

СТИМУЛИРОВАННАЯ ЦИТОКИНПРОДУЦИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ МЕДИЦИНСКИХ МАТЕРИАЛОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ В ПРОИЗВОДСТВЕ ХИРУРГИЧЕСКИХ СТЕНТОВ

С.В. ШКОДКИН^{1,2}

К.А. БОЧАРОВА¹

М.И. КОГАН³

С.В. ИВАНОВ⁴

Ю.Б. ИДАШКИН²

Е.Ф. МИХАЙЛОВА²

Н.Г. БАХТИНА²

А.В. ЛЮБУШКИН¹

О.В. МИРОШНИЧЕНКО¹

¹⁾ Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет

²⁾ Белгородская областная клиническая
больница Святителя Иоасафа

³⁾ Ростовский государственный
медицинский университет

⁴⁾ Курский государственный медицинский
университет

e-mail: shkodkin-s@mail.ru

Выраженность воспалительной реакции на медицинские импланты определяется биоинертными свойствами материала и коррелирует с уровнем провоспалительных (IFN α , IFN γ , TNF α , IL-1 β , IL-1 β Ra, IL-2, IL-6, IL-8), противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов. В исследовании приведены результаты стимулированной способности клеток лейкоцитарного ряда к продукции цитокинов в ответ на имплантацию различных медицинских материалов, используемых для изготовления стентов.

Секреция таких цитокинов как IFN γ , IL-1 β , IL-8 зависела от исследуемого материала. Наибольшая воспалительная реакция отмечена на металлы и полиуретан. Наименьшая продукция цитокинов отмечена в присутствии наноразмерного покрытия на основе аморфного углерода и атомарного серебра.

Ключевые слова: медицинский имплант, стент, цитокины, воспаление.

Введение. Без применения имплантатов мы не можем представить ни один раздел современной медицины [3, 8, 9, 11]. Долгосрочность и безотказность функции имплантов, конечно же, определяется многими факторами, часть которых узко специализированы, но такие, как инфекционные осложнения и местная воспалительная реакция окружающих тканей, стандартны для имплантов любой локализации и играют порой определяющую роль в длительности их функционирования [1, 2, 5, 6, 9]. Вклад каждого из описанных факторов неравнозначен и определяется местом имплантации. Так, для эндоваскулярных стентов инфекционное обсеменение – явление казуистическое [4], тогда как для мочевых и билиарных – один из основных факторов риска персистенции дренажной инфекции с развитием местных и системных инфекционных осложнений, а также обструкции стента [3, 5, 10]. Но, безусловно, всегда отмечается синергизм взаимодействия этих факторов. Например, чем меньше биоинертность материала, использованного в производстве импланта, тем выраженнее окружающая воспалительная реакция и тем меньше число инфекционного агента способно привести к бактериальным осложнениям, последние в подавляющем большинстве требуют удаления импланта. Это зачастую приводит к потере функции и невозможности реимплантации [3, 6, 7, 9].

Целью работы стало изучение стимулированной цитокин-продуцирующей активности лейкоцитарными образцами материалов, используемых для изготовления внутренних стентов, *in vitro*.

Материал и методы. Для изучения стимулированной цитокин-продуцирующей активности использовали лейкоцитарный слой, полученную из цельной крови четырех здоровых доноров второй A(II) группы крови по системе ABO, резус фактор положительный Rh (пол). Лейкоцитарный слой 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 лейкоцитарном слое доводили до 15×10^9 /мл добавлением физиологического раствора натрия хлорида, подогретого до температуры 37°C. При этом,



