

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МОДИФИЦИРОВАННОГО СВЕРХВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ПОЛИЭТИЛЕНА НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНИТЕТА ПРИ ЕГО ИМПЛАНТАЦИИ В СРЕДНЕЕ УХО

Военная кафедра УО «Гродненский государственный медицинский университет»

В статье представлены результаты экспериментального исследования влияния нового для отоларингологии материала для протезирования цепи слуховых косточек на показатели иммунитета. На основании полученных данных авторы делают вывод о том, что сверхвысокомолекулярный полиэтилен высокой плотности может использоваться для дальнейших исследований, направленных на разработку оригинальных конструкций протеза оссиколярной системы среднего уха.

Ключевые слова: *сверхвысокомолекулярный полиэтилен высокой плотности, цепь слуховых косточек, среднее ухо.*

Органу слуха принадлежит исключительно важное значение в трудовой деятельности человека. Его надежное функционирование обеспечивает не только коммуникативную функцию, позволяющую вести активный образ жизни, но и выполнение целого ряда профессиональных задач. В связи с постоянным совершенствованием и усложнением военной техники функциональное состояние слухового анализатора у военнослужащих также приобретает особую ак-

туальность. Среднее ухо обеспечивает передачу звуковых колебаний в ушной лабиринт, тем самым играя важную роль в работе всей слуховой системы. Значительное число лиц, поступающих для лечения в оториноларингологические стационары, составляют пациенты, которые имеют деструктивные изменения в среднем ухе[8]. При таких заболеваниях часто в той или иной степени в воспалительный процесс вовлекаются слуховые косточки, что приводит к их полному либо

частичному разрушению.

В настоящее время функционально-реконструктивное направление в лечении хирургической патологии среднего уха является ведущим. В таких случаях отохирург сталкивается с необходимостью восстановить поврежденную оссикюлярную цепь посредством протезирования. На отечественном рынке медицинского оборудования представлена широкая гамма протезов цепи слуховых косточек исключительно зарубежного производства. В частности, общепризнано качество титановых протезов, которые обладают биологической совместимостью с тканями организма, пластичностью и эффектом памяти формы [6, 9, 10]. Однако, существенным недостатком имплантов из титана является их относительно высокая стоимость, что существенно уменьшает доступность оссикюлопластики широким слоям населения. Этот же недостаток присущ и другим видам протезов цепи слуховых косточек, поставка которых налажена из-за рубежа.

Исходя из этого, возникла идея разработки и создания оригинальных конструкций для протезирования среднего уха отечественного производства из доступных по себестоимости материалов. Одним из них может стать сверхвысокомолекулярный полиэтилен высокой плотности [3]. Этот полимер уже достаточно хорошо зарекомендовал себя в травматологии и ортопедии, а также челюстно-лицевой хирургии как биосовместимый материал [1, 5]. Вместе с тем, среднее ухо представляет собой уникальную систему, которая предъявляет особые требования к любому аллогенному материалу. Это обусловлено постоянным контактом с внешней средой посредством слуховой трубы и предпосылками для контаминации барабанной полости вследствие инфицирования верхних дыхательных путей. Поэтому материал, хорошо зарекомендовавший себя при использовании для протезирования в других анатомических областях, в обязательном порядке должен быть испытан в специфической среде среднего уха. В этом контексте, среднее ухо кролика является подходящей экспериментальной моделью на доклинической стадии исследования.

В рамках комплексного исследования по разработке протеза слуховых косточек нами проведено экспериментальное доклиническое исследование на животных по изучению влияния избранного нами для этих целей сверхвысокомолекулярного полиэтилена марки Chirulen с модифицированным по специальной методике поверхностным слоем на некоторые иммунологические показатели крови.

Цель работы – оценить влияние модифицированного сверхвысокомолекулярного полиэтилена высокой плотности (СВМПЭ) при его имплантации в буллу уха кролика на некоторые показатели, характеризующие иммунный статус, в сравнении с широко используемым в отохирургии титаном и результатами, полученными в контрольной группе.

Материал и методы

Для проведения эксперимента использовались беспородные кролики обоего пола массой 1,5-2

кг в количестве 35 особей. В зависимости от вида имплантируемого материала все животные были распределены на 3 группы, определена дата проведения операции и сроки наблюдения. Группы №1 и №2 включали по 15 особей со сроками выведения из эксперимента на 15-е, 60-е и 90-е сутки (по 5 в каждой серии), группа №3 являлась контрольной и состояла из 5 кроликов. В группе №1 материалом для исследования послужили импланты из СВМПЭ, в группе №2 для имплантации использовался титан, животные контрольной группы не оперировались. Для эксперимента использовались импланты цилиндрической формы с размерами 1×6 мм.

