась окраска окружающих имплантат тканей. Причиной такого изменения являются артефакты, поглощенные макрофагами и гигантскими клетками инородных тел.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные исследования на животных проведены на базе вивария Национального института хирургии и трансплантологии в 2004 — 2007 гг. Лицензия НАН Украины выдана после сертификации

Реферат

Изучено влияние живого организма на неорганические материалы, которые используют для изготовления имплантатов. Установлено, что организм реципиента активно воздействует на экзогенный материал, разрушая его поверхностный слой и формируя вокруг имплантата соединительнотканную капсулу. Поверхность имплантата может подвергаться селективному растворению вследствие асептического воспаления вокруг него, в такой ситуации приходится удалять протезы, которые утратили функциональность. Исследовано влияние организма на поверхность различных имплантатов неорганической природы и пути его предупреждения. Предложен инструментальный метод тестирования совместимости материала имплантата с организмом реципиента до операции с использованием атомно—силового микроскопа (АСМ).

Ключевые слова: неорганические имплантаты; реакция организма; биосовместимость; тестирование; атомно—силовая микроскопия.

Abstract

Impact of living organism on nonorganic materials, which are applied for the implants manufacturing, was studied. There was established, that organism of a recipient patient actively effects on exogenic material, destroying its superficial layer and forming the connective tissue capsule around the implant. The implant surface may start to dissolve selectively as a result of aseptic inflammation, keeping around, in such a situation it become necessary to remove the prostheses, which have lost their function. Impact of organism on surface of different implants of nonorganic origin and the ways of it prophylaxis were investigated. Instrumental method of the preoperative compatibility testing between a recipient organism and the implant material, using the atomic—power microscope, was proposed.

Key words: nonorganic implants; reaction of organism; biocompatibility; testing; atomic—power microscopy.

экспериментальной базы в соответствии с нормами Европейского общества по проведению экспериментов с животными.

Образцы нержавеющей стали 316L в виде саморасширяющихся стентов, монеток диаметром 8 мм, толщиной 0,2 мм, спиц диаметром

2,5 мм, длиной 20 мм устанавливали в соответствии с протоколом экспериментальным животным (кролям и крысам) под наркозом кетаминном и тиопентал—натрием.

Животных отсаживали в стандартные клетки по одному. Температура воздуха в помещении (24 ± 1)°C,

относительная влажность 30 — 70%, световой цикл 12 ч. Животных содержали на рационе в соответствии с правилами МЗ Украины, доступ к воде свободный. Животным перед операцией внутримышечно вводили седативный препарат кетамин (2 мл/кг), через 5 — 10 мин (в зависимости от времени начала действия премедикации) — тиопентал—натрий в концентрации 15 мг/кг. Во время операции использовали операционные бинокулярные очки фирмы Karl Zeiss (Германия).

Через установленные сроки (4 нед — при наличии внутримышечных и иммобилизирующих имплантатов и 8 нед — внутрисосудистых стентов) животных выводили из эксперимента. Образцы имплантатов иссекали из тканей для исследования их поверхности с использованием сканирующего электронного микроскопа (СЭМ). Ткани с имплантатами помещали в 10% раствор нейтрального формалина для гистологических исследований.

Цифровую обработку изображения и морфометрию всех гистологических препаратов проводили с помощью микроскопа Olympus BX—41 с применением программного обеспечения Olympus DP—Soft.

Результаты исследований обрабатывали статистическими методами с помощью программ Microsoft® Office Excel 2003 и Statistica 7.0® (StatSoft, Inc. 1984—2006).

Поверхность и свойства имплантатов до и после установки изучали с помощью световой микроскопии, СЭМ и электронной дисперсионной спектроскопии (ЭДС).

