

ПРОТОКОЛ
ИЗУЧЕНИЕ ОБЛАСТИ ИМПЛАНТАЦИИ (ИМПЛАНТАЦИОННЫЙ ТЕСТ)

Заказчик: ЗАО "Научный Центр "БИОФОРМ".

Исполнитель: Лаборатория экспериментальной патоморфологии Московской медицинской академии им. И.М.Сеченова.

Объект испытаний: Материал-биополимер водосодержащий с ионами серебра "АРГИФОРМ".

1. Местное действие материала после имплантации (имплантационный тест) исследовали, руководствуясь ГОСТ Р ИСО 10993.6 -99 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследование местного действия после имплантации».

Животных в эксперименте содержали, руководствуясь ГОСТ Р ИСО 10993.2-99 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Положения об охране животных».

Образцы: материал представлен в стерильном виде. Одноразовые инъекционные пластиковые шприцы, заполненные материалом "АРГИФОРМ", закупоренные пробками и запаянные в индивидуальный блистер. Блистер со шприцем, в комплекте с иглой для инъекций, упакованы в индивидуальные фирменные картонные коробки. На коробках типографским способом нанесена маркировка, наименование материала и торговый знак.

2. Описание и результаты исследования

Проводилось гистологическое изучение тканей скакательного сустава кролика после внутрисуставного введения материала "Аргиформ"

2.1. Описание эксперимента

Эксперименты проведены на 20 кроликах. Материал в объеме 1 мл вводился в суставную полость правого скакательного сустава, контролем служил левый интактный сустав. Кролики выводились из опыта на 1,3,7,10,14 сутки и через 1, 3, 6, 12 и 14 месяцев после введения. Вскрывался сустав, ткани на гистологическое и гистохимическое исследование брались из синовиальной оболочки и суставного хряща, фиксировались в 70° спирте и заливались в парафин. Срезы толщиной 4-5 мк окрашивались гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону, толуидиновым синим на кислые гликозаминогликаны (ГАГ), PAS-реакцией на гликопротеины и реакцией Браше на РНК. В качестве контроля брались ткани интактного симметричного сустава.

Для цитологического исследования делались мазки содержимого суставной полости (материала и синовиальной жидкости). Мазки фиксировались в 96° спирте, окрашивались по Романовскому-Гимза, вычислялось процентное соотношение клеток различного типа. Цитологическое исследование проводилось от 1 суток до 6 месяцев, а гистологическое от 1 суток до 14 месяцев после введения материала.

2.2. Результаты

2.2.1 Макроскопическое изучение

При вскрытии интактных суставов в их полости обнаруживается небольшое количество прозрачной синовиальной жидкости умеренной вязкости.

Синовиальная оболочка у кроликов имеет жировую структуру.

Суставной хрящ тонкий, белесоватый, поверхность его гладкая, блестящая.

Через 1 сутки после введения материала суставная полость содержит прозрачную субстанцию, в которой материал и синовиальная жидкость представляет собой единый субстрат.

Вязкость этой субстанции выше, чем у синовиальной жидкости и приближается к вязкости исходного испытуемого материала.

Синовиальная оболочка не гиперимирована, имеет обычную структуру, хрящевая пластинка не изменена.

Через 3 суток полость сустава также содержит вязкую и прозрачную субстанцию.

Отсутствие помутнения этой субстанции, а также гиперемии и отека синовиальной оболочки свидетельствует об отсутствии видимой воспалительной реакции.

Через 7-14 суток количество материала в суставной полости уменьшается, вязкость его снижается.

Синовиальная оболочка и хрящ по-прежнему не имеют признаков патологических изменений.

Через 1-14 месяцев содержание полости суставов, в которые вводился материал, не отличается от интактных симметричных суставов.

То же относится к синовиальной оболочке и хрящу.

2.2.2. Цитологическое и гистологическое исследование.

Цитологически через 1-3 суток после введения материал сохранял гомогенность, но с 7 суток в нем усиливается вакуолизация и фибрилизация, что свидетельствует о начинающемся лизисе материала.

Резорбция материала в основном осуществляется синовиоцитами. В норме синовиоциты (кроющие клетки синовиальной оболочки) состоят из двух популяций: А-клетки макрофагального генеза и В-клетки фибробластического генеза.

По данным цитологического исследования (таблица №1) фагоцитоз материала начинается уже на 1 сутки, усиливается на 7-14 сутки и осуществляется в основном А-клетками, выселяющимися в полость сустава, и в значительно меньшей степени макрофагами гематогенного происхождения (из моноцитов крови).

Фагоцитирующие клетки, которые в интактных суставах представлены только 0,7% клеток, на 1-14 сутки после введения материала составляют более 70% всех клеток. Затем содержание их снижается, но и через 6 месяцев имеется еще 21,4% этих клеток.

На всех сроках фагоцитирующие синовиоциты значительно превосходят в количестве фагоцитирующих макрофагов гематогенного генеза.

