



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2015143742/14, 13.10.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.10.2015

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 13.10.2015

(45) Опубликовано: 27.11.2016 Бюл. № 33

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: МАЙБОРОДИН И.В. и др. Имплантация биодеградируемого полигидроксикапраната в полость поврежденного сустава крысы. Scientific Journal ISSN 1812-7339, 2011, N10, p. 107-112. RU 145527 U1, 20.09.2014. RU 2361622 C1, 20.07.2009. RU 2558101 C2, 27.07.2015. EP 2508212 A1, 10.10.2012. US 20120010599 A1, 12.01.2012. ХОН В.Э и др. Исследование (см. прод.)

Адрес для переписки:

308015, обл. Белгородская, г. Белгород, ул.
Победы, 85, НИУ "БелГУ", ОИС, Цуриковой
Н.Д.

(72) Автор(ы):

Шкодкин Сергей Валентинович (RU),
Куликовский Владимир Федорович (RU),
Мирошниченко Олег Владимирович (RU),
Бочарова Ксения Александровна (RU),
Колпаков Александр Яковлевич (RU),
Дмитриев Вадим Николаевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет" (НИУ "БелГУ") (RU)

(54) СПОСОБ ОЦЕНКИ БИОИНЕРТНОСТИ МЕДИЦИНСКИХ ИМПЛАНТОВ in vivo

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, в частности к экспериментальной хирургии, и может быть использовано для оценки биоинертности материалов для изготовления медицинских имплантов. Для этого имплантируют в печень и почки крыс по два образца исследуемого материала с последующим послойным ушиванием раны без дренажа. Затем на 14 и 30 сутки животных выводят из эксперимента и берут образцы ткани для гистологического исследования, вырезая поперечно к направлению имплантата через всю толщу органа. Измеряют толщину

формирующихся реактивных тканевых зон и капсул, после чего проводят подсчет относительного количества клеточных элементов, характеризующих различные стадии раневого процесса. Для этого исследуют полиморфноядерные лейкоциты всех типов, лимфоциты, гистиоциты, фибробласты. Устанавливают биологическую инертность материала на основании выраженности лейкоцитарной инфильтрации, отсутствия в инфильтратах полиморфноядерных лейкоцитов, определяемой толщине соединительнотканной капсулы и завершенности коллагеногенеза. 1 пр.

(56) (продолжение):

биосовместимости и антибактериальных свойств серебросодержащего трикальцийфосфата in vivo. Вестник травматологии и ортопедии им.Н.Н.Приорова, 2014, N 3, С.56-61. PROWANS P et al. The

influence of new polyester block copolymer on morphology of hepatocytes of rats liver. Polim Med. 1999;29 (3-4):41-8,abstr.

R U 2 6 0 3 7 1 7 C 1

R U 2 6 0 3 7 1 7 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2015143742/14, 13.10.2015

(24) Effective date for property rights:
13.10.2015

Priority:

(22) Date of filing: 13.10.2015

(45) Date of publication: 27.11.2016 Bull. № 33

Mail address:

308015, obl. Belgorodskaja, g. Belgorod, ul. Pobedy,
85, NIU "BelGU", OIS, TSurikovoj N.D.

(72) Inventor(s):

**SHkodkin Sergej Valentinovich (RU),
Kulikovskij Vladimir Fedorovich (RU),
Miroshnichenko Oleg Vladimirovich (RU),
Bocharova Ksenija Aleksandrovna (RU),
Kolpakov Aleksandr JAKovlevich (RU),
Dmitriev Vadim Nikolaevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**

(54) **METHOD FOR ASSESSING BIOINERTNESS OF MEDICAL IMPLANTS in vivo**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine, particularly to experimental surgery. For that two samples of analyzed material are implanted in liver and kidneys of rats with further layer suturing of wound without drainage. Then on 14 and 30 day animals are removed from experiment, and tissue samples are taken for histopathological examination incising transversely in direction of implant through the whole thickness of the body. Depth of formed reactive tissue areas and capsules is measured, afterwards cell elements,

describing various stages of wound process, are counted. For this purpose polymorphonuclear leukocytes of all types are analyzed: lymphocytes, histiocytes, fibroblasts. Biological inertness of material is specified based on intensity of leukocyte infiltration, absence of polymorphonuclear leucocytes in infiltrates, determined thickness of connective tissue capsule and completeness of collagenogenesis.

EFFECT: invention can be used to assess bioinertness of materials for making medical implants.

1 cl, 1 ex

RU 2 603 717 C1

RU 2 603 717 C1

Изобретение относится к медицине, а именно к экспериментальной хирургии, и может быть использовано для оценки биоинертности материалов для изготовления медицинских имплантов в эксперименте *in vivo* путем анализа тканевой реакции.