У животных забирали кровь до и после операции для определения уровня глюкозы и С—реактивного протеина, а также перед операцией для выделения из сыворотки крови суммарных IgG методом precipitation раствором аммония сульфата. IgG из раствора в концентрации 70 нг/мл наносили на острие зонда АСМ для определения силы удерживания поверхностью IgG [1, 2]. В исследовании использовали сканирующий зондовый микроскоп Dimension 3000 NanoScope IIIa (Veeco corp.). Скорость вертикаль-

ного перемещения зонда выбирали в диапазоне от 20 до 20000 нм/с. Для измерения использовали контактные зонды Si3N4 марки DNP—20 (Veeco Inc.) и V—подобный кантиливер. В усреднении радиус острия зонда составлял 30 нм, жесткость кантиливера 0,06 Н/м. Контроль формы острия проводили до и после измерения по методу "слепой реконструкции" с использованием типовой решетки TGT—1 (NT—MDT). Для изучения поверхности имплантатов до и после пребывания в организме использовали СЭМ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

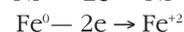
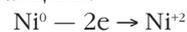
Стенты

Саморасширяющиеся проволочные стенты устанавливали в брюшную часть аорты кролей по приведенной ранее методике [3 — 5]. После извлечения имплантатов проведены макроскопические исследования образцов, установлено, что организм различных животных по-разному реагирует на имплантат. Реакцию организма у некоторых животных характеризовали как гиперреакцию. По данным гистологических исследований, проведенных согласно протоколу [4], подтверждены результаты макроскопии. Так, при гиперреакции вокруг стента образовывалась значительной толщины неоинтима (рис. 1), содержащая кисты, в месте расположения элементов стента наблюда-

ли небольшие кровоизлияния и инфильтрацию лимфоцитами. По данным иммуногистохимического анализа тканей сосуда в месте установки стента отмечена "атака" имплантата лимфоидными элементами.

Результаты СЭМ приведены на рис. 2. Химический состав поверхности стента после извлечения из организма определяли и сравнивали с исходными данными материала протеза по оригинальной методике [2—4, 6]. Также проведен химический анализ на срезе стента (табл. 1).

Изменение состава сплава в поверхностном слое можно объяснить тем, что имплантат пребывал в растворе электролитов, которыми являются жидкости организма. Поэтому в реакциях:



отмечено смещение вправо. В ряду электрохимической активности металлов $\text{Li} \rightarrow \text{Rb} \rightarrow \text{K} \rightarrow \text{Ba} \rightarrow \text{Sr} \rightarrow \text{Ca} \rightarrow \text{Na} \rightarrow \text{Mg} \rightarrow \text{Al} \rightarrow \text{Mn} \rightarrow \text{Zn} \rightarrow \text{Cr} \rightarrow \text{Fe} \rightarrow \text{Cd} \rightarrow \text{Co} \rightarrow \text{Ni} \rightarrow \text{Sn} \rightarrow \text{Pb} \rightarrow \text{H} \rightarrow \text{Sb} \rightarrow \text{Bi} \rightarrow \text{Cu} \rightarrow \text{Hg} \rightarrow \text{Ag} \rightarrow \text{Pd} \rightarrow \text{Pt} \rightarrow \text{Au}$ Fe и Ni расположены правее хрома. Следовательно, для их перехода в двухвалентное состояние требуется меньше энергии, чем для хрома. Сдвиг химического уравнения вправо обусловлен тем, что и железо, и никель образуют растворимые соли, которые затем могут участвовать в образовании комплексов с аминокислотами или белками. При этом возможны аллергические реакции у пациентов, которым были

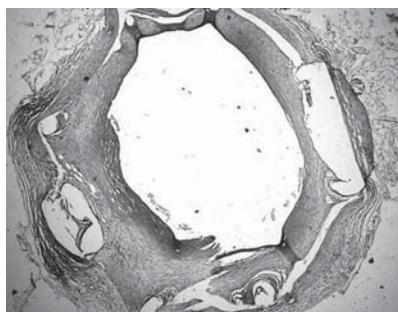


Рис. 1. Микрофото. Ткани вокруг стента через 8 нед после установки (стент был установлен без предварительной обработки). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 200$.

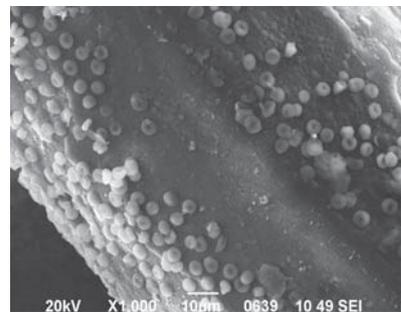


Рис. 2. СЭМ. Поверхность элемента стента через 8 нед после установки. Стент был установлен без предварительной обработки.

установлены соответствующие имплантаты. В литературе описаны наблюдения аллергических реакций по типу отека Квинке, что обуславливало необходимость удаления имплантатов [3].