содержание гранулоцитов в лейкозвеси составило $6,8 \pm 0,75 \times 10^9$ /мл, лимфоцитов – $6,45 \pm 0,84 \times 10^9$ /мл, моноцитов – $1,7 \pm 0,06 \times 10^9$ /мл, тромбоцитов – $954 \pm 103 \times 10^9$ /мл. Концентрация эритроцитов не превышала $0,09 \pm 0,0012 \times 10^{12}$ /мл, гемоглобина – $3,1 \pm 0,07$ г/л, уровень гематокрита – $0,92 \pm 0,04$ %. Клеточный состав и показатели гемограммы лейкозвеси определялись автоматизированным способом, и их распределение не отличалось от нормального ($p > 0,05$). Время приготовления лейкозвеси составило $20,1 \pm 0,4$ мин. Готовую лейкозвесь 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 – 1 см². В качестве контрольных материалов исследовали образцы медицинской стали (1), полиуретана (2), сплава титана с эффектом памяти формы на основе Ti-Ni-(X) (3) и титана медицинского крупнозернистого ВТ1-0 (4) рыночных мочеточниковых и эндоваскулярных стентов. В основную группу включены низкомолекулярный титановый сплав системы Ti-Nb-Mo-Zr (5), наноструктурированный нелигированный титан марки ВТ1-0 (6), наноразмерные покрытия на основе аморфного углерода (7), на основе аморфного углерода и азота (8) и на основе аморфного углерода и атомарного серебра (9) и (10), имеющие аналогичную площадь поверхности. Последнее покрытие было представлено двумя модификациями, отличающимися содержанием серебра. Т.о., исследовано десять материалов. Биоинертные свойства указанных наноразмерных покрытий, наноструктурированного нелигированного титана марки ВТ1-0 и низкомолекулярного титанового сплава системы Ti-Nb-Mo-Zr исследованы впервые. Экспериментальные материалы и покрытия изготовлены НОЦ «Наноструктурные материалы и сплавы» НИУ «БелГУ», научный руководитель д.ф.м.н., профессор Ю.Р. Колобов, и «Лабораторией ионно-плазменного напыления» НИУ «БелГУ», научный руководитель к.ф.м.н., профессор А.Я. Колпаков.

Таблица 1

Количество проб по группам наблюдения

Материал		Количество проб				
		Донор №1	Донор №2	Донор №3	Донор №4	Итого
Исходный уровень цитокинов в лейкозвеси		1	1	1	1	4
Контрольные материалы	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
	сплав титана с эффектом памяти формы на основе Ti-Ni-(X)	1(5)+1(5)=2	1(5)+1(5)=2	1(5)+1(5)=2	1(5)+1(5)=2	8
	титан медицинский крупнозернистый ВТ1-0	1(5)+1(5)=2	1(5)+1(5)=2	1(5)+1(5)=2	1(5)+1(5)=2	8
Экспериментальные материалы	низкомолекулярный титановый сплав системы Ti-Nb-Mo-Zr	1(5)+1(5)=2	1(5)+1(5)=2	1(5)+1(5)=2	1(5)+1(5)=2	8
	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 азота	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 №1	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						92

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

Образец материала помещался в объем 0,5 мл лейкозвеси. Лейкозвесь от каждого донора инкубировалась с десятью образцами каждого из материалов в термостате в течение 24 часов при температуре 37°C с оставлением контроля, распределение групп приведено в табл. 1. Уровень цитокинов оценивали методом твердофазного ИФА с помощью набора реагентов ЗАО



«Вектор Бест» (г. Москва), используя kit 96 исследований (табл. 2), для чего ресуспензировали по пять образцов каждого материала через 12 и 24 часа. Т.о., с учетом контроля, на каждую временную точку от одного донора получили 11 проб плазмы, т.е. всего 88 проб и 4 определения исходного уровня цитокинов в лейкозвеси (табл. 1).

Таблица 2

Исследуемые цитокины

Цитокин	Производитель
альфа-ИНТЕРФЕРОН (IFN α)	ЗАО «Вектор Бест» г. Москва
гамма-ИНТЕРФЕРОН (IFN γ)	ЗАО «Вектор Бест» г. Москва
альфа-ФНО (TNF α)	ЗАО «Вектор Бест» г. Москва
ИНТЕРЛЕЙКИН-1 бета (IL-1 β)	ЗАО «Вектор Бест» г. Москва
Рецепторный антагонист ИЛ-1 бета (IL-1 β Ra)	ЗАО «Вектор Бест» г. Москва
ИНТЕРЛЕЙКИН-2 (IL-2)	ЗАО «Вектор Бест» г. Москва
ИНТЕРЛЕЙКИН-4 (IL-4)	ЗАО «Вектор Бест» г. Москва
ИНТЕРЛЕЙКИН-6 (IL-6)	ЗАО «Вектор Бест» г. Москва
ИНТЕРЛЕЙКИН-8 (IL-8)	ЗАО «Вектор Бест» г. Москва
ИНТЕРЛЕЙКИН-10 (IL-10)	ЗАО «Вектор Бест» г. Москва

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, (σ^2); ср. квадратичное отклонение (σ); 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 ($V_{dep}=d_{cp}/x_{cp}$); 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.

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. Уровни исследуемых цитокинов, определенные в нативной плазме доноров, не отличались от средних популяционных величин, рекомендованных фирмой производителем ИФ-тест систем и, за исключением уровня рецепторного антагониста интерлейкина-1 бета (IL-1 β Ra), имели нормальное распределение. Их средние значения и показатели средних квадратичных отклонений приведены в табл. 3.