Известен способ оценки биоинертности на модели повреждения сустава и применения полигидроксибутирата (ПГА) в эксперименте, в котором после обработки кожи спиртом производился разрез кожи в области передней поверхности левого коленного сустава длиной 1 см. После вскрытия суставной капсулы, стоматологическим бором диаметром 2 мм при медленных оборотах повреждали хрящ суставной поверхности большеберцовой кости на глубину 1-2 мм. В просвет сустава для прикрытия дефекта хряща помещалась пленка из ПГА диаметром 5 мм. Несколькими узловыми викриловыми швами («00» с атравматическими иглами) ушивалась суставная капсула, на кожу накладывался непрерывный викриловый шов. Фрагменты костей бедра и голени вместе со структурами коленного сустава, имплантированным материалом и окружающими тканями, фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида на фосфатном буфере (рН 7,4) не менее 24 часов, декальцинировали в растворе «Биодек R» (Bio Optica Milano, Италия) в течение 24 часов, обезвоживали в серии этанола возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в парафин. Срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, изучали на световом микроскопе Axioimager M1 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении до 1200 раз. При световой микроскопии производилась оценка макрофагальной и лейкоцитарной инфильтрации, признаков гранулематозной воспалительной реакции, степени выраженности фиброзного процесса вокруг импланта. Используя полученные данные, анализировали степень биоинертности исследуемого материала (Имплантиция биодеградируемого полигидроксиалканоата в полость поврежденного сустава крысы. Майбородин И.В., Шевела А.И., Береговой Е.А., Дровосек М.Н., Матвеева В.А., Баранник М.И., Кузнецова И.В. Scientific Journal ISSN 1812-7339. - №10 of 2011 -1. - p. 107-112).

Недостатками метода являются: узкий спектр анализируемых тканей (только суставной хрящ), сравнительная трудоемкость.

Известен способ оценки биоинертности медицинских материалов, заключающийся в том, что под нембуталовым наркозом (доза 40 мг/кг) на наружной поверхности верхней трети бедра крысы делается разрез кожи длиной около 1 см. Анатомическим глазным пинцетом расчленяется бедренная мышца (вдоль волокон), в которой при помощи того же пинцета формируется карман. Изучаемый материал помещается в этот карман. На мышцу накладываается один шов, на кожу два шва. Применяется хирургический шелк высоких номеров. Одной из контрольных групп животных имплантируется биосовместимый материал, другой производится ложная операция (те же манипуляции без имплантации материала). После выведения животных из эксперимента производится забор регионарных лимфатических узлов и на основании анализа цитологических изменений лимфоидной ткани оценивается степень биоинертности материала (Методика определения биосовместимости полимерных материалов и изделий для эндопротезирования по их влиянию на лимфоидную ткань. Утв. минздравом СССР 27.11.1985).

Недостатком аналога является косвенная оценка биоинертности, только на основании изменений лимфоидной ткани, а не местных тканевых реакций.

Известен способ определения биоинертности, связанный с подкожной имплантацией образцов материалов из серебросодержащего трикальцийфосфата (ТКФ) с различной степенью замещения серебром (ТКФ-Ag) - 0,04, 0,2 и 0,5. По результатам гистологического исследования образцов тканей с подкожно введенным ТКФ-Ag по

содержанию в образцах тканей клеток лейкоцитарного ряда, лимфоцитов, макрофагов оценивали признаки воспалительной реакции и реакции отторжения, что позволяло оценить биосовместимость исследуемого материала (Исследование биосовместимости и антибактериальных свойств серебросодержащего трикальцийфосфата *in vivo*. Вестник 5 травматологии и ортопедии им.Н.Н.Приорова /Хон В.Э., Загородный Н.В., Мамонов В.Е., Гласко Е.Н., Петракова Н.В., Шальнев А.Н., Пхакадзе Т.Я., Комлев В.С. //2014. - N 3. - С.56-61).

Недостатками известного способа являются отсутствие в исследовании помимо 10 подкожной жировой клетчатки других тканей, в том числе паренхиматозных органов, что не позволяет делать вывод о специфичности воспалительных изменений в тканях.

Задачей предлагаемого изобретения является разработка способа оценки биоинертности материалов, используемых при производстве медицинских имплантов, в эксперименте *in vivo*.

Поставленная задача решается с помощью предлагаемого способа оценки 15 биоинертности медицинских имплантов *in vivo*, включающего моделирование течения раневого процесса путем срединной лапаротомией, при которой через рану в печень и почки имплантируют по два образца исследуемого материала в виде фрагментов проволоки, затем рану послойно ушивают без дренажа и на 14 и 30 сутки животных выводят из эксперимента, берут образцы ткани для гистологического исследования из 20 печени и почек, вырезая поперечно к направлению имплантата через всю толщу органа, затем измеряют толщину формирующихся реактивных тканевых зон и капсул, после чего проводят подсчет относительного количества клеточных элементов, характеризующих различные стадии раневого процесса: полиморфноядерные лейкоциты всех типов, лимфоциты, гистиоциты, фибробласты.