Сохранение исходного состава на срезе стента свидетельствовало о наличии поверхностных изменений вследствие окислительных свойств и переходе элементов состава сплава в окисленную форму. *Образцы нержавеющей стали*

Образцы стали устанавливали кролям в область спины. По данным гистологических исследований тканей, вокруг образцов наблюдали образование соединительнотканых капсул различной плотности с включением гигантских клеток инородных тел, содержащих артефакты (рис. 3).

Поверхность имплантатов значительно изменялась. По данным СЭМ (рис. 4), отмечены значительные изменения поверхности имплантата после пребывания в организме, которые называют "питтинговой коррозией", избирательно по отношению к составу сплава.

Спицы

Спицы из нержавеющей стали 316L устанавливали в бедренную кость кроля. Положение спиц контролировали по данным рентгеноскопии. Через 4 нед проведена контрольная рентгенография (рис. 5). Спицы извлечены для дальнейшего изучения их поверхности с использованием СЭМ и ЭДС. По данным гистологических исследований мягких тканей, в месте установки спиц обнаружена локальная воспалительная реакция с скоплением лимфоцитов в участках, прилегающих к кости и имплантату.

С помощью СЭМ получено изображение поверхности спиц (рис. 6), установлено изменение состава сплава в поверхностном слое (табл. 2).

Как следует из данных таблицы, поверхностный слой спицы на участках 1 и 2 по составу материала различен и значительно отличается от исходного. Так, воздействие организма на участке 1 было более выражено, поверхность имеет большую

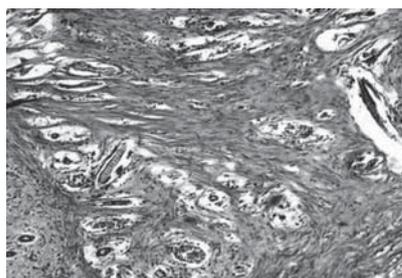


Рис. 3.
Микрофото.
Ткани вокруг образца стали через 8 нед после имплантации (стрелками указаны артефакты). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. × 200.

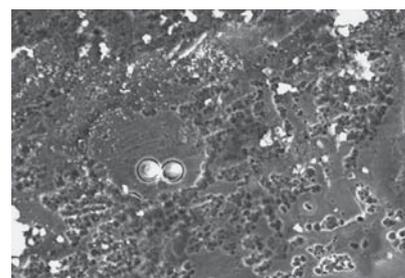


Рис. 4.
СЭМ.
Поверхность образца стали 316L через 8 нед после пребывания в организме животного.



Рис. 5.
Рентгенограмма места установки спиц через 4 нед после операции.

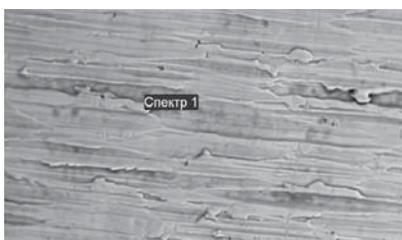
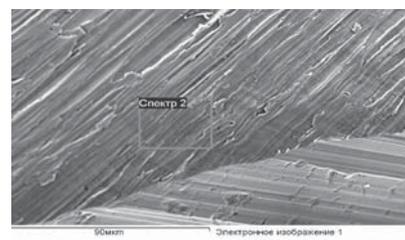


Рис. 6.
СЭМ.
Поверхность спицы через 4 нед после операции.



"трещину" вследствие коррозионных процессов. На участке 2 таких трещин меньше, состав поверхности сплава более близок к составу исходного материала.

Приведенные результаты показали, что изменения поверхности спиц обусловлены асептическим воспалением и характеризуют реакцию организма на инородный материал.

Тестирование материалов на биосовместимость с помощью АСМ

По данным биохимического анализа крови экспериментальных животных, отмечено незначительное повышение уровня глюкозы — до 6,8 ммоль/л у кролей и 5,4 ммоль/л

— у крыс. Уровень С—реактивного протеина повышен после операции, затем постепенно снижался, но не возвращался к исходному, и хорошо коррелировал с выраженностью воспалительных процессов при введении в организм экзогенного материала, а также с толщиной сформированной соединительнотканной капсулы.

Для определения совместимости материалов с организмом экспериментальных животных до операции проведены исследования с помощью АСМ [5].

