Возможности использования протезов на основе модифицированного фторопласта с алмазоподобным нанопокрытием в хирургии уха (экспериментальное исследование)

Д.м.н., проф. В.П. СИТНИКОВ[1], к.т.н., доц. С.В. ШИЛЬКО[2], к.м.н., доц. ЭЛЬ-РЕФАЙ ХУСАМ[1], к.м.н., доц. Э.А. НАДЫРОВ[3], к.т.н. В.П. КАЗАЧЕНКО[4], д.м.н., проф. Н.Т. ДЖАЙНАКБАЕВ[5]

[1]Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь, 246050; [2]Институт механики металлополимерных систем имени В.А. Белого Национальной академии наук Беларуси, Гомель, Беларусь, 246050; [3]Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека, Гомель, Беларусь, 246040; [4]Белорусский государственный университет транспорта, Гомель, Беларусь, 246653; [5]Казахстанско-Российский медицинский университет, Алматы, Казахстан, 050004

The possibilities for the application of the fluoroplast-based prostheses with a diamond-like carbon nanocoating in ear surgery (an experimental study)

V.P. SITNIKOV, S.V SHIL'KO, EL-REFAI HOOSAM, E.A. NADYROV, V.P. KAZACHENKO, N.T. DZHAINAKBAEV

Gomel State Medical University, Gomel, Belarus, 246050; V.A. Bely Institute of Metal-Polymer Research, National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Belarus, 246050; Republican Research and Practical Centre for Radiological Medicine and Human Ecology, Gomel, Belarus, 246040; Belorussian State University of Transport, Gomel, Belarus, 246653; Kazakhstan-Russian Medical University, Almaty, Kazakhstan, 050004

Цель исследования — установить общие и локальные особенности тканевых реакций экспериментальных животных (крыс) на импланты из радиационно-модифицированного фторопласта Ф-4РМ20 (на основе политетрафторэтилена ПТФЭ) с алмазоподобным нанопокрытием и алмазоподобным покрытием с распределенными наноразмерными частицами серебра. В эксперименте использованы 150 белых беспородных крыс, разделенных на 3 группы по 50 животных. Экспериментальным животным 1-й группы подкожно имплантировали полоски фторопласта Ф-4РМ20 с алмазоподобным покрытием толщиной 5 нм; во 2-й группе имплантировали указанный полимерный материал с распределенными в покрытии наноразмерными частицами химически чистого серебра; в 3-й (контрольной) группе использовали полоски фторопласта Ф-4РМ20 без покрытия. Животные выводились из эксперимента на 7, 21, 30, 60-е сутки. Проводилось гистологическое исследование тканей, окружающих имплант, а также тканей легких, сердца, селезенки, печени и почек. Была установлена однотипность локальных тканевых реакций с тенденцией к меньшей выраженности грануляционно-рубцового процесса в случае использования имплантов с алмазоподобным покрытием, содержащим наноразмерные частицы серебра. Статистически значимой гиперплазии лимфоидной ткани селезенки, указывающей на активацию иммунной системы на введение имплантата, не установлено ни в одной группе животных. Таким образом, полимерные композиты в виде фторопласта Ф-4РМ20 с алмазоподобным покрытием толщиной 5 нм и аналогичным покрытием, содержащим наночастицы серебра, могут быть использованы в реконструктивной хирургии среднего уха как биосовместимые материалы, не вызывающие воспалительно-дегенеративных реакций.

Ключевые слова: хирургия уха, импланты, биосовместимость, радиационно-модифицированный фторопласт, алмазоподобное покрытие, наночастицы серебра.

The objective of the present study was to elucidate general and local characteristics of the tissue reactions to the implantation of radiation-modified polytetrafluoroethylene (PTFE)-based fluoroplast F-4PM20 with a diamond-like carbon (DLC) nanocoating or with the diamond-like carbon coating containing the dispersed nano-sized silver particles to the experimental animals (rats). A total of 150 inbred white rats were included into the experiment; they were divided into 3 groups comprised of 50 animals each. The rats in group 1 were implanted with the 5 nm thick strips of fluoroplast F-4PM20 having the diamond-like carbon nanocoating. The animals of group 2 were implanted with the same material containing nanoparticles of chemically pure silver dispersed in the coating, those in group 3 (controls) were implanted with the fluoroplast F-4PM20 without a coating. The animals were sacrificed on days 7, 21, 30, and 60 days after the onset of the experiment. The tissues surrounding the implant as well as heart, lung, spleen, liver, and kidney tissues were taken for the histological study. The local reactions of different tissues were found to be uniform even though there was an apparent tendency toward the less pronounced granulation and scarification processes in the animals implanted with the diamond-like carbon coating containing the dispersed nano-sized silver particles. In none of the groups, the animals exhibited statistically significant lymphoid tissue hyperplasia in the spleen which suggested the activation of the immune system in response to implantation. It is concluded that the PTFE-based fluoroplast F-4PM20 implants with the 5 nm thick DLC coating and a similar coating containing the dispersed nano-sized silver particles can be applied for middle ear reconstructive surgery, being a histologically compatible material that does not cause an inflammatory degenerative response of the tissues.