Способ осуществляют следующим образом. Под наркозом у половозрелых белых 25 крыс выполняют срединную лапаротомию, через рану в печень и почки имплантируют по 2 образца исследуемого материала в виде фрагментов проволоки. Рана послойно ушивается без дренажа. Выведение животных из эксперимента производится на 14 и 30 сутки. Производится извлечение исследуемых органов. Для морфологического 30 исследования извлеченные органы после макроскопического исследования фиксируются в 10% растворе формалина. Кусочки для гистологического исследования из печени и почек вырезаются поперечно к направлению имплантата через всю толщу органа. Морфометрия должна включать измерение толщины формирующихся реактивных 35 тканевых зон и капсул, подсчет относительного количества клеточных элементов, характеризующих различные стадии раневого процесса: полиморфноядерные лейкоциты всех типов, лимфоциты, гистиоциты, фибробласты.

Пример конкретного выполнения. Изучение локальной воспалительной реакции при имплантации исследуемых материалов в паренхиматозные органы животных выполнено на 70 белых лабораторных крысах линии Wistar обоего пола, которым из 40 срединного лапаротомного доступа выполняли имплантацию стерильных отрезков проволоки (для металлических имплантов) или нити (для полиуретана) длиной 7 и диаметром 0,25 мм путем введения в толщу ткани печени и почки (по два импланта). В настоящей серии опытов исследована биоинертность четырех экспериментальных и трех контрольных материалов: медицинская сталь, полиуретан, сплавы на основе титана 45 (сплав титана с эффектом памяти формы на основе Ti-Ni-(X) и β -сплав), а так же наноструктурных покрытий на основе аморфного углерода, азота и атомарного серебра (нпС, нпСN и нпСAg№2). В каждую группу входило по 10 животных.

Из эксперимента животных выводили в равном количестве на 14-е и 30-е сутки после

имплантации. Данные сроки выбраны с учетом стандартной динамики течения раневого процесса. К 14 суткам нивелируются неспецифические воспалительные изменения, обусловленные хирургической травмой, и морфологические тканевые реакции в большей степени зависят от биоинертных свойств материала имплантов. На 30 сутки в целом завершаются клеточные иммунные реакции, стабилизируются процессы коллагеногенеза и образования отграничительной капсулы с видимой спецификой реакции тканей в зависимости от природы импланта.

Для морфологического исследования извлеченные органы после макроскопического исследования фиксировали в 10% растворе формалина. После внешнего осмотра из фиксированных органов извлекали имплантаты. Кусочки для гистологического исследования из печени и почек вырезали поперечно к направлению имплантата через всю толщу органа. Морфометрия включала измерение толщины формирующихся реактивных тканевых зон и капсул, подсчет относительного количества клеточных элементов, характеризующих различные стадии раневого процесса: полиморфноядерные лейкоциты всех типов, лимфоциты, гистиоциты, фибробласты.

Основными клеточно-тканевыми реакциями, характеризующими степень биологической инертности исследуемых материалов, явились выраженность лейкоцитарной инфильтрации и цитологический состав этих инфильтратов, а так же толщина и зрелость соединительно-тканой капсулы. Причем последний показатель, а именно выраженность капсулы, степень завершенности коллагеногенеза и дифференцировки коллаген продуцирующих клеток, больше коррелировал с видом имплантируемого материала.

Несмотря на различную выраженность клеточных реакций паренхимы печени и почек, причины которой рассмотрены выше, тканевые изменения тесно коррелировали с видом имплантируемого материала. Таким образом, уже с 14 суток нивелировались последствия хирургической травмы, связанной с имплантацией материалов. К 30 суткам во всех группах наблюдения снижалась интенсивность воспалительной реакции, изменялся цитологический спектр воспалительных инфильтратов, регистрировались процессы организации коллагена в соединительно-тканной капсуле. Причем характер этих процессов определялся видом имплантируемого материала и имел идентичные тенденции как в печени, так и в почке.

