

Исследование пленочных матриц из резорбируемых полигидроксиалканоатов различного химического состава in vivo: реакция тканей и кинетика биоразрушения

Е.И. Шишачкая¹, Е.Д. Николаева², А.В. Горева², К.Д. Бриггхам³, Т.Г. Волова¹, Э.Д. Синкси³

¹ Сибирский федеральный университет, Красноярск

² Институт биофизики СО РАН, Красноярск

³ Массачусетский технологический институт, Массачусетс, Кембридж, США

An in vivo study of pha matrices of different chemical composition: tissue reaction and biodegradation

E.I. Shishatskaya¹, E.D. Nikolaeva², A.V. Goreva², C.J. Brigham³, T.G. Volova¹, A.J. Sinsky³

¹ Institute of modern biology and biotechnology, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

² Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia

³ Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA

Исследовано «семейство» пленочных матриц, изготовленных из разрушаемых полигидроксиалканоатов, различного химического состава. Независимо от состава матриц и длительности контакта с внутренней средой организма, не наблюдали отклонений в поведении животных, их росте и развитии, а также функции крови. Реакция тканей на полигидроксиалканоаты (ПГА) всех типов в целом сопоставима с реакцией на полилактид, но существенно менее выражена на ранних сроках после имплантации. Ответ тканей на имплантацию ПГА всех типов характеризуется непродолжительным (до 2 нед) посттравматическим воспалением с образованием на 30–60 сут. фиброзных капсул толщиной менее 100 мкм, которые в сроки 180 сут. в ходе обратного развития истончаются до 40–60 мкм. Различий в реакциях на матрицы из гомополимера 3-гидроксимасляной кислоты (ПЗГБ), сополимеров 3-гидроксимасляной и 4-гидроксимасляной кислот (ПЗГБ/4ГБ), 3-гидроксимасляной и 3-гидроксивалериановой кислот (ПЗГБ/ЗГВ), 3-гидроксимасляной и 3-гидроксигексановой кислот (ПЗГБ/ЗГГ) на уровне тканей и целого организма не выявлено. В реакции тканей на исследованные ПГА активное участие принимают макрофаги и гигантские клетки инородных тел. Наиболее активно разрушаемыми ПГА определены матрицы из сополимеров, содержащие 3-гидроксигексаноат и 4-гидроксипутират. Следующими и более медленно разрушаемыми были матрицы из сополимера ПЗГБ/ЗГВ, и самыми устойчивыми – матрицы из ПЗГБ. Более медленная разрушаемость ПГА матриц сопровождалась более поздним развитием гиганто-клеточной реакции. По разрушаемости исследуемые матрицы из ПГА находятся в ряду: ПЗГБ/ЗГГ – ПЗГБ/4ГБ – ПЗГБ/ГВ – ПЗГБ.

Ключевые слова: разрушаемые полимерные матрицы, полигидроксиалканоаты, подкожная имплантация, реакция тканей, разрушаемость.

Освоение новых биосовместимых материалов, необходимых для современных реконструктивных медико-биологических технологий, является актуальной проблемой биотехнологии. Активно развиваемый в настоящее время новейший подход – создание «биоискусственных» тканей и органов, развитие которого делает необходимой разработку новых функциональных материалов [1, 2]. Открытие и изучение

