

Имплантат связки коленного сустава с композитным нанопокрывтием

Аннотация

Разработан метод изготовления имплантата связки коленного сустава на основе синтетической конструкции из волокон полиэтилентерефталата с нанесенным композитным нанопокрывтием. Покрывтие представляет собой водную дисперсию многостенных (МУНТ) и одностенных (ОУНТ) углеродных нанотрубок и наносится на синтетические волокна с помощью ультразвука, далее фиксируется методом лазерного испарения. Композитное нанопокрывтие на основе ОУНТ имело поры диаметром 10...20 нм, а на основе МУНТ – 40...60 нм. Проведены *in vitro* исследования пролиферативной активности клеток фибробластов человека (ФЧ) при их колонизации на поверхность и между синтетических волокон. Наибольшее значение пролиферации ФЧ наблюдалось на синтетической конструкции с композитным нанопокрывтием на основе МУНТ с большим размером пор и составило 55 435 шт., в отличие от покрытия на основе ОУНТ (54 931 шт.) и контрольного образца (54 715 шт.), о чем свидетельствуют результаты флуоресцентной микроскопии и МТТ-теста.

Введение

Повреждения внутрисуставных связок коленного сустава (СКС) – одна из наиболее изучаемых проблем в современной ортопедии. Это связано с большим распространением таких повреждений и их социальной значимостью. В США только изолированные повреждения передней крестообразной связки коленного сустава составляют 43 случая на 100 тыс. человек в год и демонстрируют уверенный рост среди лиц младше 20 лет и женщин среднего возраста [1]. В Германии каждый травматолог выполняет в среднем 35 операций пластики связок коленного сустава в год [2]. По данным российских медицинских учреждений, частота повреждений связок составляет один случай на 3000 человек, большинство пациентов – активные и трудоспособные люди в возрасте от 16 до 45 лет.

Одной из важных причин неудовлетворительных результатов оперативного лечения таких повреждений является плохая биологическая интеграция тканей стенки костного канала в имплантат связки [3]. Обычно для разработки имплантатов связок коленного сустава применяется синтетический плетеный материал в виде плоской ленты или бесшовной трубки, изготовленный из волокон полиэтилентерефталата (ПЭТФ). Преимуществами использования ПЭТФ являются устойчивость к кислым и щелочным средам организма, а также к механическим повреждениям. Данный материал имеет плотность 1360...1400 кг/м³ и предел прочности при растяжении – 172 МПа. Однако механические характеристики сплетенных волокон ПЭТФ превосходят прочность костной ткани канала, в котором фиксируется имплантат. В связи с этим существует проблема разрушения костного канала, особенно в первое время после проведения операции. На преодоление данной проблемы направлены современные методы регенеративной медицины, а именно тканевая инженерия – метод частичного или полного восстановления физических и биологических функций поврежденных или утраченных органов путем стимуляции регенерации трехмерной структуры ткани [4]. В основе концепции метода лежит создание искусственных тканеинженерных каркасов, обеспечивающих пролиферацию клеток и поддержку роста биологических тканей [5]. Для выполнения своих функций каркасы должны быть биосовместимыми, биодеградируемыми, иметь пористую структуру, а также механические характеристики, соответствующие биологическим тканям [6].

Установлено, что перспективным материалом для создания тканеинженерных каркасов являются углеродные нанотрубки (УНТ), распределенные в биологической матрице [7]–[9]. Для преодоления проблемы восстановления СКС предложен метод формирования композитного покрытия на поверхности волокон ПЭТФ. Покрывтие на основе тканеинженерных каркасов из УНТ в белковой матрице обеспечит наилучшую адгезию и рост клеток соединительной и костной ткани, что приведет к сокращению срока послеоперационного восстановления пациента.

