



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

УДК 616-77; 616-002.1

ИЗУЧЕНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ СЕТЧАТЫХ ЭНДОПРОТЕЗОВ С НАНОРАЗМЕРНЫМ АЛМАЗОПОДОБНЫМ УГЛЕРОДНЫМ ПОКРЫТИЕМ ДЛЯ ПЛАСТИКИ ДЕФЕКТОВ ПЕРЕДНЕЙ БРЮШНОЙ СТЕНКИ

И.П. ПАРФЕНОВ
А.А. ДОЛЖИКОВ
Л.Я. ЯРОШ
А.Я. КОЛПАКОВ
А.В. СОЛОШЕНКО
Е.П. БИТЕНСКАЯ
Д.В. ГЕРАСИМЕНКО
А.С. МОЛЧАНОВА

*Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет*

e-mail: parfenovbokb@mail.ru

Впервые представлены результаты исследований тканевой реакции при имплантации синтетических полимерных эндопротезов для пластики дефектов брюшной стенки, поверхность которых модифицирована наноразмерным алмазоподобным углеродным покрытием.

Полученные данные свидетельствуют, что имплантаты с наноразмерным алмазоподобным углеродным покрытием, в сопоставлении с аналогичным полимерным материалом без покрытия, обладают большей биосовместимостью и лучшей биоинтеграцией в окружающую соединительную ткань в процессе инкапсуляции в отдаленные сроки.

Ключевые слова: биосовместимость, протез, углеродное покрытие.

Введение. Разработки медицинских изделий с улучшенными био- и гемосовместимыми свойствами ведутся в настоящее время по двум основным направлениям: создание новых и модифицирование уже существующих материалов и изделий [3]. Одним из перспективных путей улучшения биологических свойств медицинских изделий является модифицирование их поверхности различными физико-химическими методами (импульсно-плазменное осаждение, плазмохимическое и ВУФ-излучение, синхротронное излучение, травление, ионная бомбардировка и др.), а также формирование покрытий, обладающих необходимыми свойствами [1, 2, 4, 5, 6].

Интересным с этой точки зрения и перспективным, нам представляется наноразмерное алмазоподобное углеродное покрытие, разработанное в НИЛ «Проблем и разработки и внедрения ионно-плазменных технологий» (рук. – Колпаков А.Я.) Национального исследовательского университета «Белгородский государственный университет». Оно обладает следующими характеристиками: химическая и биологическая инертность, химическая стойкость в кислотах и щелочах, отсутствие токсических реакций, отсутствие влияния на химический состав и pH тканевой и клеточной жидкости, возможность достижения сплошности покрытия при толщинах порядка десятка-сотен нм, температура формирования покрытия не выше 50 °С, что не приводит к деградации свойств полимерного материала протеза, высокие адгезионные свойства к полимерной основе, отсутствие изменений рельефа поверхности после нанесения покрытия и др.



В этой связи нам представляется, что экспериментальное и клиническое изучение закономерностей формирования ответной реакции тканей и морфофункциональных изменений передней стенки живота при имплантации синтетических полимерных эндопротезов с наноразмерным алмазоподобным углеродным покрытием, является актуальным и своевременным исследованием не только для хирургии, патологической физиологии и морфологии, но и нанотехнологий.

Целью настоящего исследования явилось – экспериментальное изучение закономерностей формирования ответной реакции тканей при имплантации синтетических полимерных эндопротезов для пластики передней брюшной стенки с наноразмерным алмазоподобным углеродным покрытием.

Материалы и методы. Исследования выполнены на 120 лабораторных крысах линии Vistar, массой 180–200 г., прошедших карантинный режим вивария ГОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития РФ.

Изготовление экспериментальных образцов эндопротезов проводилось в НИЛ «Проблем разработки и внедрения ионно-плазменных технологий» Национального исследовательского университета «Белгородский государственный университет». С этой целью на полипропиленовые сетки «Эсфил легкий» (ООО «Линтекс», г. Санкт-Петербург) было нанесено наноразмерное алмазоподобное углеродное покрытие (импульсное вакуумно-дуговое распыление графитового катода, толщина покрытия $p \sim 70$ nm).