В табл. 3 представлены значения силы притяжения зонда (F_1/F_0) для различных животных и материалов.

Таблица 1. Изменение состава поверхности сплава после пребывания имплантата в организме

Элемент	Содержание, масс %		
	в исходном сплаве	через 8 нед	
		на поверхности	на срезе
Cr	20,07	92,17	20,07
Fe	67,01	6,86	67,01
Ni	10,59	0,98	10,59

Таблица 2. Изменение состава спиц на поверхности после пребывания в организме в течение 4 нед

Элемент	Содержание, масс %		
	в исходном сплаве	на поверхности	
		участка 1	участка 2
Cr	21,13	19,38	20,79
Ni	9,72	8,32	9,20
Fe	67,43	60,60	66,40

Таблица 3. Результаты определения совместимости материалов с организмом экспериментальных животных (кролей) до операции

Материал	Сила притяжения зонда F_1/F_0 ($\bar{x} \pm m$)
Образцы нержавеющей стали	1,54 ± 0,53
Стенты	1,62 ± 0,43
Спицы	1,46 ± 0,45

В таблице представлены средние результаты тестирования поверхности материалов с помощью АСМ. Они свидетельствуют, что один и тот же материал у разных животных обуславливает различную реакцию. Во всех наблюдениях среднее значение F_1/F_0 было больше 1.

При сравнении результатов тестирования материалов на совмести-

мость с организмом экспериментального животного до операции отмечено, что, если F_1/F_0 равно 1, реакция организма на чужеродное тело после его имплантации минимальна, разрушение поверхности образца практически не происходило. Если соотношение F_1/F_0 больше 1, реакция организма агрессивная, не только с формированием тол-

стой фиброзной капсулы, но и разрушением образца.

Результаты, приведенные в табл. 3, свидетельствуют, что реакция животных на один и тот же материал имплантата индивидуальна. Поскольку условия изучения совместимости материалов с организмом реципиента зависят от атмосферных явлений (влажность, температура в помещении), предложено использовать не абсолютные значения силы удерживания зонда поверхностью, а соотношение F_1/F_0 , где F_0 — сила, с которой исходный чистый зонд удерживается поверхностью; F_1 — сила, с которой поверхность удерживает зонд, модифицированный IgG реципиента. Таким образом, значение F_1/F_0 меньше или равное 1 можно расценивать как совместимость материала с организмом реципиента. Если соотношение F_1/F_0 больше 1, можно прогнозировать, что при применении имплантата возникнет локальное асептическое воспаление.

Перед выполнением вмешательств с установкой имплантатов необходимо исследовать по индивидуальному сканированию поверхность имплантата с помощью АСМ и суммарных IgG по определению его биосовместимости с организмом реципиента.

ЛИТЕРАТУРА

- Aleksyeyeva T. Substance enhancing biocompatibility of implants with recipient body and method of its preparation / T. Aleksyeyeva, O. Lazarenko // Международная заявка РСТ UA2011/000045 Priority date 18.05.2011 — 8 с.
- Новые нанотехнологии в медицине Украины / Т. А. Алексеева, Н. П. Винниченко, С. П. Галич [и др.] // Поліграф. дільниця Ін-ту Металлофізики ім. Г. В. Курдюмова НАН України. — К., 2012. — С. 191.
- Изменение поверхности стентов после нахождения в организме (экспериментальное исследование) / Т. А. Алексеева, О. В. Береговой, О. Н. Лазаренко [и др.] // 10-та конф. "Рани, рана інфекція, пластика та з'єднання тканин". — К., 2010. — С. 22.
- Изменение поверхности металлических имплантов с неорганическими покрытиями после нахождения в живом организме / Т. А. Алексеева, И. С. Ермоленко, С. П. Ошкадеров, О. Н. Лазаренко // Металлофізика и новейшие технологии. — 2009. — Т. 31, № 7. — С. 979 — 988.
- Puleo D. A. Understanding and controlling the bone—implant interface / D. A. Puleo // Biomaterials. — 1999. — Vol. 20. — P. 2311 — 2321.
- The method of biomimicry in order to solve the problems of implantology / T. A. Aleksyeyeva, A. A. Buryanov, I. S. Yermolenko [et al.] // International Conference "Functional Materials". — Partenit, Crimea, 2011. — P. 396.