The study addresses consequences of subcutaneous implantation of film matrices prepared from different PHAs to laboratory animals. No negative effects of subcutaneous implantation of PHA matrices on physiological and biochemical characteristics of the animals were determined. Independently of the matrices composition and duration of the contact with the internal environment of the organism we did not observe any deviations in the behavior of animals, their growth and development, as well as blood functions. Response of the tissues to PHA matrices was comparable with the response to polylactide, but substantially less expressed at the earlier time periods after implantation. Tissues response to implantation of PHA of all types is characterized by short-term (up to 2 weeks) post-traumatic inflammation with formation of fibrous capsules by 30th–60th days with the thickness less than 100 microns, which get thinner down to 40–60 microns by 180th day as the result of involution. No differences in response of tissues and the whole organism were observed for the matrices produced from the homopolymer of 3-hydroxybutyric acid (P3HB), copolymers of 3-hydroxybutyric and 4-hydroxybutyric acids (P3HB/4HB), 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvalerianic acids (P3HB/3HV), 3-hydroxybutyric and 3-hydroxyhexanoate acids (P3HB/3HH). Macrophages and foreign-body giant cells actively participate in the response of the tissues to PHAs. In the studied conditions matrices from the copolymers containing 3-hydroxyhexanoate and 4-hydroxybutyrate were determined as more actively degraded PHA. The next less degraded matrices were matrices from the copolymer of P3HB/3HV and the most resistant were P3HB matrices. The slower degradation of PHA matrices was accompanied by delayed development of giant-cells response. The studied PHA matrices can be placed in the following range by their degradation: P3HB/3HH – P3HB/4HB – P3HB/HV – P3HB.

Key words: degradable polymer matrices, polyhydroxyalkanoates, PHAs, subcutaneous implantation, tissue reaction, degradation.

полигидроксиалканоатов (ПГА) – биосовместимых резорбируемых полиэфиров микробиологического происхождения, явилось значимым событием для биотехнологии новых материалов. Особо ценным в ПГА является возможность синтеза полимеров различного состава, образованных мономерами с различной длиной С-цепи. В зависимости от соотношения мономеров базовые свойства ПГА могут

e-mail: shishatskaya@inbox.ru

изменяться в достаточно широких пределах [3–5]. Однако наличие в ПГА, помимо гидроксимасляной кислоты, которая является естественным метаболитом клеток высших животных и человека [6], других мономеров, делает необходимым проверку биосовместимости материала в полном объеме. Нельзя не отметить при этом, что для подтверждения биосовместимости новых материалов и изучения закономерностей взаимодействия с организмом *in vivo* на этапе доклинических исследований необходимы длительные и сложные эксперименты на лабораторных животных. Однако опубликованные результаты медико-биологических исследований сополимерных ПГА весьма отрывочны. Особенно мало информации и результатов исследования ПГА, выполненных на животных. В доступной литературе представлены единичные работы этого плана. В работе Х.-Н. Qu с соавт. (2006) в сравнительном аспекте исследована реакция тканей на подкожную имплантацию полимера молочной кислоты (ПМК), поли-3-гидроксibuтирата (ПЗГБ) и сополимеров 3-гидроксibuтирата с 3-гидроксигексаноатом (ПЗГБ/ЗГГ). Тканевая реакция на имплантацию включала двухнедельный воспалительный ответ, который был более выраженным в месте имплантации ПМК и ПЗГБ [7]. В работе J. Zhou с соавт. (2010) авторы исследовали тканевую реакцию на имплантаты из сополимера ПЗГБ/ЗГГ. Характер тканевой реакции был несколько отличным от предыдущей работы. В целом, отмечая отсутствие неблагоприятных реакций в виде нагноения, отторжения и некрозов на сроках до 2 нед. после операции, показана высокая плотность в окружающих тканях клеток воспалительного ряда при имплантации ПЗГБ/ЗГГ [8]. В работе Т.Н. Ying с соавт. (2008) изучены биорезорбция и тканевый ответ на подкожную имплантацию матриксов из нетканого волокна, сформированного ультратонкими волокнами из гомополимера ПЗГБ, сополимеров ПЗГБ/ЗГГ и ПЗГБ/4ГБ [9]. Отмечено, что сополимер ПЗГБ/4ГБ через 4 нед. разрушился и присутствовал в виде мелких фрагментов, вокруг которых сформировалась тонкая фиброзная капсула; через 12 нед. капсула истончилась, клетки воспаления не определялись. Эта картина аналогична наблюдаемой другими авторами [10–12] в ходе изучения реакции тканей на имплантацию П4ГБ. Однако, оценивая тканевую реакцию на другие типы ПГА (ПЗГБ/ЗГГ и ПЗГБ/4ГБ), авторы отметили, что снижения количества клеток воспалительного ряда не наблюдали. Как результат воспаления вокруг этих имплантатов сформировалась фиброзная капсула, а вокруг медленно разрушающегося имплантата из ПЗГБ количество макрофагов продолжало возрастать на сроке 12 нед., что привело к формированию плотной фиброзной капсулы. Эти немногочисленные работы не дают исчерпывающего ответа на вопрос о характере взаимодействия полимерных изделий из ПГА различного химического состава с тканями, силе и длительности реакции тканей на инородное тело и клеточной реакции на имплантаты.