Экспериментальные образцы эндопротезов (1,5×1,5 см) в стерильных условиях помещали подкожно без дополнительной фиксации. В качестве контроля использовали полипропиленовый сетчатый протез «Эсфил легкий» без покрытия. Животных выводили из эксперимента на 7-е, 21-е и 180-е сутки. Участки брюшной стенки с имплантатами фиксировали иммерсионным способом в 10% растворе формалина. Материал для гистологического исследования вырезали вертикально через все слои вместе с имплантатами и заливали в парафин по стандартной методике. Срезы толщиной 5 мкм, также изготовленные перпендикулярно поверхности брюшной стенки через все ее слои, окрашивали гематоксилином и эозином.

Гистологические препараты сканировали с помощью системы для сканирования, архивирования и анализа изображений «Mirax Desk» (Carl Zeiss). Анализ микроскопических картин и морфометрию проводили на сканированных микропрепаратах с помощью программы «Pannogamic Viewer 1.14». Средствами этой же программы, а также с помощью программы захвата изображений «Fast Stone Capture», производили микрофотографирование.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel 2007 SP-3. Для обработки полученных данных использовали методы дескриптивной статистики и критерии оценки достоверности межгрупповых различий. Межгрупповые различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследований и обсуждение. Первоначально мы оценили характер тканевой реакции при имплантации сетчатого протеза «Эсфил легкий». На 7-е сутки эксперимента вокруг имплантата определялась выраженная воспалительная реакция и формирование грануляционной ткани (рис. 1). Циркулярно вокруг элементов имплантатов формировалась зона клеточного инфильтрата шириной 150–200 мкм с нечеткими границами. В составе инфильтрата преобладали полиморфноядерные лейкоциты (45–60%), клетки типа малых лимфоцитов составляли 20–25%, в таком же количестве содержались гистиоцитарные элементы. Во внутренних слоях инфильтрата находились гигантские многоядерные клетки инородных тел в количестве от 1 до 4-х по периметру одного среза участка имплантата. Немногочисленные клетки типа молодых фибробластов обнаруживались в наружной зоне инфильтрата. Капилляры в зоне инфильтрата были распределены равномерно, расположены преимущественно концентрически вокруг сетчатых структур имплантата. За пределами зоны инфильтрата соединительная ткань отечного вида, с обычным кровенаполнением сосудов.

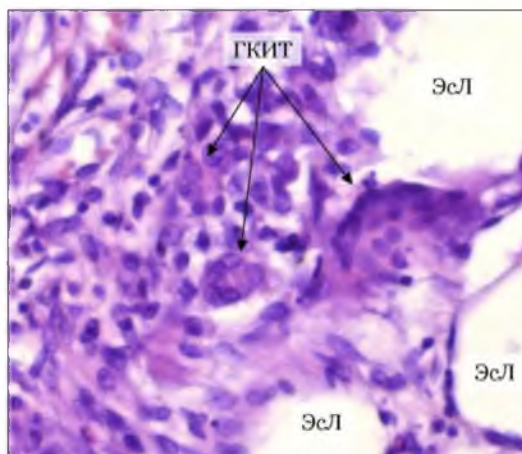


Рис. 1. Гигантские многоядерные клетки инородных тел (ГКИТ) в составе инфильтрата на 7-е сутки после имплантации материала «Эсфил легкий» (ЭсЛ).
Окр. гематоксилином и эозином. Микрофото. ×400

На 21-е сутки эксперимента вокруг имплантата выражено формирование грануляционной ткани, определялись начальные признаки формирования соединительнотканной капсулы (рис. 2). Однако в составе окружающего слоя грануляционной ткани, имеющего толщину около 200 мкм, в значительном количестве присутствовали элементы воспаления (полиморфноядерные лейкоциты, лимфоциты и гистиоцитарные элементы), составляющие суммарно 40 – 60%. Среди лейкоцитов в примерно равном количестве присутствуют полиморфноядерные (преимущественно эозинофилы) и лимфоциты (по 15-20% каждого типа). Грануляционная ткань не имеет послойного строения, свойственного поверхности раневых дефектов. Количество кровеносных капилляров снижено в сравнении с предыдущим сроком, они также не образуют видимых радиальных и петлевидных структур. Во внутренних участках клеточного инфильтрата вокруг имплантата определяются гигантские многоядерные клетки инородных тел, количество которых, в сравнении с предыдущим сроком наблюдения, увеличено и достигает десяти на периметр среза одного элемента сетчатого имплантата.

