

УДК 615.1/.4

Оценка показателей крови при исследовании свойств биodeградируемых сосудистых стентов

**А.Н. Оганесян, А.Г. Карапетян, А.М. Даллакян,
Ж.Г. Петросян, Н.К. Арутюнян**

*Научный центр радиационной медицины и ожогов МЗ РА
0054, Ереван, Давидашен, п/я 25*

Ключевые слова: коронарные сосудистые стенты, биodeградация, показатели периферической крови, методы системного анализа

К современным методам лечения различных заболеваний сердечно-сосудистой системы относят установку коронарных и сосудистых стентов. Стенты применяются, в основном, в сосудистой хирургии для расширения диаметра артерий и восстановления по ним нормального кровотока. К стентам предъявляются следующие требования: высокая гибкость (для легкого продвижения по кровеносной системе к месту установки), высокая пластичность (для обеспечения возможности увеличения диаметра стента до необходимого размера в месте установки), высокие прочность и жесткость (для обеспечения радиальной устойчивости в процессе эксплуатации), высокая рентгеноконтрастность (для хорошей видимости в ангиографе и рентгеновском томографе), биосовместимость с организмом (для предотвращения возможных реакций отторжения стента). Основными используемыми материалами для производства металлических стентов являются нержавеющая сталь (316L, SS, 03X17H14M3), платиноиридиевые сплавы, тантал, нитинол, кобальтохромные сплавы, титан и его сплавы. Чистое железо и магниевые сплавы являются перспективными материалами для стентов [3].

Все вышеперечисленные материалы, наряду с преимуществами, имеют недостатки, которые ограничивают их клиническое применение. Так, недостатками нержавеющей стали являются ферромагнитная природа и низкая плотность, что делает сталь плохо видимой в рентгеновском излучении и магнитно-резонансной томографии [7]. Импланты из нержавеющей стали могут вызывать аллергию на никель. В частности, присутствие ионов никеля, хрома и молибдена вызывают местные иммунные реакции и воспаление. Платиноиридиевые сплавы имеют высокую коррозионную стойкость, но низкие механические свойства. В процессе

исследования этих стентов наблюдались незначительное тромбообразование, разрастание неоинтимы, незначительные воспалительные реакции. Процент отторжения этих стентов выше, чем у стентов из нержавеющей стали.

Танталовые стенты имеют высокую вероятность поломки во время развертывания. Давление развертывания этих стентов низкое и может привести к смещению стента и сильному разрастанию клеток интимы, вследствие раздражения внутренней стенки сосудов (артерий) [8].

У железа самый высокий модуль эластичности из металлов, используемых для стентирования. Предел текучести и предел прочности близки друг к другу, что теоретически может привести к разрушению конструкции при развертывании. Однако испытания на животных (кроликах) показали, что такие стенты успешно устанавливаются в артерии с давлением (расширяющим баллоны) от 2,5 до 10 атмосфер. Для наблюдения установки таких стентов используется рентген. Биоразложение предполагает окисление железа и растворение его в биологической среде. Железо – элемент, абсолютно необходимый для жизни, суточная потребность человека в нем составляет до 18мг. Двухвалентные ионы железа замедляют разрастание тканей [7]. Железные стенты легче развернуть без флуороскопической визуализации [6], они прочнее полимерных биodeградируемых стентов. Все эти преимущества позволяют продолжать поиск и исследование свойств именно железных стентов с умеренной и однородной деградацией для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы. В последних исследованиях предпочтение отдают электроформованному железу как потенциальному материалу для изготовления деградируемых коронарных стентов [4,5].

При изучении биodeградации железного стента необходимо учитывать не только содержание железа в организме (недостаток железа проявляется анемией, а избыток – оказывает токсическое действие) или в крови, но и те изменения в периферической крови, которые сопровождают процесс деградации.

Материал и методы

В настоящей работе были изучены изменения показателей крови после имплантации стентов из чистого железа. В эксперименте использовали индустриальное чистое железо 99,9% и электроформованное железо. Из железного слитка (Ереванский завод чистого железа) получена фольга толщиной 180-260мкм. Электроформованное железо получали методом электрохимического осаждения (толщина 50-100мкм). Было изучено также влияние железного стента, покрытого полимером. Оценку биологического действия проводили в соответствии с рекомендациями ГОСТ

РИСО 10993.6-99 Часть 6. «Исследование местного действия после имплантации».