Таблица 3

Содержание цитокинов в плазме доноров

Исследуемые цитокины	Донор				M $\pm\sigma$ *
	№1	№2	№3	№4	
альфа-ИНТЕРФЕРОН (IFN α), [0-5]**	0,95	1,73	1,34	1,09	1,28 \pm 0,34
гамма-ИНТЕРФЕРОН (IFN γ), [0-10]	2,35	3,89	3,15	3,22	3,15 \pm 0,63
альфа-ФНО (TNF α), [0-6]	0,68	0,95	0,51	0,73	0,72 \pm 0,18
ИНТЕРЛЕЙКИН-1 бета (IL-1 β), [0-11]	1,64	3,19	1,86	2,04	2,18 \pm 0,69
Рецепторный антагонист ИЛ-1 бета (IL-1 β Ra), [20-1740]	86	219	39	167	126,5(74,25)***
ИНТЕРЛЕЙКИН-2 (IL-2), [0-10]	0,71	1,62	1,16	1,05	1,14 \pm 0,38
ИНТЕРЛЕЙКИН-4 (IL-4), [0-4]	0,31	0,79	0,65	0,48	0,56 \pm 0,21
ИНТЕРЛЕЙКИН-6 (IL-6), [0-10]	3,49	6,08	4,25	4,91	4,68 \pm 1,10
ИНТЕРЛЕЙКИН-8 (IL-8), [0-10]	4,17	5,88	3,71	4,38	4,54 \pm 0,94
ИНТЕРЛЕЙКИН-10 (IL-10), [0-31]	5,73	7,29	6,33	6,47	6,46 \pm 0,64

Примечание: * – среднее арифметическое \pm среднее квадратичное отклонение; ** – диапазон нормальных величин в плазме, пг/мл; *** – показатели приведены в значении медианы с указанием области 50% квартиля: Me (range).



Отмечено достоверное повышение стимулированной секреции альфа-интерферона (IFN α) относительно исходного уровня и контроля в присутствии полиуретана, что составило через 12 часов $4,17 \pm 0,61$ пг/мл, через 24 часа - $7,23 \pm 1,79$ пг/мл, тогда как контрольные показатели на этом сроках равнялись $1,18 \pm 0,31$ пг/мл и $2,53 \pm 0,83$ пг/мл соответственно ($p < 0,05$). В остальных группах наблюдения в исследуемых образцах плазмы уровень IFN α статистически достоверно не отличался от исходных значений, а его прирост коррелировал с показателями контроля (табл. 4, 5).