Наименьшие показатели биоинертности зарегистрированы в группе медицинской стали. Характерным морфологическим признаком для этой группы на 14 сутки послеоперационного периода явилась выраженная гранулоцитарная (нейтрофильная) инфильтрация с образованием воспалительного вала по периферии соединительно-тканной капсулы. На этом сроке наблюдения отсутствовали статистически достоверные различия по содержанию нейтрофилов при имплантации медицинской стали в паренхиму почки $317 \pm 83,5$ кл. в п/з, и печени $386 \pm 57,8$ кл. в п/з ($p > 0,05$). Подобная тенденция отмечена по содержанию гистиоцитов и фибробластов, данный факт указывает на то, что выраженный провоспалительный эффект медицинской стали нивелирует орган специфичность тканевой реакции. К 30 суткам в обеих сериях опытов сохранялась лейкоцитарная инфильтрация, изменился характер инфильтратов за счет преобладания малых лимфоцитов. Количество последних в серии с печенью достоверно выше по сравнению с почкой и составило $362 \pm 49,8$ и $138 \pm 25,7$ кл. в п/з соответственно ($p < 0,01$). На данном сроке наблюдения отсутствуют статистические различия по содержанию в инфильтратах нейтрофилов, фибробластов и фиброцитов ($p > 0,05$).

При имплантации полиуретана в паренхиму почки и печени к 14 суткам наблюдения так же зарегистрировано образование воспалительного вала к периферии от

соединительно-тканной капсулы и гранулоцитарной (нейтрофильной) инфильтрации без статистически достоверных различий в сериях опытов: $107 \pm 21,8$ и $148 \pm 39,1$ кл. в п/з соответственно ($p > 0,05$). Но уже на этом сроке наблюдения основу инфильтратов в обеих сериях составляют малые лимфоциты, содержание которых при имплантации в печень составляет $365 \pm 44,2$ кл. в п/з, что достоверно больше по сравнению с почкой $171 \pm 25,8$ кл. в п/з ($p < 0,01$). К 30 суткам регистрируются тенденции, отмеченные в группе с медицинской сталью и заключающиеся в рассасывании воспалительного вала, отсутствии гранулоцитарной инфильтрации и возрастании орган специфичности воспалительной тканевой реакции, характеризующейся ее большей выраженностью в печени. В группах с медицинской сталью и полиуретаном к 30 суткам, наряду с уплотнением и упорядочиванием коллагеновых волокон центральной части капсулы, было характерно наличие рыхлой незрелой соединительной ткани к периферии капсулы, густо инфильтрированной клеточными элементами.

Для остальных групп наблюдения отмечена строгая орган специфичность воспалительных изменений, что, как уже упоминалось, связано с локальными условиями при имплантации и указывает на большую биоинертность данных материалов. В группах сплавы титана, покрытия на основе аморфного углерода и нпСАg№2 зарегистрировано прогрессивное статистически значимое снижение выраженности воспалительной инфильтрации и соединительно-тканной капсулы в обеих сериях опытов и на обоих сроках наблюдения. В группе сплавы титана процесс организации соединительно-тканной капсулы не завершен, ее периферия составлена из незрелой рыхлой соединительной ткани и воспалительного диффузного инфильтрата. Для металлов, защищенных наноразмерными покрытиями, в особенности для нпСАg№2, характерно отсутствие в почке и минимальная диффузная лимфоидная инфильтрация в печени, завершенность коллагеногенеза с отсутствием фибробластной реакции и наличием умеренного количества дифференцированных фиброцитов.

Таким образом, к основным морфологическим критериям биологической инертности материалов на сроках до 1 месяца следует отнести: выраженность лейкоцитарной инфильтрации; отсутствие в инфильтратах полиморфноядерных лейкоцитов; толщину соединительно-тканной капсулы и завершенность коллагеногенеза. Наилучшие показатели биоинертности отмечены у защищенных металлов, при этом лидером стало нпСАg№2. Данный результат можно объяснить инертностью углерода, составляющего основу покрытия, к тканям организма и антипролиферативными свойствами серебра. Среди контрольных материалов лучшие показатели биоинертности имел сплав титана с эффектом памяти формы на основе Ti-Ni-(X), что связано с образованием пленки из оксида титана, покрывающей поверхность импланта, не являющейся полярной и тем самым подавляющей эффекты гальванизации.

Формула изобретения

Способ оценки биоинертности медицинских имплантов *in vivo*, отличающийся тем, что имплантируют в печень и почки крыс по два образца исследуемого материала с последующим послойным ушиванием раны без дренажа, затем на 14 и 30 сутки животных выводят из эксперимента, берут образцы ткани для гистологического исследования, вырезая поперечно к направлению имплантата через всю толщу органа, затем измеряют толщину формирующихся реактивных тканевых зон и капсул, после чего проводят подсчет относительного количества клеточных элементов, характеризующих различные стадии раневого процесса: полиморфноядерные лейкоциты всех типов, лимфоциты, гистиоциты, фибробласты, и устанавливают биологическую инертность материала при

наличии выраженности лейкоцитарной инфильтрации, отсутствии в инфильтратах полиморфноядерных лейкоцитов, определяемой толщине соединительнотканной капсулы и завершенности коллагеногенеза.

5

10

15

20

25

30

35

40

45