Для модифицирования поверхности имплантов из сверхвысокомолекулярного полиэтилена высокой плотности использовали лазерную установку «Квант-15» с активным элементом из алюмо-иттриевого граната, генерирующим излучение с длиной волны $\lambda_0=1,06$ мкм и длительностью импульса 2,0·10⁻⁶ с. Количество импульсов при обработке - 10. В качестве подложек, на которых размещали образцы, использовали светорассеивающий материал (белая бумага). Энергия однократного импульса составляла около 6 Дж. Напряжение накопителя 600 - 800В [7].

Модифицирование позволяет получить материал с заданными параметрами физико-механических характеристик благодаря созданию некомпенсированного заряда, что, в свою очередь, улучшает биосовместимость изделия и в конечном итоге благоприятно отразится на кинетике лечебного процесса [7]. Кроме этого, воздействие лазера позволяет создать определенный нанорельеф, близкий к поверхности натуральных слуховых косточек человека.

Операции выполнялись по следующей методике. Под общей анестезией Sol. Calipsoli 50 mg (внутримышечно) и местной анестезией Sol. Lidocaini 2%-1.0 микрохирургической иглой выполняли миринготомию. В буллу уха кролика с помощью микроинструментов под контролем оптики имплантировали образец исследуемого материала, ушной проход рыхло тампонируют марлевой турундой.

После оперативного вмешательства животные содержались в условиях стационарного вивария на стандартном питании. Проводилось визуальное наблюдение за общим состоянием кроликов и местным статусом (состояние послеоперационных ран и наличие отделяемого из ушей). Забор крови для изучения иммунологических показателей в опытных группах проводили на 15-е, 60-е и 90-е сутки (1-я, 2-я и 3-я серии) после имплантации из ушной вены, в контрольной группе забор крови осуществляли однократно.

Для иммунологических исследований использовалась цельная кровь и сыворотка. Определяли следующие показатели: концентрацию лейкоцитов, лейкоцитарную формулу, количество циркулирующих иммунных комплексов, фагоцитарный индекс и фагоцитарное число, уровень комплемента. Концентрацию лейкоцитов определяли в камере Горяева. Расчет числа лейкоцитов проводили по стандартной

формуле [2]. Подсчет лейкоцитарной формулы проводили с помощью микроскопии. Предварительно из гепаринизированной цельной крови готовили мазки, фиксировали их этанолом и окрашивали по Романовскому [2]. Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) в сыворотке крови определяли по методу M. Digeon в модификации Д. К. Новикова, основанному на физико-химическом осаждении ЦИК раствором полиэтиленгликоля [4]. Изучение фагоцитарной активности нейтрофилов включало определение фагоцитарного числа и фагоцитарного индекса с культурой золотистого стафилококка [4]. Микрометод титрования комплемента проводился с использованием эритроцитов барана. Оценку исследования производили по последней лунке, в которой произошел гемолиз, и выражали в \log_2 и CH_{50} [4].

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием программы Statistica 6.0. С целью объективизации оценки, проводился анализ соответствия вида распределения признака закону нормального распределения – критерий Шапиро-Уилка. Так как в нашем случае число исследуемых животных невелико, то имело место распределение признака отличное от нормального. Соответственно данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха Me (LQ ; UQ). Для сравнения представленных в эксперименте трех групп животных применялся метод Краскела-Уоллиса. При использовании метода рассчитывалась вероятность справедливости нулевой гипотезы (p). Статистически значимыми различия считались при степени безошибочного прогноза, равной 95% ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Активная фаза борьбы иммунной системы с чужеродным характеризуется определенным сдвигом в количестве и соотношении лейкоцитов различных популяций и субпопуляций в кровотоке. Это дает возможность по иммунограмме периферической крови определять степень реакции организма в том числе и на имплантацию аллогенного материала.

Основным критерием наличия интоксикации в организме является нейтрофильное звено. В данном случае важна комплексная всесторонняя оценка нейтрофилов, включающая определение их содержания в крови, морфологических особенностей и физиологической активности. Существенное значение имеет относительное количество нейтрофилов как отдельный показатель. Это связано с тем, что все большее количество воспалительных процессов протекает без повышения общего содержания лейкоцитов в крови. В наших исследованиях имплантация сверхвысокомолекулярного полиэтилена высокой плотности в буллу среднего уха кролика не привела к статистически достоверному повышению либо понижению содержания как палочкоядерных, так и сегментоядерных нейтрофилов в сравнении с контрольной группой и группой №2 (таб.1).