Таблица 4

Стимулированная цитокин-продуцирующая активность лейкоцитами через 12 часов

Материалы	Цитокины, пг/мл									
	IFN α	IFN γ	TNF α	IL-1 β	IL-1 β Ra	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10
Медицинская сталь	2,07 $\pm 1,13$	741,3 $\pm 162,3^*$	8,02 $\pm 1,73^*$	57,5 $\pm 11,2^*$	104,7 (65,1)	25,3 $\pm 7,1$	1,93 $\pm 0,71$	10,7 $\pm 4,1^*$	413,5 $\pm 107,3^*$	16,7 $\pm 7,1$
Полиуретан	4,17 $\pm 0,61^*$	813,9 $\pm 211,5^*$	8,12 $\pm 1,51^*$	44,1 $\pm 8,3^*$	113,3 (71,1)	19,1 $\pm 9,2$	1,75 $\pm 0,58$	8,4 $\pm 4,9^*$	371,5 $\pm 73,2^*$	14,1 $\pm 6,5$
Сплав титана с эффектом памяти формы на основе Ti-Ni-(X)	2,42 $\pm 1,04$	425,2 $\pm 121,5^*$	7,74 $\pm 1,39^*$	63,4 $\pm 15,1^*$	158,4 (88,3)	23,3 $\pm 5,1$	1,46 $\pm 0,33$	6,1 $\pm 1,8^*$	394,5 $\pm 80,3^*$	11,9 $\pm 4,7$
Титан медицинский крупнозернистый ВTi-0	1,67 $\pm 0,53$	369,2 $\pm 104,8^*$	7,09 $\pm 0,77^*$	25,3 $\pm 4,1^*$	129,1 (73,4)	19,4 $\pm 5,8$	1,37 $\pm 0,33$	7,8 $\pm 3,5^*$	283,2 $\pm 45,5^*$	8,2 $\pm 3,2$
Низкомодульный титановый сплав системы Ti-Nb-Mo-Zr	2,16 $\pm 0,88$	401,4 $\pm 165,9^*$	7,54 $\pm 1,42^*$	42,6 $\pm 11,9^*$	124,6 (78,4)	28,1 $\pm 8,3$	1,52 $\pm 0,59$	6,0 $\pm 1,5^*$	402,7 $\pm 99,2^*$	6,9 $\pm 2,7$
Наноструктурированный нелигированный титан марки ВTi-0	1,94 $\pm 0,69$	327,4 $\pm 99,7^*$	6,96 $\pm 1,22^*$	27,1 $\pm 4,2^*$	105,3 (61,7)	25,5 $\pm 6,1$	1,55 $\pm 0,34$	9,8 $\pm 3,7^*$	322,7 $\pm 49,1^*$	9,8 $\pm 4,1$
Наноразмерное покрытие на основе аморфного углерода	1,47 $\pm 0,35$	238,3 $\pm 64,1^*$	6,37 $\pm 1,05^*$	17,4 $\pm 3,1$	96,2 (58,1)	21,3 $\pm 5,8$	1,04 $\pm 0,28$	6,4 $\pm 1,02^*$	188,3 $\pm 31,7$	10,5 $\pm 4,9$
Наноразмерное покрытие на основе аморфного углерода и азота	1,93 $\pm 0,65$	81,1 $\pm 28,5^*$	6,85 $\pm 0,69^*$	15,1 $\pm 2,6$	117,1 (63,1)	18,5 $\pm 6,6$	1,17 $\pm 0,22$	7,3 $\pm 2,8^*$	203,2 $\pm 27,1$	11,3 $\pm 5,5$
Наноразмерное покрытие на основе аморфного углерода и атомарного серебра №1	1,57 $\pm 0,48$	68,3 $\pm 24,1^*$	8,91 $\pm 1,47^*$	16,9 $\pm 3,8$	101,4 (55,7)	28,1 $\pm 7,9$	1,29 $\pm 0,35$	5,7 $\pm 1,4^*$	142,5 $\pm 22,7$	8,4 $\pm 4,1$
Наноразмерное покрытие на основе аморфного углерода и атомарного серебра №2	1,62 $\pm 0,45$	55,2 $\pm 15,7^*$	9,22 $\pm 1,93^*$	12,5 $\pm 4,7$	117,9 (64,8)	32,7 $\pm 11,4$	0,98 $\pm 0,23$	5,3 $\pm 1,14^*$	131,4 $\pm 28,1$	5,7 $\pm 2,6$
Контроль	1,18 $\pm 0,31$	7,92 $\pm 2,85$	3,12 $\pm 0,74$	14,8 $\pm 3,1$	132,7 (81,2)	16,5 $\pm 7,1$	1,15 $\pm 0,39$	2,41 $\pm 1,37$	119,6 $\pm 32,1$	7,2 $\pm 3,8$

Примечание: * – различия статистически достоверны в сравнении с контролем.

Стимулированная секреция гамма-интерферона (IFN γ) во всех группах статистически достоверно отличалась от исходного уровня в плазме доноров, а также от контроля на обоих временных интервалах (табл. 4, 5). Динамика прироста на сроке 12 часов была максимальной в

группах с медицинской сталью и полиуретаном, что составило $741,3 \pm 162,3$ пг/мл и $813,9 \pm 211,5$ пг/мл соответственно, что достоверно больше по сравнению с другими материалами. На следующем 12-часовом интервале отмечена некоторая стабилизация скорости прироста уровня IFN γ в этих группах. Сплавы титана (сплав титана с эффектом памяти формы на основе Ti-Ni-(X), титан медицинский крупнозернистый ВТ1-0, низко модульный титановый сплав системы Ti-Nb-Mo-Zr, наноструктурированный нелигированный титан марки ВТ1-0) достоверно не отличались по способности к стимулированной секреции IFN γ на всем сроке наблюдения. Причем максимальный прирост секреции данного цитокина в этих группах отмечался во втором периоде эксперимента, поэтому концентрации IFN γ в группах со сплавами титана, хотя и не достигли таковых в группах с полиуретаном и медицинской сталью, но на сроке 24 часа статистически не различались (табл. 5). Минимальная способность к стимулированной секреции IFN γ на сроке 12 часов выявлена у защищенных металлов, а именно у наноразмерных покрытий на основе аморфного углерода, аморфного углерода и азота и двух разновидностей покрытий на основе аморфного углерода и атомарного серебра (табл. 4). К окончанию эксперимента минимальные показатели стимулированной секреции сохранили обе группы серебра содержащих наноразмерных покрытий, данные показатели составили для группы с наноразмерным покрытием на основе аморфного углерода и атомарного серебра №1 – $98,5 \pm 29,7$ пг/мл, для группы с наноразмерным покрытием на основе аморфного углерода и атомарного серебра №2 – $116,3 \pm 35,8$ пг/мл ($p > 0,05$), что достоверно меньше, чем следующее по возрастанию значение в группе с наноразмерным покрытием на основе аморфного углерода – $238,3 \pm 64,1$ пг/мл ($p < 0,05$, табл. 5).