В качестве экспериментальных животных использованы белые нелинейные крысы массой 180-200 г. Имплантанты после стерилизации помещали в трапециевидную мышцу спины, мышцу (бицепс) бедра и хвостовую вену крыс. Имплантационный период составлял от 1 недели до 1 года. Проводили оценку следующих показателей периферической крови: время свертываемости крови, количество лейкоцитов, тромбоцитов, эритроцитов и содержание гемоглобина.

Статистическая обработка цифрового материала проведена с помощью методов системного анализа (регрессионный и дискриминантный). Были использованы компьютерные программы, предназначенные для статистической обработки массивов цифровых данных: электронная таблица Microsoft Excel и специализированные статистические пакеты Statsoft, SPSS-6 и StatGraphics Plus [1,2].

Результаты и обсуждение

Биологическую реакцию оценивали по изменению показателей крови, а деградацию образцов – по потере веса за имплантированный период.

Таблица 1

Уровень деградации стенового образца

Образцы	Место имплантации	Срок имплантации (мес.)	Деградация (%)	Деградация за 1 мес. (%)
Индустриальное чистое железо				
Fe вальцов. из бруска №3 (фольга)	спинная мышца	2	6	3
Электроформованные				
Ер №11 (фольга)	спинная мышца	2	4,8	2,4
Ер №12 (фольга)	бедренная мышца	2	16,7	8,35
Ер-1 (трубка)	бедренная мышца	12	5	0,42
Ер/с (фольга)	хвостовая вена	3	100	33,33
СМ-1-100 (трубка)	хвостовая вена	3	3,5	1,17

Из табл. 1 видно, что электроформованные (предлагаемые нами) образцы деградируют раньше изготовленных из индустриального железа, что говорит о правильном выборе технологии. Из представленной таблицы заметно также, что темп деградации железа зависит не только от технологии изготовления, но и от места имплантации (раньше всех деградирует железо, имплантируемое в хвостовую вену). Поэтому мы в соответствии с местом имплантации полученные результаты условно разделили на 3 группы (табл. 2).

Таблица 2

Показатели крови после имплантации

Образцы	Время свертывания крови (сек.)	Лейкоциты (N/ μ L)	Тромбоциты (N/ μ L)	Эритроциты (N/ μ L)	Гемоглобин (g/L)
Контроль	337,2 $\pm$ 7,00	10896,7 $\pm$ 184,66	417777,8 $\pm$ 73816,17	5299944,4 $\pm$ 187489,38	145,4 $\pm$ 3,62
(1) Fe вальцов. из бруска №3	365,0 $\pm$ 31,75	10666,67 $\pm$ 1041,37	523333,33 $\pm$ 17638,34	5106666,67 $\pm$ 216743,58	154,0 $\pm$ 3,06
(2) Ер №11	337,5 $\pm$ 32,5	10200,0 $\pm$ 400,0	500000,0 $\pm$ 40000,0	5075000,0 $\pm$ 105000,0	135,5 $\pm$ 7,5
(3) Ер №12	393,33 $\pm$ 31,38	11233,3 $\pm$ 826,99	558333,33 $\pm$ 41506,36	5898333,33 $\pm$ 255504,95	135,32 $\pm$ 5,21
(4) Ер-1	335,0 $\pm$ 27,42	11466,67 $\pm$ 494,41	508333,33 $\pm$ 25744,47	5226666,67 $\pm$ 152570,57	139,33 $\pm$ 2,55
(5) Ер/с	343,33 $\pm$ 28,71	10366,67 $\pm$ 1008,52	483333,33 $\pm$ 15634,72	5880000,0 $\pm$ 392759,47	148,53 $\pm$ 7,63
(6) СМ-1-100	329,00 $\pm$ 38,16	12080,0 $\pm$ 636,35	501000,0 $\pm$ 14866,07	5958000,0 $\pm$ 382121,86	158,46 $\pm$ 6,55

В первую группу вошли животные с имплантатами в спинной мышце (1) и (2), во вторую – в бедренной мышце (3) и (4), в третью – в хвостовой вене (5) и (6). В табл. 2 приведены средние значения исследованных нами показателей периферической крови (включая контрольные значения), полученные после внедрения имплантантов в конце исследования.