Наряду с нейтрофилами наиболее филогенетически старым элементом клеточного иммунитета являются моноциты (макрофаги разных типов). Макрофаг является основной фагоцитирующей клеткой. Следовательно, отсутствие статистически значимых различий по количеству моноцитов во всех исследуемых группах также свидетельствует о том, что изучаемый материал

Таблица 1. Сравнительная оценка показателей лейкоцитарной формулы у кроликов в различные сроки после имплантации образцов материала из СВМПЭ и титана в буллу среднего уха и контрольной группы, (Me (LQ ; UQ)) и результаты теста Краскела-Уоллиса (p)

| Показатель | Контроль | СВМПЭ | СВМПЭ | СВМПЭ | ТИТАН | ТИТАН | ТИТАН | p | p | p |
|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------|------|------|
| | n=5 | 15-е сутки n=5 | 60-е сутки n=5 | 90-е сутки n=5 | 15-е сутки n=5 | 60-е сутки n=5 | 90-е сутки n=5 | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$ | 2,42 (2,20; 2,81) | 2,92 (2,86; 3,85) | 3,63 (3,08; 3,74) | 3,74 (3,52; 3,80) | 3,30 (3,08; 4,40) | 3,63 (2,53; 5,15) | 4,13 (3,52; 4,68) | 0,13 | 0,33 | 0,23 |
| Палочко-ядерные нейтрофилы, % | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,00 | 0,58 | 1,00 |
| Сегментоядерные нейтрофилы, % | 9 (7; 10) | 14 (13; 14) | 8 (8; 8) | 12 (10; 12) | 16, (14; 28) | 12 (12; 18) | 12 (11; 13) | 0,21 | 0,12 | 0,09 |
| Базофилы, % | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0; 1) | 0 | 0 | 1,00 | 0,31 | 0,37 |
| Эозинофилы, % | 3 (2; 4) | 2 (0; 2) | 4 (2; 4) | 2 (2; 3) | 2 (1; 2) | 2 (0; 2) | 4 (3; 4) | 0,44 | 0,09 | 0,31 |
| Моноциты, % | 3 (2; 4) | 3 (2; 4) | 4 (2; 6) | 4 (4; 5) | 5 (4; 7) | 10 (4; 13) | 4 (3; 5) | 0,45 | 0,33 | 0,10 |
| Лимфоциты, % | 84(80; 86) | 82(80; 84) | 84(84; 84) | 82(78; 82) | 72(66; 84) | 75(69; 78) | 80(78; 82) | 0,27 | 0,36 | 0,08 |

Примечание: индексы при вероятности справедливости нулевой гипотезы (p) соответствуют номерам колонок с данными, которые подвергались сравнению.

не воспринимается организмом как чужеродный и не провоцирует активацию фагоцитоза (таб.1).

Эозинофилы являются регуляторами сосудисто-инфильтративной фазы воспаления, контролируя выделение гистамина и других биологически активных веществ базофилами и тучными клетками и нейтрализуя избыточное количество выброшенного активированного гистамина. Они продуцируют ряд ферментов, участвующих в образовании веществ, ограничивающих очаг воспаления. В любом очаге воспаления или аллергической реакции с самых первых этапов до окончания процесса обнаруживается значительное количество эозинофилов. Отсутствие достоверных различий по количеству этих клеток в лейкоцитарной формуле в опытных и контрольной группах говорит в пользу гипоаллергенности имплантов из СВМПЭ (таб.1).

Основной функцией базофилов является выброс гистамина, гепарина, серотонина в участке скопления чужеродных тел, что способствует формированию воспалительного очага. Базофилы, приходя к месту внедрения инородного объекта из кровотока, усиливают в данном очаге реакции, начатые тучными клетками. Статистически значимых различий по количеству базофилов также не было во всех сериях опытных групп, подвергавшихся сравнению, и в группе контроля (таб.1).

Лимфоциты – это популяция иммунных клеток, определяющая высокую специфичность ответа иммунной системы. Имеются два основных типа лимфоцитов: Т-лимфоциты, обеспечивающие клеточный иммунитет, и В-лимфоциты, ответственные за антителообразование. Лимфоциты, циркулирующие с кровью, являются в основном зрелыми клетками, дифференцированными на субпопуляции. Лимфоциты и молекулярные компоненты их взаимодействия являются элементами патогенеза иммунодефицитных состояний, инфекционных, аллергических, онкологических заболеваний, трансплантационных конфликтов, а также аутоиммунных заболеваний. Результат наших исследований показал, что относительное количество лимфоцитов достоверно

не различалось во всех группах экспериментальных животных (таб.1).