Содержание фактора некроза опухоли (TNF α) во всех группах наблюдения на исследуемых временных интервалах было достоверно выше контроля: $3,12 \pm 0,74$ и $4,61 \pm 0,66$ пг/мл через 12 и 24 часа соответственно (табл. 4, 5, $p < 0,05$), причем отмечен статистически достоверный рост содержания этого цитокина во всех группах наблюдения к концу суток наблюдения. На временном интервале 12 часов статистически значимой разницы в группах с исследуемыми материалами обнаружено не было (табл. 4, $p > 0,05$). К концу периода наблюдения сохранялась аналогичная тенденция во всех группах, за исключением группы с наноразмерным покрытием на основе аморфного углерода и атомарного серебра №2, где значения данного цитокина были достоверно выше $29,65 \pm 5,71$ пг/мл по сравнению с другими группами наблюдения (табл. 5, $p < 0,05$). Наименьшие статистически не значимые уровни TNF α зарегистрированы в группе с наноразмерным покрытием на основе аморфного углерода $6,37 \pm 1,05$ и $13,95 \pm 2,61$ пг/мл соответственно регистрируемым временным интервалам.

Стимулированная секреция ключевого провоспалительного цитокина (IL-1 β) достоверно различалась в группах наблюдения (табл. 4, 5). Уровень IL-1 β в группах с медицинской сталью, полиуретаном, сплавом титана с эффектом памяти формы на основе Ti-Ni-(X) и низко модульным титановым сплавом системы Ti-Nb-Mo-Zr через 12 часов составил $57,5 \pm 11,2$, $44,1 \pm 8,3$, $63,4 \pm 15,1$ и $42,6 \pm 7,9$ пг/мл соответственно, что было достоверно выше, чем в других группах наблюдения ($p < 0,05$). Содержание IL-1 β на этом сроке наблюдения в группах титана медицинского крупнозернистого ВТ1-0 и наноструктурированного нелигированного титана марки ВТ1-0 составило $25,3 \pm 4,1$ и $27,1 \pm 4,2$ пг/мл соответственно, что достоверно больше контроля и защищенных металлов (табл. 4, $p < 0,05$).

Статистически значимых различий у наноразмерных покрытий в сравнении с контролем на сроке 12 часов отмечено не было. На следующем временном интервале сохраняется тенденция к росту стимулированной и спонтанной (контроль) секреции IL-1 β . Максимальные содержания данного цитокина отмечены в группе с медицинской сталью, при этом отсутствовали статистически достоверные различия в сравнении с полиуретаном, титаном и его сплавами ($p > 0,05$, табл. 5). На этом сроке наблюдения отмечены статистически значимые различия стимулированной секреции IL-1 β в группах с наноразмерными покрытиями на основе аморфного углерода и аморфного углерода и азота в сравнении с контролем, что составило $42,4 \pm 8,1$, $39,2 \pm 6,1$ и $25,4 \pm 4,8$ пг/мл соответственно ($p < 0,05$, табл. 5). Для данного срока наблюдения стимулированная секреция IL-1 β в группах с наноразмерными покрытиями на основе аморфного углерода и атомарного серебра №1 и №2 также не отличалась от контроля и составила $28,2 \pm 4,5$, $21,7 \pm 3,3$ и $25,4 \pm 4,8$ соответственно ($p > 0,05$, табл. 5).

Однотипный характер секреции отмечен еще у одного провоспалительного цитокина моноцитарно-макрофагального происхождения, а именно у интерлейкина-8 (IL-8) (табл. 4, 5). Его содержание в группах с полиуретаном и металлами было достоверно выше, чем в группах с наноразмерными покрытиями и контролем на обоих сроках наблюдения ($p < 0,01$, табл. 4, 5). Уровень стимулированной секреции IL-8 в группе с наноразмерным покрытием на основе аморфного углерода и атомарного серебра №2 не отличался от спонтанной секреции данного цитокина в контроле и составил $131,4 \pm 28,1$ и $119,6 \pm 32,1$ и $177,6 \pm 45,1$ и $157,2 \pm 31,8$ пг/мл



соответственно на сроках наблюдения 12 и 24 часа, что не имело статистически достоверных различий ($p > 0,05$).