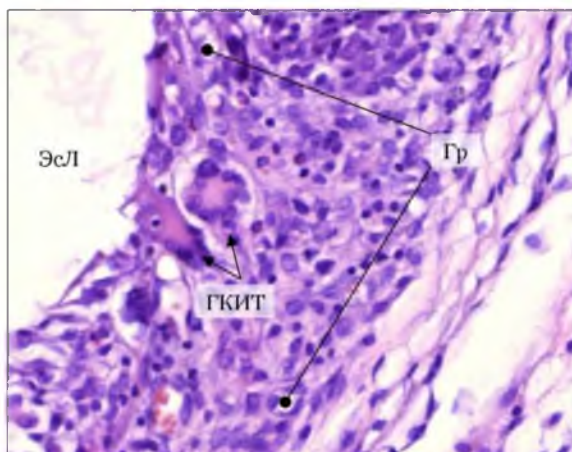


Рис.2. Структура грануляционной ткани (Гр) вокруг имплантата «Эсфил легкий» (ЭсЛ) на 21-е сутки эксперимента: смешанный полиморфный клеточный состав с преобладанием лейкоцитов и гистиоцитов, наличием многоядерных клеток инородных тел (ГКИТ).
Окр. гематоксилином и эозином. Микрофото. ×400

Через 180 суток после имплантации по всем поверхностям материала определялась сформированная соединительная ткань в виде капсулы толщиной 80-100 мкм (рис. 3). Структура ее неоднородная. Превалировали участки из



концентрически организованной плотной волокнистой, очагово-гиалинизированной соединительной ткани с малочисленными клетками типа фиброцитов. Однако до трети площади инкапсулирующей соединительной ткани, особенно в зонах переплетения элементов имплантата определялась умеренно выраженная лейкоцитарная инфильтрация со значительным содержанием эозинофилов. В этих же зонах присутствовало умеренное количество кровеносных капилляров. Клетки инородных тел отсутствовали. Однако на внутренней поверхности капсулы сегментарно располагались пласты эпителиоидных гистиоцитов. Граница между инкапсулирующей соединительной тканью и окружающими участками соединительной ткани прослеживалась достаточно четко.

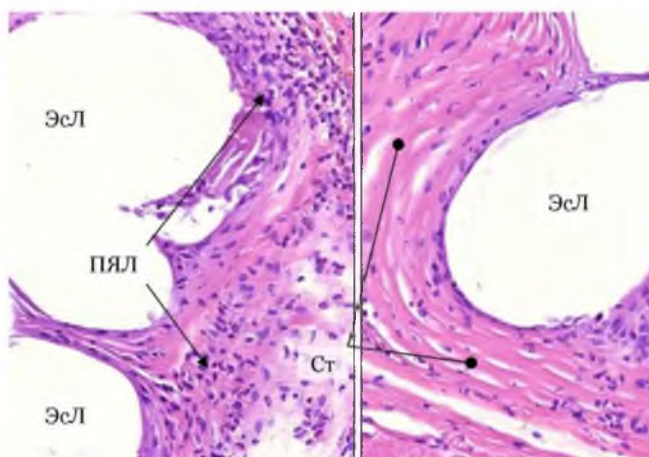


Рис. 3. Структура капсулы имплантата «Эсфил легкий» (ЭсЛ) через 180 суток: структура соединительной ткани (Ст) неоднородная с преобладанием участков плотного волокнистого строения с малочисленными клетками типа фиброцитов, до трети удельной площади составляют участки с выраженной инфильтрацией полиморфноядерными лейкоцитами с преобладанием эозинофилов (ПЯЛ), клетки инородных тел отсутствуют, но на внутренней поверхности капсулы имеются клетки типа эпителиоидных гистиоцитов. Окр. гематоксилином и эозином. Микрофото. $\times 400$