В настоящее время наибольшее практическое распространение получили методы оценки физиологической активности нейтрофилов, основанные на определении активности фагоцитоза на разных его этапах. С этой целью нами определялись фагоцитарный индекс, характеризующий относительное количество нейтрофилов, участвующих в фагоцитозе и фагоцитарное число — среднее количество микробов, поглощённое одним нейтрофильным лейкоцитом. Токсичные вещества в свою очередь могут угнетать функцию фагоцитоза. В наших исследованиях оба вышеуказанных показателя не имели статистически значимых различий в группах с имплантами из исследуемого СВМПЭ и эталонного титана в течение всего срока наблюдения и сравнимы с результатами, полученными в контрольной группе (таб.2).

Циркулирующие иммунные комплексы в крови - показатель развития различных воспалительных процессов в организме и показатель активности течения аутоиммунных заболеваний. ЦИК образуются и циркулируют в кровяном русле в ответ на введение чужеродного агента. Они представляют собой комплексы, состоящие из антител, антигена и компонентов комплемента. Образование ЦИК - физиологический механизм защиты организма, приводящий к быстрому удалению эндогенных и экзогенных антигенов. При инфицировании, аллергии, аутоиммунных заболеваниях происходит повышенное образование ЦИК, и, в ряде случаев, откладывание этих комплексов в корковом слое почек с развитием воспалительной реакции. Комплемент, в свою очередь, представляет собой группу из ряда плазменных факторов, присутствующих в крови в виде неактивных проферментов, в определенной последовательности активирующих друг друга. Комплемент участвует в реакциях связывания антителами вторгшихся в организм антигенов; способствует лизису, агглютинации и опсонизации чужеродных клеток. В нашем исследовании содержание циркулирующих иммунных комплексов и уровень

Таблица 2. Сравнительная оценка физиологической активности нейтрофилов у кроликов в различные сроки после имплантации образцов материала из СВМПЭ и титана в буллу среднего уха и контрольной группы, (Ме (LQ; UQ)) и результаты теста Краскела-Уоллиса (p).

| Показатель | Контроль n=5 | СВМПЭ 15-е сутки n=5 | СВМПЭ 60-е сутки n=5 | СВМПЭ 90-е сутки n=5 | ТИТАН 15-е сутки n=5 | ТИТАН 60-е сутки n=5 | ТИТАН 90-е сутки n=5 | p 2-3-6 n=15 | p 2-4-7 n=15 | p 2-5-8 n=15 |
|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| Фагоцитарное число, у.е. | 5,50 (4,70; 5,80) | 6,00 (5,20; 6,20) | 6,40 (5,80; 7,60) | 6,60 (4,70; 7,10) | 6,10 (5,40; 6,60) | 6,20 (6,00; 8,10) | 4,90 (4,25; 5,70) | 0,35 | 0,51 | 0,14 |
| Фагоцитар- ный индекс, % | 62,00 (60,00; 65,00) | 51,00 (50,00; 60,00) | 60,00 (60,00; 62,00) | 65,00 (55,00; 68,00) | 48,00 (40,00; 51,00) | 60,00 (55,00; 70,00) | 45,00 (43,00; 60,00) | 0,11 | 0,18 | 0,16 |

Примечание: индексы при вероятности справедливости нулевой гипотезы (p) соответствуют номерам колонок с данными, которые подвергались сравнению.

Таблица 3. Сравнительная оценка содержания циркулирующих иммунных комплексов и уровня комплемента в крови кроликов в различные сроки после имплантации образцов материала из СВМПЭ и титана в буллу среднего уха и контрольной группы (Me (LQ; UQ)) и результаты теста Краскела-Уоллиса (p).

| Показатель | Контроль n=5 | СВМПЭ 15-е сутки n=5 | СВМПЭ 60-е сутки n=5 | СВМПЭ 90-е сутки n=5 | ТИТАН 15-е сутки n=5 | ТИТАН 60-е сутки n=5 | ТИТАН 90-е сутки n=5 | p 2-3-6 n=15 | p 2-4-7 n=15 | p 2-5-8 n=15 |
|--------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| Фагоцитарное число, у.е. | 5,50 (4,70; 5,80) | 6,00 (5,20; 6,20) | 6,40 (5,80; 7,60) | 6,60 (4,70; 7,10) | 6,10 (5,40; 6,60) | 6,20 (6,00; 8,10) | 4,90 (4,25; 5,70) | 0,35 | 0,51 | 0,14 |
| Фагоцитарный индекс, % | 62 (60; 65) | 51 (50; 60) | 60 (60; 62) | 65 (55; 68) | 48 (40; 51) | 60 (55; 70) | 45 (43; 60) | 0,11 | 0,18 | 0,16 |
| ЦИК, у.е. | 5,00 (5,00; 9,00) | 14,00 (11,00; 16,00) | 11,00 (11,00; 12,00) | 17,00 (15,00; 20,00) | 28,00 (20,00; 44,00) | 8,00 (6,00; 10,00) | 5,00 (4,00; 13,00) | 0,10 | 0,10 | 0,23 |
| Комплемент, CH50 | 25,05 (25,05; 25,05) | 16,70 (16,70; 25,05) | 16,70 (16,70; 16,70) | 25,05 (16,70; 25,05) | 25,05 (25,05; 25,05) | 33,40 (16,70; 41,75) | 16,70 (8,35; 25,05) | 0,54 | 0,50 | 0,16 |