Уровень такого регуляторного цитокина, как рецепторный антагонист интерлейкина-1 (IL-1 β Ra), не претерпел статистически достоверных колебаний за время эксперимента, его распределение отличалось от нормального, средние величины приведены в значении медианы с указанием области 50% квартиля.

Таблица 5

Стимулированная цитокин-продуцирующая активность лейкоцитами через 24 часа

Материалы	Цитокины, пг/мл									
	IFN α	IFN γ	TNF α	IL-1 β	IL-1 β Ra	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10
Медицинская сталь	3,65 $\pm 0,93$	964,5 $\pm 249,7^*$	16,45 $\pm 3,56^*$	125,3 $\pm 37,4^*$	112,5 (73,8)	40,1 $\pm 12,4$	2,07 $\pm 0,65$	13,1 $\pm 6,8^*$	914,4 $\pm 261,8^*$	32,2 $\pm 13,7$
Полиуретан	7,23 $\pm 1,79^*$	1085,7 $\pm 312,1^*$	17,02 $\pm 2,88^*$	86,9 $\pm 32,7^*$	107,1 (62,4)	34,3 $\pm 9,3$	1,54 $\pm 0,51$	13,4 $\pm 3,3^*$	588,5 $\pm 130,8^*$	33,7 $\pm 11,2$
Сплав титана с эффектом памяти формы на основе Ti-Ni-(X)	4,09 $\pm 1,21$	817,8 $\pm 232,4^*$	16,65 $\pm 4,15^*$	144,2 $\pm 59,5^*$	143,2 (84,7)	31,3 $\pm 6,7$	1,68 $\pm 0,74$	8,2 $\pm 3,2^*$	819,6 $\pm 208,1^*$	25,4 $\pm 7,3$
Титан медицинский крупнозернистый ВТ1-0	3,84 $\pm 0,79$	764,9 $\pm 176,2^*$	15,79 $\pm 2,72^*$	91,1 $\pm 28,1^*$	179,3 (92,7)	29,6 $\pm 16,1$	1,12 $\pm 0,22$	9,7 $\pm 2,4^*$	601,3 $\pm 117,5^*$	21,5 $\pm 8,8$
Низкомодульный титановый сплав системы Ti-Nb-Mo-Zr	4,13 $\pm 1,02$	856,5 $\pm 181,1^*$	15,37 $\pm 2,64^*$	103,9 $\pm 35,1^*$	109,4 (62,7)	31,8 $\pm 7,8$	1,93 $\pm 0,81$	10,2 $\pm 3,9^*$	647,8 $\pm 102,1^*$	18,1 $\pm 9,1$
Наноструктурированный нелигированный титан марки ВТ1-0	3,66 $\pm 0,71$	792,3 $\pm 207,8^*$	16,93 $\pm 4,05^*$	102,5 $\pm 21,6^*$	129,5 (76,2)	38,1 $\pm 8,6$	1,37 $\pm 0,44$	8,3 $\pm 2,1^*$	516,3 $\pm 127,7^*$	27,5 $\pm 13,8$
Наноразмерное покрытие на основе аморфного углерода	2,37 $\pm 0,49$	238,3 $\pm 64,1^*$	13,95 $\pm 2,61^*$	42,4 $\pm 8,1^*$	135,5 (82,4)	41,4 $\pm 11,3$	1,16 $\pm 0,33$	9,1 $\pm 2,7^*$	297,2 $\pm 56,8^*$	22,9 $\pm 10,7$
Наноразмерное покрытие на основе аморфного углерода и азота	2,75 $\pm 0,93$	269,6 $\pm 55,8^*$	14,08 $\pm 2,89^*$	39,2 $\pm 6,1^*$	101,1 (57,8)	35,2 $\pm 10,7$	0,89 $\pm 0,31$	7,1 $\pm 2,2^*$	307,3 $\pm 51,8^*$	18,5 $\pm 7,1$
Наноразмерное покрытие на основе аморфного углерода и атомарного серебра №1	2,84 $\pm 0,62$	98,5 $\pm 29,7^*$	19,17 $\pm 3,09^*$	28,2 $\pm 4,5$	123,1 (66,3)	48,3 $\pm 14,9$	1,14 $\pm 0,42$	5,9 $\pm 1,3^*$	275,5 $\pm 37,1^*$	18,2 $\pm 9,4$
Наноразмерное покрытие на основе аморфного углерода и атомарного серебра №2	3,08 $\pm 0,76$	116,3 $\pm 35,8^*$	29,65 $\pm 5,71^*$	21,7 $\pm 3,3$	108,4 (62,1)	57,2 $\pm 15,4^*$	1,01 $\pm 0,21$	7,5 $\pm 2,4^*$	177,6 $\pm 45,1$	17,1 $\pm 11,6$
Контроль	2,53 $\pm 0,83$	25,72 $\pm 7,04$	4,61 $\pm 0,66$	25,4 $\pm 4,8$	122,5 (69,8)	27,1 $\pm 7,8$	1,09 $\pm 0,45$	2,85 $\pm 1,12$	157,2 $\pm 31,8$	15,8 $\pm 10,3$