Key words: middle ear reconstructive surgery, implants, biocompatibility, radiation-modified fluoroplast, diamond-like carbon nanocoating, silver nanoparticles.

На рубеже 80—90-х годов XX века в ушной хирургии получили распространение импланты на основе металлов, полимеров, композитов и керамики [1—3]. Требования к протезам слуховых косточек: хорошее звукопроведение, небольшая масса, противостояние инфекции, стабильность формы и устойчивость к экструзии [4]. Для реконструкции цепи слуховых косточек, помимо остатков последних, применяют аутокость, аутохрящ, аутоноготь, титан, золото, тантал, платину, нержавеющую сталь и пр. [5—8]. Металлические и керамические протезы обладают значительной прочностью и, благодаря высокому (свыше 100 ГПа) модулю упругости, хорошим звукопроведением, включая область наиболее информативных высоких звуковых частот. Но это является причиной чрезмерной жесткости и деформационной несовместимости указанных имплантов с окружающими существенно менее жесткими биотканями среднего уха. Недостатки этих протезов: повышенная стоимость материалов и изготовления по технологиям микролитья, спекания и механической обработки для получения необходимой формы и качества поверхности.

Среди полимерных материалов для реконструкции среднего уха при стапедопластике доминируют материалы на основе полиэтилена и особенно политетрафторэтилена (ПТФЭ) марок «тефлон» (США) и «фторопласт-4» (Россия). Биоинертность, эластичность и высокая технологичность полимерных имплантов делает возможным массовое изготовление недорогих протезов. Использование полимерных протезов предусматривает «поршневую» методику стапедопластики по Shea, преимуществом которой являются значительно меньший объем манипуляций в области окна преддверия, снижение травматичности и вероятности попадания крови в преддверие лабиринта [9].

Вместе с тем указанные материалы характеризуются вязкоупругостью и вязкопластичностью, что проявляется в ухудшении звукопроведения в результате необратимого изменения формы и жесткости протезов при длительном функционировании [10]. Эти материалы не обладают бактерицидной активностью, что может привести к угрозе инфицирования среднего уха [11, 12]. Так, наблюдение пациентов с тимпанальной и смешанной формами отосклероза после имплантации тефлоновых протезов в ряде случаев показало осложнения в виде нейросенсорной тугоухости и глухоты, а также образования послеоперационных гранулем барабанной полости [13, 14], что явилось причиной повторных операций.

Так как реакция организма на имплант определяется в основном химическим составом и структурой его поверхностного слоя [15, 16], регулирование биосовместимости имплантов может быть достигнуто модифицированием поверхности [17—19]. Предложен протез на основе биологически активного материала с нерастворимым и инертным мозаичным покрытием [20]. В качестве основы могут быть использованы металлы, обладающие бактерицидными свойствами, но остаются отмеченные выше недостатки металлических протезов.

Задачами исследования являлись:

— обеспечение биосовместимости импланта при отсутствии локальной воспалительно-дегенеративной реакции в послеоперационном периоде, а также морфологических изменений в отдаленных жизненно важных органах;

— повышение звукопроводимости протеза в области высоких частот;

— сохранение стабильности формы и звукопроводимости импланта.

Материал и методы

Для решения вышеуказанных задач перспективны формостабильные марки фторопласта, модифицированные наноразмерными алмазоподобными DLC (diamond-like carbon) покрытиями, состоящими из атомов углерода, поскольку последние значительно повышают биоинертность протезов, в том числе изготовленных из полимерных материалов [21, 22].

Оценка биоинтеграционных свойств имплантов производилась по результатам гистологического исследования находящихся с ними в контакте биологических тканей, а также морфологическим изменениям в отдаленных жизненно важных органах, обеспечивающих гомеостаз реципиента [23].