Материалы и методы

Метод формирования композитного нанопокрывтия на волокнах ПЭТФ состоит из трех этапов. Первый этап заключается в приготовлении гомогенной дисперсии УНТ в белковой матрице. С помощью современного аналитического оборудования были выбраны два типа нанотрубок: одностенные углеродные нанотрубки (ОУНТ) и многостенные углеродные нанотрубки (МУНТ) со степенью чистоты 98 %. ОУНТ синтезированы электродуговым методом на Ni/Y-катализаторе, представляют собой пасту черного цвета в деионизованной воде (с концентрацией ~ 2,5 % мас.). Средний диаметр ОУНТ равен ~1,5 нм, распределение по длине – 0,5...1,5 нм. Тип агрегации нанотрубок – в виде тяжелой средней длины 1...10 мкм, поперечный размер – 6...7 нм [10]. МУНТ синтезировались низкотемпературным термокаталитическим методом на Ni-катализаторе и представляли собой порошок черного цвета. Внешний диаметр МУНТ – 40...120 нм, длина 1...10 мкм, а внутренний диаметр – 10...30 нм [10]. Поскольку технология получения покрытия предусматривает термический нагрев дисперсии, в качестве белка был выбран наиболее устойчивый к повышению температуры бычий сывороточный альбумин (БСА). Чистота БСА составляла 98,1 % мас., а массовая доля примесей тяжелых металлов не превышала 0,001 %.

Массовые доли компонентов дисперсии подбирались с помощью аналитических весов (1) и составляли 0,02...0,1 % мас. для УНТ, 25 % мас. для БСА и 74,98...74,9 % мас. для воды (рис. 1). Изначально производилось перемешивание УНТ в воде с помощью магнитной мешалки (2) и УЗ-гомогенизатора (3) при мощности 40 Вт/см² до получения однородной дисперсии УНТ в воде, поскольку наличие агломератов нанотрубок приводит к неоднородности покрытия. Затем к дисперсии УНТ добавляли БСА в виде порошка, далее смесь обрабатывали в шадильном режиме с помощью магнитной мешалки (2) и УЗ-ванны (4) при мощности 2 Вт/см².

Второй этап формирования композитного нанопокрывтия заключался в ультразвуковом нанесении дисперсии, полученной на первом этапе, на поверхность волокон ПЭТФ, сплетенных в виде плоской или трубчатой конструкции. Для этого синтетическую конструкцию помещали в емкость с дисперсией, которая, в свою очередь, была погружена в жидкость УЗ-ванны так, чтобы уровни дисперсии и жидкости совпадали. Обработка ультразвуком проводилась при мощности 1...2 Вт/см² в течение 10 мин.

На третьем этапе производили удаление дисперсии из емкости с синтетической конструкцией и равномерное облучение лазерным излучением поверхности волокон ПЭТФ с нанесенной дисперсией. Для облучения использовался ИК-диодный лазер (5), работающий в непрерывном режиме, с длиной волны 810 нм и мощностью излучения от 3 до 5 Вт. Пространственный профиль пучка лазерного излучения имел гауссово распределение, и его диаметр был соизмерим с шириной синтетической конструкции.

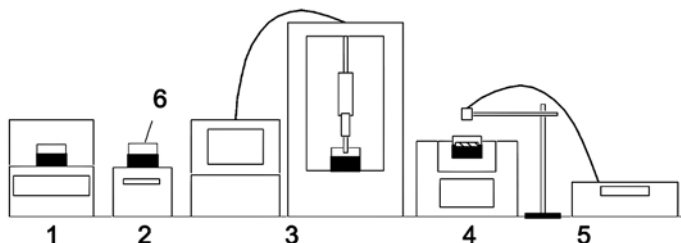


Рис. 1. Аппаратурная схема формирования композитного нанопокрyтия на синтетической конструкции из волокон ПЭТФ (пояснения – в тексте)

На рис. 2 представлены изображения структуры синтетической конструкции с нанесенной дисперсией на основе МУНТ (рис. 2а, б) и ОУНТ (рис. 2в, г), полученные с помощью оптической микроскопии при сорокакратном (рис. 2а, в) и пятикратном увеличении (рис. 2б, г).