В серии работ Института биофизики СО РАН в сравнительном аспекте исследована биологическая совместимость двух типов ПГА (гомогенного ПЗГБ и сополимеров ПЗГБ/ЗГБ) в виде шовных волокон, имплантированных внутримышечно [13–15], объемных имплантатов для замещения модельных дефектов костной ткани [16, 17] и микрочастиц, которые были

имплантированы лабораторным животным внутримышечно [18, 19], распределены в тканях внутренних органов при внутривенном введении [20, 21]. Не обнаружено негативного влияния исследованных типов ПГА на общее самочувствие и развитие животных, систему периферической крови, биохимические показатели крови, ткани в местах имплантации. Важно отметить, что оба типа ПГА показали высокую биосовместимость и соответствие требованиям, предъявляемым к материалам и изделиям медицинского назначения [22, 23]. В нашей недавней работе биологически совместимые 5 типов ПГА: гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты, сополимеры 3-гидроксимасляной и 4-гидроксимасляной кислот, 3-гидроксимасляной и 3-гидроксивалериановой кислот, 3-гидроксимасляной и 3-гидроксигексаноовой кислот — были исследованы в культуре фибробластов мыши линии NIH 3T3 [24]. По результатам окрашивания культивируемых клеток флуоресцентным зондом на ДНК DAPI и в МТТ-тесте показано, что все представленные типы ПГА не проявляют цитотоксичности при прямом контакте с клетками, обладают высокой биосовместимостью; по адгезивным свойствам и способности поддерживать пролиферацию фибробластов сопоставимы с полистиролом и превосходят ПМК.

Цель настоящей работы — исследование биологической совместимости и динамики биоразрушения пленочных матриксов из ПГА различного химического состава при имплантации лабораторным животным на срок 180 сут.

Материал и методы

Матрикссы получены из растворов высокоочищенных ПГА различного химического состава: гомополимер 3-полигидроксibuтират (ПЗГБ), и сополимеры 3-гидроксibuтирата и 3-гидроксивалерата (ПЗГБ/ЗГБ) с включением ЗГБ от 8,6 до 27,6 мол. %, 3-гидроксibuтирата и 3-гидроксигексаноата (ПЗГБ/ЗГГ) с включением ЗГГ 7 и 18 мол. %, 3-гидроксibuтирата и 4-гидроксibuтирата (ПЗГБ/4ГБ) с включением 4ГБ от 8,7 до 24,3 мол. %. Процедура получения образцов, их характеристики и способы изготовления пленочных матриксов нами подробно описаны ранее [24]. Характеристика матриксов представлена в табл. 1.

Для исследования реакции организма, реакции крови и местной реакции тканей, а также динамики биоразрушения полимерные пленочные матрикссы были имплантированы половозрелым крысам линии Вистар (самки массой 180–200 г) на срок 180 сут. Общее число животных 105, по 15 в каждой группе. Распределение животных по группам было следующим: 5 экспериментальных групп (матрикссы из ПГА различного химического состава) и 2 контрольные (1 группа — интактные животные, 2-я — группа положительный контроль, матрикс из ПМК, Sigma). Матрикссы размером 10×10 мм и толщиной 0,05–0,08 мм были имплантированы подкожно. Техника операции: под ингаляционным наркозом (диэтиловый эфир) в асептических условиях выполняли разрез (длиной 2 см) кожи спины, кожа правого края разреза отслаивалась для формирования подкожного «кармана» глубиной 1 см. Кожу отслаивали от подлежащих тканей и фасции спины, в карман вводили по 3 имплантата; разрез ушивали шелковой нитью наглухо.