В качестве основного материала (подложки) протеза использовали радиационно-модифицированный фторопласт марки Ф-4РМ20 в виде листа толщиной 0,8 мм (Россия, ФГУП «НИФХИ им. Л.Я. Карпова») [24], из которого вырезались полоски прямоугольного сечения. В **табл. 1** дано сравнение механических характеристик фторопластов Ф-4 и Ф-4РМ20 по исходным данным [24, 25]. Видно, что формостабильность протеза стремени после радиационного модифицирования ПТФЭ обеспечивается уменьшением деформации ползучести на два порядка при небольшом снижении прочности и эластичности.

Модифицирующее алмазоподобное покрытие наноразмерной толщины наносили в условиях импульсного катодно-дугового разряда в вакууме с эродирующим графитовым катодом путем формирования направленного к подложке потока плазмы и ее конденсации на подложке. С этой целью применяли вакуумную установку УВНИПА-1-001 с газовым ионным источником ИИ-4-0,15.

Механические испытания образцов материала Ф-4РМ20 до и после нанесения покрытия, а также после ультразвуковой обработки производили на машине Instron 5567 на воздухе и в среде физиологического раствора. Нанесенное покрытие вследствие очень малой (наноразмерной) толщины не оказывает заметного влияния на предельное удлинение при растяжении. Вместе с тем оно способствует повышению звукопроведения в области высоких частот вследствие высокого модуля упругости алмазоподобного углерода, а также приобретения протезом свойств волновода в результате формирования на призматической полимерной подложке твердых «стенок».

Формирование композитного (металлополимерного) варианта биосовместимого покрытия производилось путем совместного использования цилиндрического катода из высокочистого (99,999%) графита марок МПГ-6, МПГ-7

© Коллектив авторов, 2014
© Вестник оториноларингол., 2014

[1]e-mail: prof.sitnikov@bk.ru
[2]e-mail: shilko_mpri@mail.ru
[3]Тел.: +7(37529)314-9282
[4]Тел.: +7(37529)532-0739
[5]Тел.: +7(7705)223-3565

Таблица 1. **Сопоставление упругих и вязкоупругих характеристик фторопласта Ф-4 до и после радиационного модифицирования**

Характеристика	Ф-4	Ф-4РМ20
Прочность при растяжении, МПа	20—25	15—20
Относительное удлинение при разрыве, %	350—450	300—400
Модуль упругости при растяжении, МПа	280	350
Предел вынужденной эластичности, МПа	14	22
Ползучесть при комнатной температуре при статической нагрузке, составляющей 70% от разрывной прочности, за 100 ч, %	150	1—2

Таблица 2. **Морфометрические показатели экспериментальных животных на 60-е сутки наблюдения**

Показатель, мкм	Группа животных		
	1-я	2-я	3-я
Диаметр лимфоидных фолликулов селезенки	234,0 (220,0—315,0)	228,0 (203,0—310,0)	295,0 (243,5—316,0)
Диаметр периартериальной зоны селезенки	30,0 (25,0—32,0)	29,0 (26,0—31,0)	29,0 (25,5—32,5)
Толщина соединительной ткани	64,0 (44,0—76,0)	54,0 (47,0—63,0)	63,0 (37,0—69,5)

с измеренной плотностью 1,8 г/см^3 и металлического катода из химически чистого (99,99%) серебра.

Размер и расположение наночастиц серебра контролировали методами растровой электронной микроскопии на растровом электронном микроскопе VEGA II LSH с системой энергодисперсионного микроанализа INCA ENERGY 250 ADD. На поверхности полимерного протеза сформировано сплошное алмазоподобное покрытие с равномерно распределенными наноразмерными частицами серебра **(см. рис. 1 на цв. вклейке)**.

Биологический эксперимент проводили на 150 белых беспородных крысах, обычно используемых для подобных исследований [26]. Возраст животных составлял 19—21 нед, масса 110—150 г. Они были объединены в три группы по 50 крыс в каждой. В 1-й группе животным имплантировали образец материала Ф-4РМ20 с алмазоподобным покрытием толщиной 5 нм; во 2-й группе производилась имплантация Ф-4РМ20 с аналогичным покрытием, содержащим наноразмерные частицы серебра; а в 3-й группе имплантировали Ф-4РМ20 без покрытия.