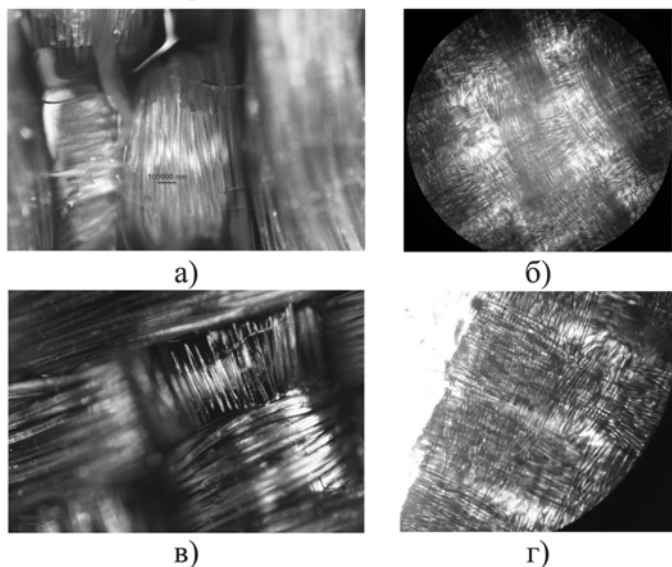


Рис. 2. Изображения оптической микроскопии синтетической конструкции с нанесенным композитным нанопокрyтием на основе МУНТ (а), (б) и ОУНТ (в), (г)

Ультразвуковой метод нанесения нанопокрyтия обеспечил равномерное покрытие поверхности синтетической конструкции. Водный компонент дисперсии испарялся в процессе лазерного облучения. Под действием электрического поля направленного лазерного излучения осуществлялась самоорганизация нанотрубок в каркас. Из представленных изображений видно, что композитное нанопокрyтие на основе ОУНТ на волокнах ПЭТФ имело наиболее светлo-серый равномерный оттенок в отличие от покрытия на основе МУНТ. Это может быть объяснено наличием гидрофильных функциональных групп на поверхности нанотрубок, следовательно, наилучшей гомогенизацией их в водной матрице. За счет водного испарения по всему объему каркаса наблюдалось большое количество пор, которые необходимы для обеспечения адгезии клеточного материала. Детальное исследование пористости образцов методом капиллярной адсорбции-десорбции азота показало следующие результаты. Средний диаметр пор для образцов на основе ОУНТ составил 10...20 нм, а для образцов на основе МУНТ это значение было почти в три раза выше – 40...60 нм. При этом удельный объем пор у образцов на основе ОУНТ был выше (0,005 мл/г), чем у образцов на основе МУНТ (0,0033 мл/г).

Результаты

Для определения биологических характеристик синтетической конструкции с композитным нанопокрyтием была исследована пролиферативная активность клеток соединительной ткани – фибробластов человека (ФЧ) в присутствии образцов. В качестве образцов были выбраны фрагменты синтетической

конструкции размером 1 × 1 см с композитным нанопокрyтием и без него.

После изготовления образцов следовала их стерилизация под УФ-излучением в течение 1 ч. На образцы была колонизирована культура клеток ФЧ, которые затем инкубировались в питательной среде ДМЕМ (модифицированная по способу Дульбекко среда Игла) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. Инкубация проводилась с использованием фотоколориметрических культуральных планшетов в термостате при 37 °С в течение 72 ч в условиях насыщающей влажности в атмосфере с 5%-ным уровнем CO₂.