Таблица 1. Характеристики пленочных матриц, изготовленных из ПГА различного химического состава

Показатель	Тип 2D матрикса, состав мономеров (мол.%)				
	ПЗГБ (100)	ПЗГБ/4ГБ (89,3/10,7)	ПЗГБ/3ГВ (87/13)	ПЗГБ/3ГВ (72,4/27,6)	ПЗГБ/3ГГ (93/7)
Средневесовая мол. масса, M_w , кДа	652 000	634 000	603 000	587 000	315 000
Среднечисловая мол. масса, M_n , кДа	144 889	285 586	208 650	203 819	152 174
Полидисперсность, ПД	4,5	2,22	2,89	2,88	2,07
Степень кристалличности, C_x , %	76	43	50	45	35
Температура плавления, $T_{пл}$, °С	179,7	172	162	157	158
Температура термической дегградации, $T_{дегр.}$, °С	273	268	266	263	240
Контактный краевой угол смачивания водой, θ град	70,0±0,4	57,4±0,6	60,3±2,8	62,5±2,0	60,9±1,6
Среднее арифметическое отклонение профиля (шероховатость), Ra, нм	93,200	92,909	98,682	–	99,12
Среднеквадратичная шероховатость, Rq, нм	109,390	113,062	107,931	–	111,1

Примечание: ПЗГБ – гомополимер 3-полигидроксibuтирата; ПЗГБ/4ГБ – сополимер 3-гидроксibuтирата и 4-гидроксibuтирата; ПЗГБ/3ГВ – сополимер 3-гидроксibuтирата и 3-гидроксивалерата; ПЗГБ/3ГГ – сополимер 3-гидроксibuтирата и 3-гидроксигексаноата.

В ходе эксперимента в сроки 10, 30, 60, 90 и 180 сут. передозировкой ингаляционного наркоза выводили из эксперимента по три животных каждой группы, забирали для анализов кровь и имплантаты с фрагментами окружающих тканей. В периферической крови с использованием общепринятых методов определяли СОЭ, содержание гемоглобина и форменных элементов.

Для исследований местной реакции на имплантаты образцы тканей с полимерными матриксами иссекали из подкожной ткани и фиксировали в 10% формалине. После заключения материала в парафин изготавливали срезы толщиной 4–6 мкм. Оценивали общую реакцию тканей (окраска гематоксилин-эозином) и процессы развития коллагеновых волокон (окраска пикрофуксином по Ван-Гизону). С использованием Image Analysis System «Carl Zeiss Jena» (Германия) проводили анализ изображений и морфометрические исследования срезов. Оценивали выраженность и длительность воспаления, динамику образования и толщину фиброзной капсулы (ТК), ее клеточный состав, а также время развития и созревания коллагеновых волокон. Об активности клеточных элементов судили по среднему их количеству в поле зрения при анализе 15 полей зрения.

Для изучения кинетики разрушения матриц *in vivo* регистрировали остаточное содержание полимера в тканях в динамике эксперимента. С использованием хроматографа для гель-проникающей хроматографии «Waters Breeze System» (Waters, США) исследовали молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение ПГА относительно полистироловых стандартов (Sigma, США). Значение средней молекулярной массы полимера рассчитывали по формуле:

$$M_n = \sum (N_i \cdot M_i / N),$$

где N_i — количество молекул массы i ; N — общее количество молекул; M_i — масса молекул длины i .

Вес средней молярной массы полимера определяли:

$$M_w = \sum (w_i \cdot M_i),$$

где w_i — доля массы ($w_i = N_i M_i / \sum (N_i \cdot M_i)$).