Операцию проводили под галотановым наркозом. Выполнялся разрез на выбритой и асептически обработанной коже передней брюшной стенки. Образцы в виде полосок размером 10×5 мм сечением 1 мм в стерильных условиях имплантировали в подкожную клетчатку на глубину до 3 мм без дополнительной фиксации. После операции животных помещали в виварий, где они находились под постоянным наблюдением. На 7, 21, 30 и 60-е сутки их выводили из эксперимента методом декапитации под общим галотановым наркозом. По операционному рубцу открывалась рана, из которой удаляли импланты с прилегающими тканями. Извлеченный материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формальдегида с последующей заливкой в парафин. Из блоков готовили срезы толщиной 5—6 мкм с последующим окрашиванием препаратов гематоксилином и эозином, а также пикрофуксином по ван Гизону.

Аналогичным образом готовили препараты для морфологических исследований ткани легких, сердца, селезенки, печени, почек. Морфометрические исследования проводили посредством аппаратно-программного комплекса на базе светового оптического микроскопа «Carl Zeiss» Axioscop. Измерялась толщина слоя грануляций и соединительной ткани по периферии импланта.

Для оценки степени напряжения иммунных реакций проводили измерение диаметров лимфоидных фолликулов селезенки и ее периартериальной зоны.

Статистический анализ результатов исследования был выполнен с использованием программного продукта Statistica 6.1. Соответствие распределения количественных признаков закону нормального распределения оценивали с помощью теста Колмогорова—Смирнова. Сравнение двух независимых выборок по количественному признаку производили с помощью теста Манна—Уитни, множественные сравнения — с использованием теста Краскелла—Уоллиса. Различия считали значимыми при $p<0,05$. Количественные данные в табличном материале представлены в формате: медиана (Me) и 1-й, 3-й квартили (Q1, Q3) [27].

Результаты и обсуждение

Во всех группах экспериментальных животных определялись однотипные изменения морфометрических показателей тканевых структур, окружающих имплант, и в жизненно важных органах.

В **табл. 2** представлены морфологические показатели экспериментальных животных, выведенных из эксперимента через 2 мес после имплантации (ткань селезенки и локальные ткани).

Показатели диаметра фолликулов и периартериальной зоны селезенки статистически значимо не отличались во всех группах наблюдения ($p>0,05$). При этом следует отметить, что в 3-й группе экспериментальных животных указанные показатели сохранялись на более высоком уровне.

В месте внедрения импланта у животных всех групп наблюдения определялась грубоволокнистая соединительная ткань. Воспалительная реакция отсутствовала **(см. рис. 2 на цв. вклейке)**.

Морфологическая характеристика печени, сердца, легких и почек у всех лабораторных животных независимо от групп и сроков вывода из эксперимента не имела признаков воспалительно-дистрофического процесса.

Таким образом, установлена однотипность локальных тканевых реакций во всех группах животных при менее выраженном грануляционно-рубцовом процессе в случае имплантации Ф-4РМ20 с алмазоподобным покры-

тием толщиной 5 нм, содержащим распределенные наноразмерные частицы серебра. Активизации иммунной системы на введение импланта по статистически значимым показателям увеличения лимфоидных фолликулов селезенки не установлено ни в одной группе животных.

Выводы

1. Морфологические особенности течения тканевых реакций на внедрение имплантов из радиационно-модифицированного фторопласта марки Ф-4РМ20 с алмазоподобным покрытием толщиной 5 нм и алмазоподобным покрытием, содержащим наноразмерные частицы серебра, однотипны и характеризуются формированием грануляционной ткани с последующим образованием фиброзной ткани на 60-е сутки эксперимента.