Колонизацию клеток ФЧ осуществляли на поверхности и между синтетических волокон ПЭТФ, а анализ результата данной процедуры проводили с помощью флуоресцентной микроскопии. К клеткам на образцах синтетической конструкции добавляли флуоресцеиндиацетат (ФДА) до конечной концентрации 25 мкг/мл, далее – бромистый этидий (EtBr) до конечной концентрации 1 мкг/мл, и происходила инкубация в течение 5 мин при температуре 37 °С. Затем клетки три раза промывали средой без телячьей сыворотки и исследовали при помощи флуоресцентного микроскопа «Olympus BX43» с красно-оранжевым фильтром TRITC (CY3). Полученные изображения конвертировали в рисунки с оттенками серого, в результате чего наблюдались окрашенные ядра клеток ФЧ на поверхности образца и между волокон ПЭТФ (рис. 3).

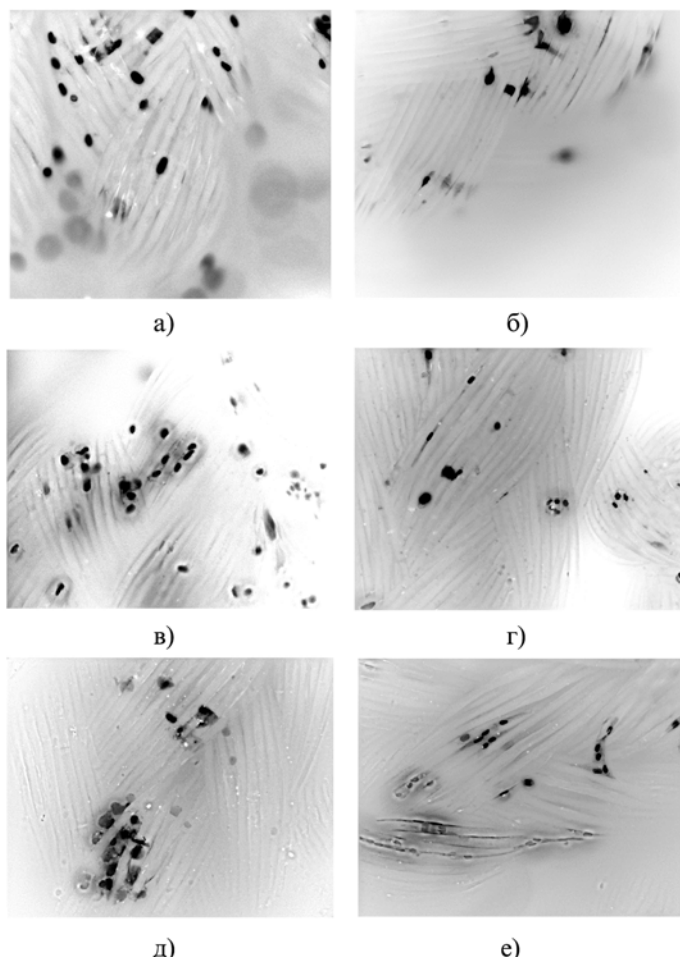


Рис. 3. Изображения флуоресцентной микроскопии окрашенных ФЧ, колонизированных на поверхности и между волокнами ПЭТФ синтетической конструкции (а), (б) и конструкции с композитным нанопокрyтием на основе ОУНТ (в), (г), МУНТ (д), (е) после 24 (а), (в), (д) и 96 (б), (г), (е) часов инкубации клеток

Неоднородная структура исследуемых образцов по высоте делает невозможным фокусировку объектива микроскопа на всей плоскости объекта. После проведения последовательного анализа всей поверхности образцов можно сделать вывод о пролиферативной активности клеток на всех образцах. Как

видно из рис. 3, наибольшая активность клеток наблюдалась спустя 24 ч инкубирования. Наибольшее количество клеток было колонизировано на образце синтетической конструкции с композитным нанопокрытием на основе ОУНТ, однако распределение клеток на всех образцах было неоднородным и отличалось незначительно. Через 96 ч инкубирования наблюдалось снижение пролиферативной активности ФЧ, наибольшее количество клеток при этом находилось на образце с покрытием на основе МУНТ. Наименьшее число клеток для двух периодов инкубирования было обнаружено на образце без покрытия.