Таким образом, при имплантации материала «Эсфил легкий» нами не выявлено признаков повреждающего токсического действия на подкожные ткани. Совокупность наблюдаемых реакций отражает типичную последовательность изменений в зоне введения инородного тела. При этом воспалительные изменения сохраняются достаточно долго – на 21-е сутки грануляционная ткань с признаками неполной зрелости, очаги воспалительной реакции присутствуют даже через 6 месяцев. На ранних сроках выявляется гигантоклеточная реакция макрофагов на инородное тело – имплантат, которая нарастает в интервале с 7 до 21-х суток. Через 6 месяцев имплантат полностью инкапсулирован. Однако сформированная соединительнотканная капсула неоднородна: участки преобладающего фиброза, даже с очагами гиалиноза, сочетаются с зонами воспалительной инфильтрации. На внутренней поверхности определяются клетки типа эпителиоидных гистиоцитов. Не наблюдается полной интеграции структур капсулы в окружающую соединительную ткань – между ними четко прослеживается граница.

Далее мы оценили характер тканевой реакции при имплантации экспериментальных образцов эндопротезов с наноразмерным алмазоподобным углеродным покрытием. На 7-е сутки эксперимента вокруг образца определялась равномерная зона грануляционной ткани с визуальной меньшей плотностью клеточного состава в сравнении с контролем (рис. 4). Наружная граница инфильтрата также была нечеткой, но определяемая ширина была значительно меньше и составляла 100-150 мкм ($p < 0,05$). Существенно отличался и клеточный состав – преобладали незрелые фибробласты, составившие 55-70% ($p < 0,05$), а лейкоциты и гистиоцитарные элементы составили 30 – 45% ($p < 0,05$). Инфильтрат имел рыхлое строение, не содержал характерных для грануляционной ткани капиллярных структур. Гигантские клетки инородных тел отсутствовали.

Поверхность экспериментального образца имплантата в гистологических препаратах содержала непрерывный серо-коричневый слой покрытия толщиной 1,5 – 2 мкм. Контакт покрытой наружной поверхности с окружающими реактивными тканями был плотный, без проникновения элементов инфильтрата в толщу имплантата.

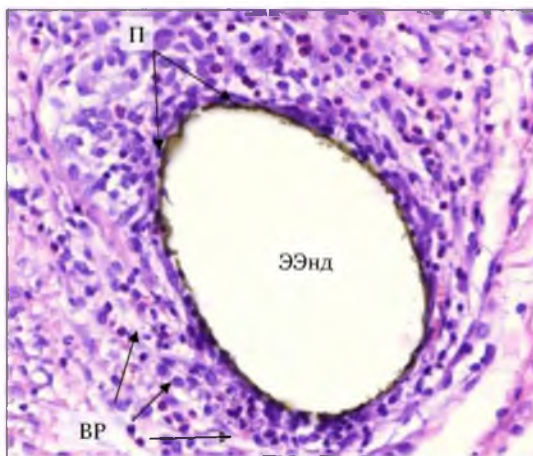


Рис. 4. Реакция соединительной ткани на экспериментальный образец эндопротеза с наноразмерным алмазоподобным углеродным покрытием (ЭЭнд) на 7-е сутки эксперимента: на поверхности имплантата непрерывный слой покрытия серо-коричневого цвета (П), зона воспалительной реакции (ВР) узкая, диффузного характера с умеренной плотностью клеточного состава, заметным количеством молодых фибробластов. Окр. гематоксилином и эозином. Микрофото. $\times 400$

На 21-е сутки после имплантации вокруг материала сформировался непрерывный слой грануляционной ткани шириной 100-160 мкм ($p < 0,05$). Определялись единичные радиально ориентированные капилляры, в клеточном составе преобладали фибробласты, составившие 60 – 70% ($p < 0,05$), лейкоциты в равной пропорции (10-15%, $p < 0,05$) представлены полиморфноядерными элементами и малыми лимфоцитами, на гистиоциты пришлось в разных участках 5-10% ($p < 0,05$). На этом сроке уже были заметны процессы созревания грануляционной ткани в фиброзную, что проявлялось наличием четко различимых равномерно распределенных участков тонковолокнистого строения и зон гомогенного оксифильного межклеточного матрикса. Гигантские клетки инородных тел отсутствовали.