По всем исследуемым нами показателям периферической крови достоверных различий с контрольными значениями мы не обнаружили. Обнаружены лишь межгрупповые различия уровня лейкоцитов при сравнении имплантированных образцов (2) и (4) ($p < 0,05$); (2) и (6) ($0,01 < p < 0,02$); эритроцитов (2) и (3) ($0,002 < p < 0,01$); (2) и (6) ($0,02 < p < 0,05$); гемоглобина (3) и (6) ($0,002 < p < 0,01$); (3) и (1) ($0,002 < p < 0,01$), что свидетельствует о разных механизмах действия различных образцов на кровяную систему.

Было выявлено достоверное различие, по сравнению с контрольной группой, уровня лейкоцитов на ранней стадии исследования (до 7 дней). Как видно из табл. 2, значимых различий между контрольными и экспериментальными значениями показателей крови не наблюдается, что свидетельствует об отсутствии негативных проявлений внедрения имплантантов (о нейтральности и нетоксичности имплантированных изделий). Тем не менее существует незначительное различие в изменении изучаемых нами показателей в начальной стадии – до нормализации показателей периферической крови на 7-е сутки. Нормализация происходит или в сторону уменьшения (например, время свертывания крови при имплантации образцов (2) и (6)), или – увеличения того или иного показателя (например, время свертывания крови при имплантации образцов (1,3,4,5)). Для описания динамики изменения этих показателей мы применили

регрессионный анализ. В табл. 3 представлена динамика изменения показателей периферической крови с помощью соответствующих теоретических кривых.

Таблица 3

Описание динамики изменения показателей периферической крови с помощью формулы регрессионного анализа

Образцы	Время свертывания крови (сек.)	Лейкоциты (N/ μ L)	Тромбоциты (N/ μ L)	Эритроциты (N/ μ L)	Гемоглобин (g/L)
(1)	$y_1=342,548+5,71\lg(x)$	$y_1=10509,099+66,39\lg(x)$	$y_1=473720+13967,03\lg(x)$	$y_1=5095800+2972,445\lg(x)$	$y_1=153,28e^{0,0002x}$
(2)	$y_2=348,27-4,49\lg(x)$	$y_2=11004,83e^{-0,0001x}$	$y_2=475660+5007,447\lg(x)$	$y_2=5152400e^{0,0004x}$	$y_2=135,83e^{0,0002x}$
(3)	$y_3=350,327+3,879\lg(x)$	$y_3=10850,57e^{-0,0008x}$	$y_3=524880e^{-0,0015x}$	$y_3=5862800-19251\lg(x)$	$y_3=136,48-0,29\lg(x)$
(4)	$y_4=357,14e^{0,000066x}$	$y_4=11414,43e^{-0,00026x}$	$y_4=493020e^{-0,0012x}$	$y_4=4893000+16080\lg(x)$	$y_4=146,28e^{-0,0003x}$
(5)	$y_5=330,82+0,37\lg(x)$	$y_5=11241,88e^{-0,0005x}$	$y_5=495190+185,33\lg(x)$	$y_5=5178500e^{0,0002x}$	$y_5=142,19-0,026\lg(x)$
(6)	$y_6=339,52e^{-0,0007x}$	$y_6=12232,32e^{-0,0016x}$	$y_6=515690e^{-0,0007x}$	$y_6=5936200e^{0,0005x}$	$y_6=144,8+0,15\lg(x)$

При статистическом анализе данных нами было обнаружено, что из применяемых в настоящее время моделей, для описания динамики изменения уровня этих показателей, наиболее подходят логарифмическая и экспоненциальная. В приведенных уравнениях логарифмической и экспоненциальной регрессии x – временной интервал (количество дней исследования), а y – уровень соответствующего показателя периферической крови. Эта формула позволяет не только получить прогноз при экстраполяции, но и, интерполируя, получить теоретическую часть кривой, которая характеризует уровень этих показателей в любом временном отрезке (в том числе на том интервале, когда исследования не проводились).