Пролиферативная активность клеток ФЧ оценивалась с помощью фотокolorиметрического МТТ-теста [11]. МТТ-тест заключается в окрашивании живых клеток кристаллами желтого тетразола (МТТ) и восстановлении в них пурпурного формазана. Анализ оптической плотности полученной среды позволил оценить выживаемость клеток, колонизированных на конструкцию, и следовательно, определить ее цитотоксичность.

Для определения количества клеток, пролиферировавших на образцах, в культуральную среду добавляли раствор МТТ до конечной концентрации 0,25 мг/мл. Инкубировали в течение 3 ч при описанных условиях, после чего культуральную среду удаляли и клетки промывали раствором фосфатного буфера. Далее к образцам добавляли 100 мкл диметилсульфоксида и инкубировали еще в течение 30 мин. Подобная методика позволяет полностью экстрагировать краситель из клеток. Определение абсолютного значения количества клеток ФЧ осуществлялось с помощью счетчика «Scepter 2,0» с сенсорными наконечниками.

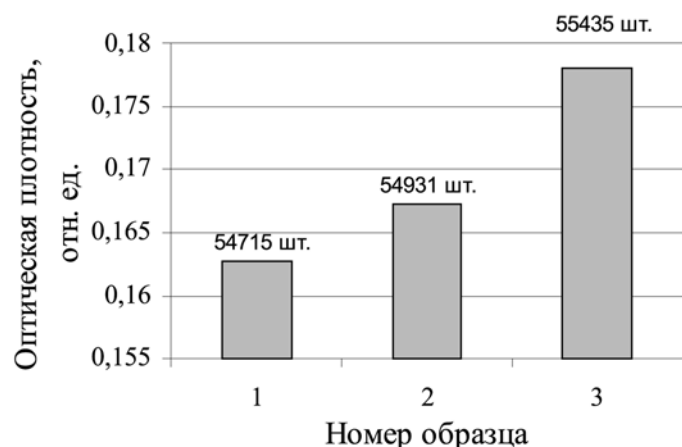


Рис. 4. Диаграмма средних значений оптической плотности образцов синтетических конструкций (1) и конструкций с композитным покрытием на основе ОУНТ (2) и МУНТ (3)

Определение оптической плотности проводили с помощью микропланшетного фотометра «Immunochem-2100». Для возбуждения среды использовали длину волны 545 нм, что обусловлено первым пиком поглощения на электронном спектре МТТ. На диаграмме (рис. 4) представлены средние значения оптической плотности для экспериментальных образцов синтетической конструкции с композитным нанопокрытием на основе ОУНТ (2), МУНТ (3) и контрольного образца без покрытия (1).

Из рис. 4 видно, что наилучшая пролиферация клеток наблюдалась на образцах синтетической конструкции с композитным нанопокрытием. Рост ФЧ в отличие от контрольного образца (54 715 шт. ФЧ) на образцах с покрытием на основе ОУНТ и МУНТ составил 54 931 и 55 435 шт. ФЧ соответственно. Получено, что покрытие на основе МУНТ обеспечило наибольшее значение выросших клеток. Такие данные, по всей видимости, связаны с тенденцией клеточных отростков фибробластов крепиться к наиболее пористой поверхности покрытия – такой, как на основе МУНТ. Выживаемость клеток на образце с покрытием на основе ОУНТ составила на 2,7% больше, чем для образца без покрытия, в то время как выживаемость

клеток на конструкции с покрытием на основе МУНТ на 8% превысила выживаемость на образце без покрытия. Такой результат говорит о способности нанопокрытия обеспечивать наилучшую адгезию и рост клеток.