2. Проведенное экспериментальное исследование показывает перспективность использования в микроотохирургии объемной и поверхностной модификации фторопласта Ф-4, обеспечивающей высокую биосовместимость, стабильность его формы и звукопроводимость без существенного изменения размеров и массы протезов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Вильямс Д.Ф., Роуф Р.* Имплантаты в хирургии. М: Медицина 1978.
2. *Thomas D.W.* Advanced biomaterials for medical applications. Series II: Mathematics, physics and chemistry Vol. 180 Cooperation with NATO Scientific Affairs Division 2004.
3. *Виленский А.В.* Классификация медицинских изделий. Современные подходы. В сб.: Номенклатура и классификация медицинских изделий. М: ФГУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзор 2009; 38—43.
4. *Jahnke K., Dost P., Mifs Teldt N.* Revision nach Stapeschirurgie. HNO 1999; 47: 427.
5. *Ситников В.П.* Методы повышения эффективности стапедопластики. 3-й съезд оториноларингологов Белорусии. Тезисы. Минск 1992; 57—58.
6. *Ситников В.П., Эль-Рефай Хусам, Колесник Т.И.* Современные аспекты хирургического лечения больных с хроническими воспалительными заболеваниями среднего уха. Проблемы здоровья и экологии 2010; 2: 24: 37—41.
7. *Бартон М.* Болезни уха, горла и носа. Пер. с англ. СПб: Невский Диалект 2002.
8. *Аре Б.* Тимпанопластика с применением тимпано-оссикулярного аллотрансплантата. Журн ушн нос и горл бол 2003; 1: 61—68.
9. *Shea J., Sanabria F., Smyth G.* Teflon piston operation for otosclerosis. Arch Otolaryngol 1962; 76: 516—521.
10. *Немец Е.А., Полухина О.С., Егорова В.А., Кузнецов А.В., Василец В.Н., Севастьянов В.И.* Модифицирование полимерных биоматериалов вакуумным ультрафиолетовым излучением. Вестн трансплантол и искусств органов 2002; 3: 116.
11. *Радугин К.Б., Овчинников Ю.М.* Адгезивный средний отит. М: Медицина 1972.
12. *Никитина В.Ф.* Применение аутохряща ушной раковины при операциях по поводу тугоухости, обусловленной отосклерозом. Вестн оториноларинг 2000; 5: 35—38.
13. *Косяков С.Я., Пахилина Е.В., Федосеев В.И.* Отдаленные результаты поршневой стапедопластики с применением тефлоновых и титановых протезов. Кремлевская медицина. Клин вестн 2008; 1: 19—21.
14. *Мельников М.Н.* Оценка эффективности применения имплантов при стапедопластике. Вестн оториноларинг 2007; 6: 40—43.
15. *Севастьянов В.И.* Биосовместимость. М: ИЦ ВНИИ геосистем 1999.
16. *Хенч Л., Джонс Д.* Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей. М: Техносфера 2007.
17. *Алехин А.П. и др.* Синтез биосовместимых поверхностей методами нанотехнологии. Рос нанотехнол 2010; 9/10: 128—136.
18. *Kim J.H., Shin J.H., Shin D.H., Moon M.W., Park K., Kim T.H., Shin K.M., Won Y.H., Han D.K., Lee K.R.* Comparison of diamond-like carbon-coated nitinol stents with or without polyethylene glycol grafting and uncoated nitinol stents in a canine iliac artery model. Br J Radiol 2011; 84: 999: 210—215.
19. *Lorenz C., Hoffmann A., Gross G., Windhagen H., Dellinger P., Möhwald K., Dempwolf W., Menzel H.* Coating of titanium implant materials with thin polymeric films for binding the signaling protein BMP2. Macromol Biosci 2011; 11: 2: 234—244.
20. Пат. DE №3211211 A61F2/18; A61L27/30, опубл. 1983.
21. *Шилько С.В., Ситников В.П., Хусам Э., Казаченко В.П., Попов А.Н.* Протез для стапедопластики: пол. реш. на выдачу патента РБ. Заявитель Ин-т мех. металлополим. сист. НАН Беларуси. a20111242 МПК (2006) A61F2/18; A61L27/30. заявл от 26.09.2011 г., опубл. 30.12.11.
22. Биосовместимые материалы. Под ред. В.И. Севастьянова, М.П. Кирпичникова. М: МИА 2011; 556.
23. *Раздорский В.В.* Оценка биосовместимости имплантатов из никелида титана в эксперименте на животных. Стоматология 2008; 6: 9—12.
24. *Бейдер Э.Я., Донской А.А., Железина Г.Ф.* Опыт применения фторполимерных материалов в авиационной технике. Рос хим журн 2008; 52: 3: 30—44.
25. *Конова Е.М., Хатипов С.А.* Ползучесть радиационно-модифицированного фторопласта-4. Тезисы докл. МНТК «Полимерные композиты и трибология (Поликомтриб-2007). Гомель, 16—19 июля 2007; 146.
26. *Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А.* Лабораторные животные: их разведение, содержание и использование в эксперименте. Киев: Госмедиздат УССР 1962.
27. *Боровиков В.* Statistica. Искусство анализа данных на компьютере: для профессионалов. СПб: Питер 2003.