Примечание: * – различия статистически достоверны в сравнении с контролем.

Изменения в стимулированной секреции интерлейкина-2 (IL-2) заключались в статистически достоверном увеличении содержания IL-2 в сравнении с контролем в группе с наноразмерным покрытием на основе аморфного углерода и атомарного серебра №2 через сутки наблюдения, что составило $57,2 \pm 15,4$ пг/мл относительно $27,1 \pm 7,8$ пг/мл в контроле ($p < 0,05$, табл. 5). В первые 12 часов увеличение содержания IL-2 отмечено во всех группах наблюдения, но достоверной разницы со спонтанной секрецией выявлено не было ($p > 0,05$, табл. 4). При сравнении стимулированной секреции IL-2 исследуемыми материалами через сутки эксперимента также не установлено статистически достоверных различий ($p > 0,05$, табл. 5).

Содержание противовоспалительных цитокинов интерлейкина-4 (IL-4) и интерлейкина-10 (IL-10) за исследуемый период не подверглось статистически значимым колебаниям ни в одной из групп наблюдения ($p > 0,05$, табл. 4, 5) и не вышло за рамки нормальных концентраций для этих цитокинов. Имелась тенденция к увеличению уровня IL-10 через 24 часа инкубации в группах с медицинской сталью и полиуретаном, но, как отмечено выше, эти колебания были недостоверны.

Зарегистрирован рост концентрации регуляторного цитокина – интерлейкина-6 (IL-6) во всех группах наблюдения в сравнении со спонтанной секрецией ($p < 0,05$, табл. 4, 5) без достоверно значимых различий между самими группами наблюдения ($p > 0,05$, табл. 4, 5).

Наиболее выраженные групповые различия стимулированной цитокин-продуцирующей активности лейкоцитарной зарегистрированы в отношении наиболее $IFN\gamma$, IL-1 β и IL-8. Максимальный уровень продукции этих цитокинов и $IFN\alpha$ зарегистрирован в группах медицинской стали и полиуретана, несколько ниже их стимулированная секреция отмечена на титан содержащие материалы, что соответствует данным литературы. Лучшие показатели биоинертности в отношении титан содержащих материалов обусловлены оксидной пленкой, которая отсутствует у стали. На имплантацию материалов этих групп следует ожидать более ярко протекающие иммуно-воспалительные реакции. Менее выраженная стимулированная секреция $IFN\gamma$, IL-1 β и IL-8 отмечена в группах с металлами, защищенными наноразмерными покрытиями. Минимальное статистически значимое содержание этих цитокинов (особенно IL-1 β) в группе с наноразмерным покрытием на основе аморфного углерода и атомарного серебра №2 может быть связано с мембран-стабилизирующим действием малых концентраций атомарного серебра.

Интересным является факт большей цитокин-продуцирующей активности в отношении цитокинов, отвечающих за антибактериальный, противовирусный и противоопухолевый иммунный ответ (TNF α , IL-2) в группах с наноразмерным покрытием на основе аморфного углерода и атомарного серебра, особенно в группе №2, что может объяснять опосредованный бактерицидный эффект серебра при небольшом (недостаточном для прямой цитотоксичности) его содержании. И хотя достоверная разница получена только для IL-2, имеющиеся результаты в отношении покрытия углерод-серебро требуют дальнейшего изучения.

Отсутствие роста регуляторных (IL-1 β Ra, IL-6) и противовоспалительных (IL4, IL-10) цитокинов, вероятно, обусловлено малыми сроками наблюдения, т.е. незавершенностью иммуно-воспалительных реакций и еще отсутствием стимуляции специфических цитокин-продуцирующих клеток. 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 можно считать более перспективным, т.к. без ограничений в сроках наблюдения имеется возможность прижизненной оценки уровня как системной (определение цитокинов сыворотки), так и, что более важно, местной (определение цитокинов в моче при имплантации стента из исследуемого материала в мочевые пути) воспалительной реакции, а также возможность изучения морфологических изменений в органах иммунной системы.