Заключение

Разработан метод изготовления имплантата связки коленного сустава на основе синтетической конструкции из волокон ПЭТФ с нанесенным композитным нанопокрытием. Покрытие представляет собой водно-альбуминовую дисперсию УНТ и наносится на синтетические волокна с помощью ультразвукового воздействия. Фиксация покрытия осуществляется методом лазерного испарения жидкостного компонента. При этом электрическое поле излучения способствует самоорганизации нанотрубок в каркас. Испарение жидкости приводит к образованию пор в покрытии, средний диаметр пор для образцов на основе ОУНТ составил 10...20 нм, а для образцов с МУНТ это значение почти в три раза выше – 40...60 нм. Как показали *in vitro* исследования активности клеток ФЧ, при их колонизации на поверхность и между синтетических волокон наибольшее значение пролиферации ФЧ наблюдалось на образцах синтетической конструкции с композитным нанопокрытием на основе МУНТ и составило 55 435 шт. в отличие от покрытия на основе ОУНТ и контрольного образца, о чем свидетельствуют результаты МТТ-теста. Таким образом, можно сделать вывод о наилучшей адгезии и росте фибробластов в присутствии композитного нанопокрытия на основе МУНТ, имеющего наибольший размер пор среди исследуемых образцов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение 14.575.21.0089, RFMEFI57514X0089).

Список литературы:

1. Mall N.A., Chalmers P.N., Moric M., Tanaka M.J., Cole B.J., Bach B.R. Jr, Paletta G.A. Jr. Incidence and trends of anterior cruciate ligament reconstruction in the United States // *Am. J. Sports Med.* 2014, Oct. Vol. 42 (10). PP. 2363-2370.
2. Shafizadeh S., Jaeger V., Otchewmah R., Banerjee M., Naendrup J.H. Current status of ACL reconstruction in Germany // *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 2016 (in press).
3. Jiang J., Wan F., Yang J., Hao W., Wang Y., Yao J., Shao Z., Zhang P., Chen J., Zhou L., Chen S. Enhancement of osseointegration of polyethylene terephthalate artificial ligament by coating of silk fibroin and depositing of hydroxyapatite // *Int. J. Nanomedicine.* 2014 Sep. Vol. 29. № 9. PP. 4569-4580.
4. Mooney D.J., Mikos A.G. Growing new organs // *Scientific American.* 1999. Vol. 280. PP. 38-43.
5. Peters M.C., Mooney D.J. Synthetic extracellular matrices for cell transplantation // *Materials science forum.* 1997. Vol. 250. PP. 43-52.
6. Fomin A., Dorozhkin S., Fomina M., Koshuro V., Rodionov I., Zakharevich A., Petrova N., Skaptsov A. Composition, structure and mechanical properties of the titanium surface after induction heat treatment followed by modification with hydroxyapatite nanoparticles // *Ceramics International.* 2016. Vol. 42. № 9. PP. 10838-10846.
7. Hirata E. et al. Development of a 3D collagen scaffold coated with multiwalled carbon nanotubes // *Journal of Biomedical Materials Research. Part B: Applied Biomaterials.* 2009. Vol. 90. № 2. PP. 629-634.
8. Di Martino A., Sittinger M., Risbud M.V. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering // *Biomaterials.* 2005. Vol. 26. № 30. PP. 5983-5990.
9. Abattategi A., Gutierrez M.C., Moreno-Vicente C., Hortiguera M.J., Ramos V., Lopes-Lacomba J.L., Ferrer M.L., Monte F. Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes // *Biomaterials.* 2008. Vol. 29. PP. 94-102.

10. Gerasimenko A. Y., Pavlov A. A., Podgaetsky V. M., Savelyev M. S., Tereshenko S. A. Research on limiting of high power laser radiation in nonlinear nanomaterials // Proc. of SPIE. 2014. Vol. 9237. PP. 923712-1-923712-15.
11. Wilson A. P. Chapter 7: Cytotoxicity and viability. In: Animal Cell Culture: A Practical Approach / Masters J.R.W. 3rd. – Oxford: Oxford University Press, 2000. Vol. 1.