Необходимо отметить, что нормализация показателей периферической крови происходит по-разному и в случае сравнения с имплантированными стентами: железными и с полимерными покрытиями. Основываясь на этом факте, мы решили использовать метод дискриминантного анализа (с целью классификации), позволяющий получить распределение по группам животных с различными имплантированными стентами (с железными и с полимерным покрытием) на основе распознавания (диаграмма рассеяния дискриминантных функций представлена на рисунке).

На рисунке приводятся результаты дискриминантного анализа животных. Предикторами (признаками распознавания) классификации служили 3 показателя периферической крови: время свертывания крови, количество лейкоцитов и тромбоцитов. Цель анализа – выявить возможность разделения животных на этапе нормализации показателей периферической крови и классифицировать их по группам (в соответствии с типом стента). На рисунке показатели каждого животного представлены в виде отдельной «точки».

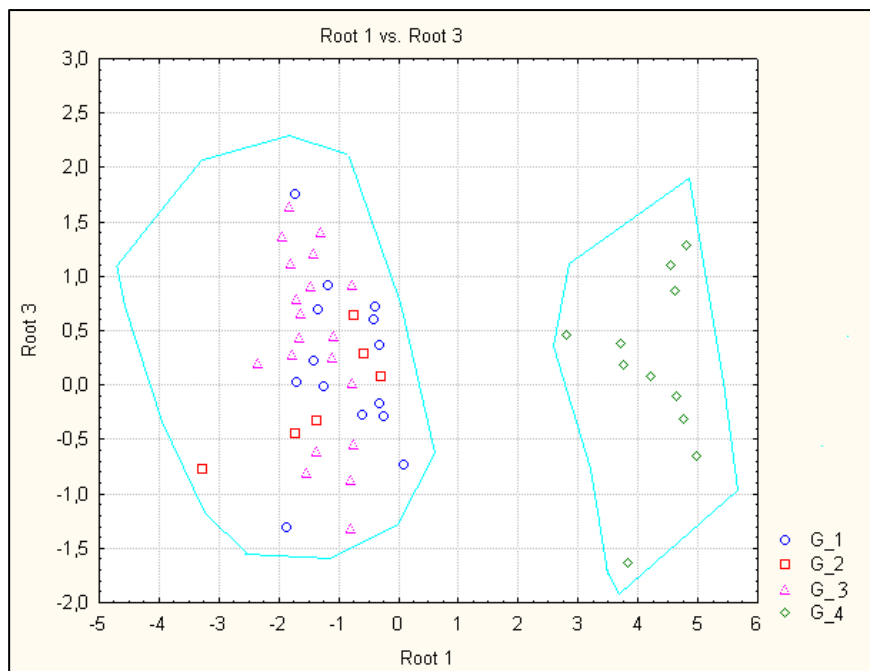


Рисунок. Классификация животных по групповой принадлежности к имплантированным стентам. Обозначения: Root 1, 3 – 1-й и 3-й корни (функции) дискриминации; G1, G2, G3 – группы животных, которым имплантированы железные стенты и G4 – стенты с полимерным покрытием

Интервалогаммы животных распределились обособленно друг от друга, составляя в пространстве дискриминантных функций относительно разграниченную, отдельную группу. Результаты дискриминантного анализа показали, что животные, имеющие отличительные признаки, распределились по 2 группам: с имплантированными железными стентами сформировали одну отдельную группу, а с полимерным покрытием – другую. Здесь наблюдается незначительное наложение групп животных, которым имплантированы железные стенты, что лишь подтверждает «родство» этих материалов. Полученные данные свидетельствуют о том, что у показателей периферической крови можно уловить даже незначительные сдвиги (при адаптации к определенному стенту) на этапе нормализации в условиях использования математического аппарата.

Таким образом, при изучении биodeградации железных стентов обнаружено, что электроформованные (предлагаемые нами) образцы деградируют раньше изготовленных из индустриального железа в заводских условиях, что говорит о правильном выборе нами технологии. Показано также, что темп деградации железа зависит не только от технологии из-

готовления, но и от места имплантации (раньше всех деградирует железо, имплантируемое в хвостовую вену).