Нейтрофильные лейкоциты в мазке, в норме составляющие 0,7% всех клеток, через 1-3 сутки после введения геля незначительно увеличивается до 3,3 и 3,1%.

Это говорит о том, что асептическая воспалительная реакция синовиальной оболочки на введение материала выражена очень слабо и быстро нивелируется: через 14 суток нейтрофилы составляют 1,3%, а через 1 месяц-0,9%.

Содержание лимфоцитов практически не меняется.

Нефагоцитирующие макрофаги незначительно увеличиваются только в сроки от 1 до 7 суток.

Таблица №1

Процентное содержание клеток в мазках синовиальной жидкости сустава.

Клетки	Контроль	Опыт						
		1 сутки	3 суток	7 суток	14 суток	1 месяц	3 месяца	6 месяцев
1.Синовиоциты нефагоцитирующие	91,8 %	7,8%	2,8%	19,8%	22,4%	51,2%	64,5%	70,8%
2.Моноцитоподобные макрофаги	2,7%	8,1%	4,1%	4,0%	3,2%	8,3%	3,4%	2,9%
3.Фагоцитирующие клетки (общий %)	0,7%	76,3%	85,8%	70,4%	70,1%	34,9%	27,1%	21,4%
3а. Синовиоциты	0,7%	58,2%	74,2%	62,3%	57,9%	27,8%	22,9%	18,3%
3б. Макрофаги	0%	18,1%	11,6%	8,1%	12,2%	7,1%	4,2%	3,1%
4. Лимфоциты	4,0%	4,5%	4,2%	3,1%	3,0%	4,7%	4,2%	4,0%
5. Нейтрофилы	0,7%	3,3%	3,1%	2,7%	1,3%	0,9%	0,8%	0,9%
Количество клеток в поле зрения	2,5 ед.	16,6 ед.	18,4 ед.	8,5 ед.	6,5 ед.	5,4 ед.	2,9 ед.	2,7 ед.

После введения материала общее число клеток в мазках значительно возрастает: через 1-3 суток 16,6 и 18,4 клетки соответственно, в интактных суставах в среднем 2,5 клеток в поле зрения.

Этот рост идет преимущественно за счет фагоцитирующих синовиоцитов. К 7 и 14 суткам количество клеток уменьшается (8,5 и 6,5 соответственно), а к 1-3 месяцам нормализуется, что связано с завершением фагоцитоза материала.

3. Заключение по имплантационному тесту при внутрисуставной имплантации материала

Гистологическое и гистохимическое исследование подтверждает и дополняет цитологические данные.

Через 1-3 суток в синовиальной оболочке не обнаруживаются заметных воспалительных изменений. Отсутствует отек и сосудистая реакция, характерная для синовита. Нейтрофильная инфильтрация минимальна. Тканевая реакция на введение материала заключается в очаговой гиперплазии синовиоцитов, в основном за счет макрофагальных А-клеток, участвующих в фагоцитозе материала.

На 3 суток формируются небольшие участки утолщения слоя синовиоцитов (кроющего слоя), которые увеличиваются в объеме к 7 суткам. В этих участках происходит резорбция материала, образуются пенные клетки. Однако воспалительная реакция не усиливается.

В последующие сроки (от 10 суток до 3-х месяцев) у большинства животных структура синовиальной оболочки постепенно полностью нормализуется, но у отдельных животных выявляются небольшие участки гиперплазии слоя синовиоцитов с резорбцией там материала. Через 6 месяцев у одного животного выявлялись небольшие участки фиброза поверхностного слоя синовиальной оболочки. Через 14 месяцев никаких изменений в синовиальной оболочке по сравнению с контрольными суставами обнаружено не было.

Следует отметить, что гистохимическое исследование во все сроки наблюдения не выявило изменений содержания РНК и синтеза кислых ГАГ в синовиоцитах, что свидетельствует о полной сохранности их биосинтетической функции.

Суставной хрящ во все сроки наблюдения по структурным и гистохимическим особенностям не имел никаких отличий от хряща интактных суставов. Учитывая, что питание хрящевой ткани частично осуществляется через диффузию веществ из синовиальной жидкости, отсутствие дистрофических изменений в хряще свидетельствует о том, что введение материала в суставную полость не отражается на ее метаболизме.

Таким образом, внутрисуставное введение материала “Аргиформ” даже в большом объеме не приводит к развитию воспалительного процесса в синовиальной оболочке (синовита) и дистрофического процесса в хрящевой ткани. Тканевая реакция на введение материала в сустав минимальна и сводится, в основном, к гиперплазии и выселению в суставную полость синовиоцитов типа А (макрофагального генеза), осуществляющих постепенную резорбцию материала.

С синовиальной жидкостью материал, по-видимому, образует комплексное соединение, которое не ухудшает метаболизм суставных тканей.

Заведующий лабораторией
экспериментальной патоморфологии
ММА им. И.М. Сеченова, д.м.н., профессор



А.Б. Шехтер