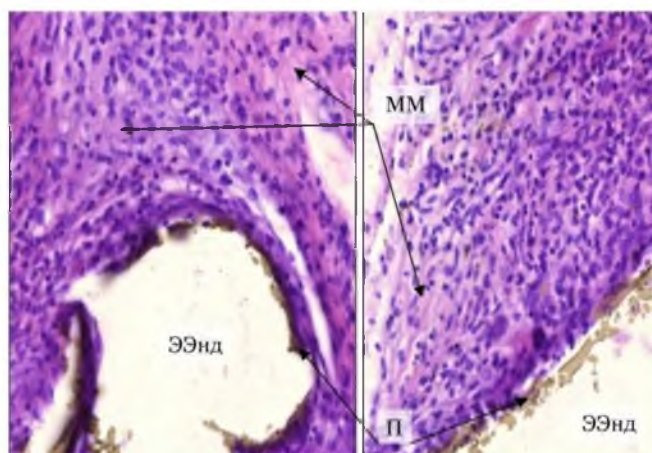


Рис. 5. Морфологические изменения в зоне имплантации экспериментального образца эндопротеза с наноразмерным алмазоподобным углеродным покрытием (ЭЭнд) на 21-е сутки: в клеточном составе преобладают фибробластические элементы (Ф), лейкоцитарный компонент выражен умеренно, четко определяются зоны формирования межклеточного матрикса (ММ), покрытие имплантата (П) участками фрагментировано, но определяется по всей площади. Окр. гематоксилином и эозином. Микрофото. $\times 400$



Через 180 суток после имплантации выявлены существенные особенности в сравнении с группой контроля. Общая картина имела вид полной инкапсуляции протеза с капсулой структурно полностью интегрированной в окружающую соединительную ткань. Структура капсулы была представлена 5-10 компактными слоями коллагеновых волокон, участками имеющими гиалинизированный вид, между которыми равномерно распределено небольшое число фиброцитов.

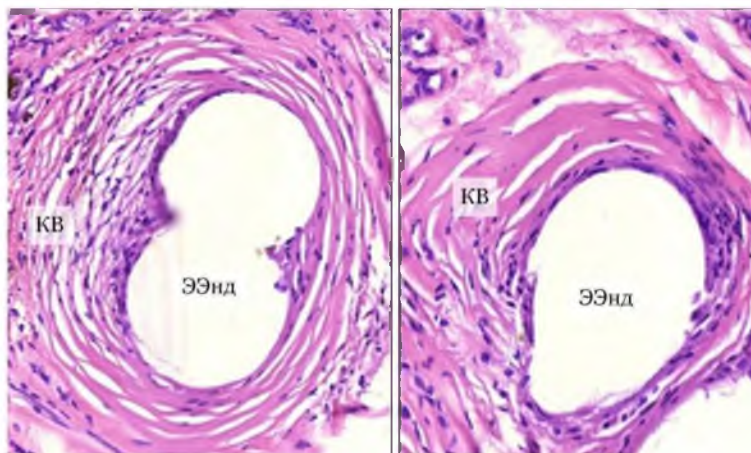


Рис. 6. Структура соединительнотканной капсулы вокруг экспериментального образца эндопротеза: концентрические малоклеточные слои коллагеновых волокон (KB) с плавным переходом в окружающую соединительную ткань, отсутствие воспалительных изменений и гигантоклеточной реакции на имплантат. Окр. гематоксилином и эозином. Микрофото. $\times 400$

Элементы воспалительного инфильтрата, эпителиоидные гистиоциты на внутренней поверхности капсулы, гигантские клетки инородных тел отсутствовали. Практически отсутствовали и кровеносные сосуды. Внутренние слои капсулы имели концентрическую ориентацию вокруг сетчатых структур имплантата, снаружи плавно переходили в пучки коллагеновых волокон подкожной соединительной ткани. Толщина капсулы была меньше и составила 60-70 мкм ($p < 0,05$).

Таким образом, заметные отличия в характере тканевой реакции при имплантации экспериментальных образцов эндопротезов с наноразмерным углеродным покрытием определялись уже к 7-м суткам эксперимента. Происходило более раннее формирование фибробластического компонента в грануляционной ткани, что отражали результаты подсчета относительного количества клеточных элементов в составе инфильтратов.