Примечание: индексы при вероятности справедливости нулевой гипотезы (p) соответствуют номерам колонок с данными, которые подвергались сравнению.

комплемента в крови животных с имплантом из сверхвысокомолекулярного полиэтилена статистически не отличались от таких же показателей в группе №2 на протяжении всего периода наблюдения, а также в группе контроля (таб. 3).

Анализ результатов эксперимента показал, что на 15-е, 60-е и 90-е сутки после имплантации в буллу уха кролика материала из СВМПЭ показатели иммунитета не имеют статистически значимых различий от аналогичных показателей животных с имплантами из взятого нами за эталон титана, биосовместимость которого при его применении в отохирургии подтверждена многочисленными исследованиями [6, 9, 10].

Отсутствие достоверных различий с данными группы контроля, содержавшей интактных животных, дает основание считать, что модифицированный сверхвысокомолекулярный полиэтилен высокой плотности не оказывает патологического влияния на иммунный статус.

Выводы

1. Оценка результатов эксперимента показала, что на 15-е, 60-е и 90-е сутки после имплантации в буллу уха кролика материал из модифицированного сверхвысокомолекулярного полиэтилена не оказывает существенного влияния на показатели иммунитета.

2. Иммунологическая оценка не выявила статистически значимых различий между данными опытных групп и группы контроля, в которой оперативные вмешательства не проводились, что указывает на то, что модифицированный сверхвысокомолекулярный полиэтилен высокой плотности является безопасным, биоинертным материалом, не вызывающим общих патологических реакций в организме экспериментальных животных при его имплантации в буллу среднего уха.

3. Полученные данные позволяют рассматривать сверхвысокомолекулярный полиэтилен высокой плотности как материал пригодный для дальнейших исследований, направленных на разработку оригинальных конструкций протеза цепи слуховых косточек.

Литература

- Василенко, И.П. Полимерные и металлокерамические материалы в реконструктивно-пластической хирургии посттравматических краниофациальных повреждений / И.П. Василенко, М.П. Николаев, Р.М. Николаев // Российская оториноларингология. – 2003. – № 4. – С. 86–90.
- Лабораторная гематология / С. А. Луговская [и др.]. – М.: Юнимед-пресс, 2002. – 115 с.
- Материаловедение / В.А. Струк [и др.]. – Минск: ИВЦ Минфина, 2008. – 519 с.
- Новиков, Д. К. Оценка иммунного статуса / Д. К. Новиков В.И. Новикова. – М.: Медицина, 1996. – 281 с.
- Пинчук, Л.С. Эндопротезирование суставов: технические и медико-биологические аспекты / Л.С. Пинчук, В.И. Николаев, Е.А. Цветкова. – Гомель: ИММС НАНБ, 2003. – 308 с.
- Плужников, М.С. Современное состояние проблемы хирургической реабилитации больных с хроническими воспалительными заболеваниями среднего уха / М.С. Плужников, В.В. Дискаленко, Л.М. Курмашова // Вестник оториноларингологии. – 2006. – № 5. – С. 31–34
- Сорокин, В.Г., Эйсымонт ЕИ. Влияние лазерного излучения на структурные параметры полимерных материалов. Вестник ГрГУ 2009; 2(82): 109–116.
- Хоров, О.Г. Хирургическое лечение больных деструктивными средними отитами / О.Г. Хоров, В.Д. Меланьин. – Гродно: ГрГМУ, 2001. – 150 с.
- Чернушевич, И.И. Сравнительная характеристика протезов, используемых при оксидулопластике / И.И. Чернушевич, И.Н. Александров // Российская оториноларингология. – 2004. – № 1. – С. 113–115.
- Weerda, H. History of auricular reconstruction / H. Weerda // Adv Otorhinolaryngol. – 2010. – № 68. – P. 1–24.

Поступила 28.01.2013 г.