Александр Юрьевич Герасименко,
канд. физ.-мат. наук, ст. научный сотрудник,
Наталья Николаевна Журбина,
инженер,
Ульяна Евгеньевна Курилова,
инженер,
Леван Павлович Ичкитидзе,
канд. физ.-мат. наук, ст. научный сотрудник,
Сергей Васильевич Селищев,
д-р физ.-мат. наук, профессор,
зав. кафедрой,
Виталий Маркович Подгаецкий,
д-р физ.-мат. наук, гл. научный сотрудник,
кафедра биомедицинских систем,
Национальный исследовательский университет «МИЭТ»,
г. Москва, г. Зеленоград,

Ирина Александровна Суетина,
канд. биол. наук, вед. научный сотрудник,
Марина Владимировна Мезенцева,
д-р биол. наук, руководитель,
лаборатория культур тканей,
Федеральный научно-исследовательский центр
эпидемиологии и микробиологии им. почетного
академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ,
Леонид Иванович Руссу,
научный сотрудник,
Вадим Владимирович Зар,
канд. мед. наук, вед. научный сотрудник,
травмотологическое отделение,
Московский областной научно-исследовательский
клинический институт им. М.Ф. Владимирского,
г. Москва,
e-mail: gerasimenko@bms.zone

А.А. Бурмака, К.В. Разумова, Н.А. Милостная, Р.А. Крупчатников

Автоматизированная обработка ультразвуковых изображений предстательной железы

Аннотация

Предложена методика построения функциональных моделей и их структурного представления для основных этапов автоматизированного анализа изображений УЗИ и ТРУЗИ состояния предстательной железы с целью повышения качества и оперативности диагностики прогнозирования и лечения заболевания.

Введение

Для диагностики состояния предстательной железы мужчины [1]-[3] и успешности последующего лечения ее заболевания важное значение имеют ультразвуковое (УЗИ) и трансректальное исследование (ТРУЗИ) и соответственно визуальное представление полученной информации для целей последующего анализа. В настоящее время принято измерять линейные параметры ПЖ (толщина, длина, ширина, объем) [1], [2], [4].

Различие методик измерения, индивидуальные и возрастные особенности пациентов обуславливают большой разброс данных [1], [2], [5], что затрудняет, в частности, компьютерный анализ изображений результатов УЗИ и ТРУЗИ, их формирование и последующую идентификацию.

Эти анатомические зоны как элементы строения простаты имеют важное клиническое значение, поэтому их достоверность выделения и идентификация являются важной частью процесса диагностирования состояния предстательной железы по ее стандартным изображениям.

Системная обработка априорных данных, создание проблемно-ориентированных базы данных и базы знаний позволяют использовать их при оснащении автоматизированных рабочих мест (АРМ) врача-специалиста в области урологии, хирургии и терапевтического лечения. Это становится возможным при решении задач классификации, алгоритмической и программной реализации основных этапов обработки визуальной информации, полученной в результате УЗИ и ТРУЗИ, сжатия этой информации и представления ее в виде, удобном для автоматизации процессов распознавания состояния ПЖ, прогнозирования развития заболевания, определения приемов и методов лечения, успешности лечения – все это при использовании сформированной априорной информации в виде базы данных и базы знаний.

Методика и материалы

Концептуальная модель процедур, позволяющих в результате УЗИ и ТРУЗИ определить пространство признаков и характеристик для диагностики текущего состояния ПЖ и идентификации характера и вида заболевания, может быть построена, как показано на рис. 1. В отдельные подмножества выделены количественные и качественные признаки (параметры, характеристики), с учетом которых построена структурная модель исследования ПЖ и ее различных зон в здоровом состоянии и при патологии. Статичные изображения простаты в различных сечениях в дальнейшем в автоматизированном режиме подвергаются специальной обработке. Структурная модель представлена на рис. 2. Эти модели являются основой



Рис. 1. Концептуальная модель формирования признаков и характеристик ПЖ