На 21-е сутки фибробласты с морфологическими признаками функционально активных форм составляли 60-70%, на этом сроке явно определялись зоны формирования аморфного и волокнистого компонентов межклеточного вещества.

В отдаленные сроки (180 суток) выявлена полная биоинтеграция имплантата в подкожную соединительную ткань в виде ареактивной инкапсуляции соединительной тканью, непосредственно связанной с окружающими структурами. Воспалительных и других реактивных изменений не выявлено. При этом одним из самых существенных отличий от группы контроля явилось отсутствие на всех сроках эксперимента гигантоклеточной трансформации макрофагов и формирования клеток инородных тел.

Заключение. Нами впервые созданы экспериментальные образцы синтетических полимерных эндопротезов для пластики дефектов брюшной стенки, поверхность которых модифицирована наноразмерным алмазоподобным углеродным покрытием (Патент РФ № 98906, «Протез для пластики грыж передней брюшной стенки»). Впервые проведены исследования реакции тканей организма при их имплантации.

Полученные данные свидетельствуют, что экспериментальные образцы сетчатых синтетических эндопротезов с наноразмерным алмазоподобным углеродным покрытием, в сопоставлении с аналогичным полимерным материалом без покрытия,



обладают большей биосовместимостью и лучшей биоинтеграцией в окружающую соединительную ткань в процессе инкапсуляции в отдаленные сроки.

Литература

1. Алехин, А.П. Синтез биосовместимых поверхностей методами нанотехнологии / А.П. Алехин, Г.М. Болейко, С.А. Гудкова, А.М. Маркеев, А.А. Сигарев, В.Ф. Токнова, А.Г. Кириленко, Р.В. Лапшин, Е.Н. Козлов, Д.В. Тетюхин // Российские нанотехнологии. Том 5. – №9-10. – С. 128-136.
2. Биосовместимость / под ред. В. И. Севастьянова. – М. : И Ц ВНИИ геосистем, 1999. – 368 с.
3. Хенч, Л. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей / Л. Хенч, Д. Джонс. – М. : Техносфера. – 2007. – С. 305. (Серия «Мир биологии и медицины»).
4. Ferraris, S. Surface modification of Ti-6Al-4V alloy for biomineralization and specific biological response: Part I, inorganic modification / S. Ferraris, S. Spriano, G. Pan, A. Venturello, C.L. Bianchi, R. Chiesa, M.G. Faga, G. Maina, E. Vernè // J. Mater. Sci. Mater. Med. 2011. Mar; 22 (3): P. 533-45.
5. Kim, J.H. Comparison of diamond-like carbon-coated nitinol stents with or without polyethylene glycol grafting and uncoated nitinol stents in a canine iliac artery model / J.H. Kim, J.H. Shin, D.H. Shin, M.W. Moon, K. Park, T.H. Kim, K.M. Shin, Y.H. Won, D.K. Han, K.R. Lee // Br. J. Radiol. 2011. Mar; 84 (999): P. 210-5.
6. Lorenz, C. Coating of titanium implant materials with thin polymeric films for binding the signaling protein BMP2 / C. Lorenz, A. Hoffmann, G. Gross, H. Windhagen, P. Dellinger, K. Möhwald, W. Dempwolf, H. Menzel // Macromol. Biosci. 2011. Feb 11; 11 (2): P. 234-44.

BIOCOMPATIBILITY INVESTIGATION OF DIAMOND-LIKE CARBON-COATED MESH APPLIED IN ABDOMINAL WALL IN HERNIA SURGERY

I.P. PARFENOV
A.A. DOLZHIKOV
A.I. YAROSH
A.A. KOLPAKOV
A.V. SOLOSHENKO
E.P. BITENSKAYA
D.V. GERASIMENKO
A.S. MOLCHANOVA

For the first time results of researches of tissue reaction are presented at implantation diamond-like carbon-coated meshes for abdominal hernia repair. Histologically, diamond-like carbon-coated meshes for abdominal hernia repair exhibited greater biocompatibility, compared to with a similar material without diamond-like carbon.

Key words: biocompatibility, prosthesis, diamond-like carbon.

Belgorod National Research University

e-mail: parfenovbokb@mail.ru