В изменениях показателей периферической крови достоверного различия с контрольными значениями не обнаружено. Выявлены лишь межгрупповые различия уровня лейкоцитов при сравнении имплантированных образцов. Видимо, это связано с различием материалов, технологий или с типом нормализации, связанным с воздействием определенного стента. Только на ранней стадии (до 7 дней) было выявлено достоверное различие уровня лейкоцитов, по сравнению с контрольной группой, которое нормализовалось во всех группах спустя 7 дней.

Были получены формулы регрессионных кривых, описывающих изменения показателей периферической крови в динамике. Эти кривые позволяют проследить за процессом нормализации изучаемых показателей, дать прогноз изменений и получить теоретическое значение любого из 5 показателей, что позволит сравнить действие образцов на любом временном отрезке.

Хотя все исследуемые показатели крови достоверно не отличались от контрольных значений, тем не менее железные стенты на диаграмме рассеяния формировали одну отдельную группу, а стент с полимерным покрытием – другую. С помощью дискриминантного анализа показано, что существует различный механизм адаптации при имплантировании железных стентов и стентов с полимерными покрытиями.

Поступила 20.03.17

**Արյան ցուցանիշների գնահատումը կենսաքայքայվող
անոթային ստենտների հատկությունների
հետազոտման պայմաններում**

**Ա.Ն. Հովհաննիսյան, Ա.Գ. Կարապետյան, Ա.Մ. Դավաթյան,
Ժ.Հ. Պետրոսյան, Ն.Կ. Հարությունյան**

Հոդվածում նկարագրված է պերիֆերիկ արյան ցուցանիշների գնահատումը կենսաքայքայվող կորոնար և անոթային ստենտների հատկությունների հետազոտման ժամանակ: Հետազոտվել են հետևյալ ցուցանիշների փոփոխությունները՝ արյան մակարդման ժամանակը, թրոմբոցիտների, լեյկոցիտների, էրիթրոցիտների և հեմոգլոբինի մակարդակը, որոնք ուղեկցում են ստենտների քայքայման պրոցեսը:

Երկաթե ստենտների կենսաքայքայման ուսումնասիրման ժամանակ հայտնաբերվել է, որ մեր կողմից առաջարկվող՝ էլեկտրաֆորմովային նմուշները ավելի վաղ են քայքայվում, քան գործարանային պայմաններում պատրաստվածները, ինչը վկայում է մեր տեխնոլո-

գիայի ճիշտ ընտրման մասին: Ցույց է տրված նաև, որ երկաթի քայքայման արագությունը կախված է ոչ միայն պատրաստման տեխնոլոգիայից, այլ նաև իմպլանտացիայի հատվածից (առավել արագ դեգրադացիայի է ենթարկվում երկաթը, որը ներմուծվել է պոչի երակ):

Պերիֆերիկ արյան ցուցանիշների փոփոխություններում ստուգիչ խմբի նկատմամբ հավաստի տարբերություն չհայտնաբերեցինք: Գտել ենք միայն լեյկոցիտների մակարդակի տարբերություն տարբեր նմուշների իմպլանտացիայի դեպքում: Հնարավոր է, որ դա տեղի է ունենում տարբեր հյուսվածքների, տեխնոլոգիաների կամ ցուցանիշների նորմալացման տարբեր մեխանիզմների պատճառով: Հավաստի տարբերություն ստուգիչ խմբի համեմատ գտանք միայն լեյկոցիտների մակարդակի փոփոխման ժամանակ ամենավաղ ժամանակային փուլում՝ մինչև 7 օր, որը բոլոր խմբերում շատ կարճ ժամանակահատվածում վերականգնվեց:

Ստացվել են ռեզրեսիոն կորերի բանաձևեր, որոնք նկարագրում են պերիֆերիկ արյան ցուցանիշների փոփոխությունները դինամիկայում: Այդ կորերը թույլ են տալիս հետևել հետազոտվող ցուցանիշների նորմալացման պրոցեսին, կատարել փոփոխությունների կանխատեսում և ստանալ 5 ցուցանիշներից յուրաքանչյուրի տեսական արժեքը, ինչը հնարավորություն կտա համեմատել նմուշների ազդեցությունը յուրաքանչյուր ժամանակային հատվածում:

Չնայած, որ բոլոր արյան ցուցանիշները հավաստի չէին տարբերվում ստուգիչ արժեքներից, դիսկրիմինանտ վերլուծության ցրման դիագրամներում երկաթե ստենտները ձևավորել էին առանձին 1 խումբ, իսկ պոլիմերային ծածկույթով ստենտները՝ այլ խումբ: Դա վկայում է այն մասին, որ տարբեր՝ երկաթե և պոլիմերային ծածկույթով ստենտների իմպլանտացիայի դեպքում գոյություն ունեն ադապտացիայի տարբեր մեխանիզմներ:

Blood parameters evaluation at investigation of properties of biodegradable vascular stents

A.N. Hovhannisyan, A.G. Karapetyan, A.M. Dallaqyan, J.H. Petrosyan, N.K. Harutyunyan

The work is devoted to evaluation of peripheral blood parameters within the study of the properties of the biodegradable coronary and vascular stents. Changes in the peripheral blood (blood coagulation time, platelets, leukocytes, erythrocytes counts, and hemoglobin levels), which accompany the process of stents degradation, were investigated.

The study on biodegradable iron stents revealed that electroformed samples proposed by us degrade earlier than the samples made of commercial iron in factory conditions; this latter indicates to the correct choice of technology. It is also shown that the rate of iron degradation depends not only on technology, but also on the place of implantation: iron implanted into the caudal vein degraded at earlier stage.

As to the changes in the parameters of peripheral blood, no significant difference was revealed as compared to control values. Only intergroup differences in the level of leukocytes were revealed when the implanted samples were compared to each other. Apparently this is due to the difference in materials, technologies or the type of normalization associated with the impact of a particular stent. Only at an early stage (up to 7 days) a significant difference in the level of leukocytes was recorded, as compared to the control group; the parameter returned to norm in all groups after 7 days.

Formulas of regression curves describing changes in the parameters of peripheral blood in dynamics were obtained. These curves allow tracing the process of normalization of the studied parameters, to predict the changes, and get the theoretical value of any of the parameters and thus allow us to compare the effect of the samples at any time interval.

Although the investigated blood parameters did not differ significantly from the control values, on the scatterplot the iron stents formed one separate group, whereas the stents with polymer coverings formed another group. Using discriminant analysis it is shown that there is a different mechanism of adaptation at implantation of iron stents and stents with polymeric coverings.

Литература

1. Боровиков В. Statistica. Искусство анализа данных на компьютере, СПб., 2003.
2. Вуколов Э.А. Основы статистического анализа. Практикум по статистическим методам и исследованию операций с использованием пакетов STATISTICA и Excel, М., 2008.
3. Марчук М.С., Мутылина И.Н. Биосовместимые материалы, применяемые для изготовления стентов. Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, 2010, 78, с.67-69.
4. Оганесян А.Н., Даллакян А.М., Погосян А.С., Оганесян Н.М., Азнаурян А.В., Тавакалян Н.Б. Биодegradируемые коронарные стенты: in vivo деградация железа. Приоритетные направления развития науки и технологий, тезисы докладов XV Международной научно-технической конференции, Тула, 2014, с.27-30.
5. Папиров И. И., Тихоновский Н. А., Шокуров В. С., Пикалов А. И., Сивцов В. С., Старожилов Г. Е., Емлянинова Т. Г., Мазин А. П., Шкуропатенко В. А. Получение мелкозернистого тантала. Вестник Харьковского университета, 2005, 664, с. 99-102.
6. Hermawan H., Dubu D., Mantovani D. Review: Development in metallic biodegradable stents. Acta biomateriala, 2010, Vol. 6, p.1693-1697.
7. Mani Gopinath, Feldman Marc D., Patel Devang, Agrawal C. Mauli Coronary stents: a materials perspective. Biomaterials, 2007, Vol.28, p. 1689-1710.
8. Purnama et al. Biodegradable Metal Stents: A Focused Review on Materials and Clinical Studies. Journal of Biomaterials and Tissue Engineering, 2014, Vol.4, p.1-6.