Таким образом:

1. Полиуретан, медицинская сталь, титан и его сплавы, используемые в настоящее время для изготовления мочеточниковых, билиарных и панкреатических стентов, вызывают выраженную цитокин-продуцирующую реакцию.
2. Оксид титана не предупредил массивной секреции провоспалительных цитокинов.
3. Минимальные показатели цитокин-продуцирующей активности отмечены в группе с наноразмерным покрытием на основе аморфного углерода и атомарного серебра №2.

Необходимо дополнительное исследование опосредованной антибактериальной активности наноструктурированных серебросодержащих покрытий.

Литература

1. Диагностическое значение подъема уровня провоспалительных цитокинов в моче при обострении калькулезного пиелонефрита / П.В. Глыбочко, Н.Б. Захарова, А.Н. Понукалин и др. // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2011. – Т. 7, №2. – С. 143.
2. Маянский, А.Н. Цитокины и медиаторные функции уростимулятора в воспалительных реакциях мочевыводящей системы / А.Н. Маянский // Цитокины и воспаление. – 2003. – Т. 2, №4. – С. 3-8.
3. Медиаторы воспаления и фиброгенеза у детей с инфекцией мочевой системы / С.С. Паунова и др. // Педиатрия. – 2008. – № 3. – С. 34-37.



4. Оганов, Р.Г. Иммуновоспалительные реакции при остром коронарном синдроме / Р.Г. Оганов // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2007. – № 5. – С. 15-19.
5. Особенности цитокинового профиля у больных хроническим гломерулонефритом с прогрессирующей хронической почечной недостаточностью / Н.Н. Корякова и др. // Терапевтический архив. – 2006. – Т. 7-8, № 5. – С. 14-17.
6. Палеев, Н.Р. Цитокины и их роль в патогенезе заболеваний сердца / Н.Р. Палеев, М.Ф. Палеев // Клиническая медицина. – 2004. – №5. – С.4-6.
7. Печенкина, Н.В. Состояние иммунитета у детей с хроническим пиелонефритом, получавших иммуномодулирующую терапию / Н.В. Печенкина, Я.Ю. Иллук, Г.А. Зайцева // Международный журнал по иммунореабилитации. – 2009. – Т. 11, № 1. – С. 127.
8. Постоляко, А.С. Цитокиновый спектр сыворотки крови у больных ИБС после имплантации коронарных стентов различных модификаций / А.С. Постоляко // Медицинские новости. – 2004. – № 12. – С. 93-95.
9. Постоляко, А.С. Эффективность применения стентов с лекарственным покрытием у больных ишемической болезнью сердца / А.С. Постоляко // Здоровоохранение. – 2004. – №11. – С. 46-50.
10. Ferguson, M.A. [Vaidya V.S., Bonventre J.V.] // Toxicology. – 2008. – V. 245, № 3. – P. 182-193.
11. Sadeghi, M. [Daniel V., Schnitzler P. et al.] // Transplantation. – 2009. – V. 88, № 9. – P. 1109-1116.

CAUSED CYTOKINE OF ACTIVE MEDICAL MATERIALS USED IN MANUFACTURE TO PRODUCE SURGICAL STENTS

S.V. SHKODKIN^{1,2}
K.A. BOCHAROVA¹
M.I. KOGAN³
S.V. IVANOV⁴
Y.B. IDASHKIN²
E.F. MICHAILOVA²
N.G. BAHTINA²
A.V. LUBUSHKIN¹
O.V. MIROSHNICHENKO¹

¹⁾ *Belgorod National Research University*

²⁾ *Belgorod St. Joasaph regional hospital*

³⁾ *Rostov State Medical University*

⁴⁾ *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 the level of proinflammatory (IFN α , IFN γ , TNF α , IL-1 β , IL-1 β Ra, IL-2, IL-6, IL-8) antiinflammatory cytokines (IL-4, IL-10)/ The study presents the results stimulated the ability of leukocyte cells of the cytokine production in response to implantation of various medical materials used for the manufacture of stents.

The secretion of cytokines such as IFN γ , IL-1 β , IL-8 was dependent on the test material. Most inflammatory response was noted in metal and polyurethane. Lowest cytokine production was observed in the presence of nanosized layer on amorphous carbon and atomic silver.

Keywords: medical implant, stent, cytokines, inflammation.