Полидисперсность, позволяющую оценить соотношение в полимере фрагментов с различной степенью полимеризуемости, вычисляли из соотношения:

$$ПД = M_w / M_n.$$

Убыль веса образцов рассчитывали по отношению конечного веса к исходному (X , %):

$$X = \frac{X_2}{X_1} \times 100,$$

где X_1 и X_2 — вес образца, соответственно, до и после испытаний, мг.

Результаты обработаны статистически общепринятыми методами [25] с использованием программы Microsoft Excel. Для получения данных рассчитывали среднее арифметическое, среднеквадратичное отклонение, ошибку среднего арифметического. Достоверность отличия средних значений проверяли по U-критерию Манна – Уитни (уровень значимости 0,05).

Результаты и обсуждение

В ходе исследования все животные в 5 экспериментальных группах, которым были имплантированы 2D матрицы из полимеров различного химического состава, были здоровы и активны, равномерно прибавляли в весе. Достоверных изменений по сравнению с контрольными группами обнаружено не было. Относительные массы внутренних органов у животных всех экспериментальных групп также не отличались от таковых в контроле. Макроскопические исследования внутренних органов животных наблюдения каких-либо отклонений не выявили.

Показатели общего анализа крови в контрольных и опытных группах находились в пределах физиологических величин и не отличались существенно у животных экспериментальных групп относительно контролей. Незначительное повышение количества лейкоцитов (от 10 до 12,5–13,0×10⁹/л) и уровня СОЭ (до 3,0–3,5) отмечены на 10 сут. после оперативного вмешательства во всех группах у оперированных животных относительно интактного контроля. При этом повышение количества лейкоцитов у животных в группе положительного контроля (ПМК) и во всех экспериментальных группах относительно интактного контроля статистически значимы ($p > 0,05$). Однако проявление лейкоцитоза на данном сроке у животных, которым были имплантированы матриксы из ПМК, было достоверно выше по сравнению со всеми остальными группами. Повышенное содержание лейкоцитов у этих животных сохранялось на более поздних сроках (30 сут. после операции). Достоверное повышение СОЭ отмечено только на первом наблюдаемом сроке и только у животных в группе положительного контроля относительно других групп. Далее показатель стабилизировался в границах физиологической нормы у всех животных. В целом, сдвиги в лейкоцитарной формуле крови экспериментальных животных всех групп на всех сроках наблюдения статистически значимо не изменялись.

Заживление ран у животных в экспериментальных группах, аналогично положительного контроля, происходило первичным натяжением. Ни у одного животного не обнаружено явлений отторжения имплантатов, нагноения, расхождения швов и других нежелательных явлений. Гистологические исследования реакции тканей на подкожную имплантацию пленочных матриксов из ПГА различного химического состава существенных отличий и неблагоприятных проявлений не выявили. Все матриксы находились в месте имплантации, были окружены тонкой фиброзной капсулой. Вокруг всех типов имплантатов по периферии в окружающей фиброзно-мышечной ткани некрозов, кровоизлияний, гранулем и выраженного отека не было отмечено. Реакция тканей на оперативное вмешательство и последующую имплантацию полимерных матриксов в общих чертах протекала по обычной схеме, характерной для раневого процесса и реакции на инородное тело, включая стадии травматического воспаления, образования соединительной ткани, формирования и перестройки рубца [26].

Микроскопическая картина в месте имплантации экспериментальных матриксов всех типов на 10 сут. после операции (рис. 1) характеризовалась отсутствием отека тканей вокруг имплантатов, которые были макрофагами и лимфоцитами, нейтрофилами и фибробластами. Отмечено начало формирования фиброзной капсулы и обильная макрофагально-фибробластическая инфильтрация на границе с ПГА-матриксами. Сопоставление результатов, полученных при имплантации матриксов из ПГА, с реакцией тканей на матрикс, изготовленный из ПМК, показало, что начальная реакция тканей на контрольный материал была более выраженной по сравнению с реакцией на экспериментальные матриксы; количество нейтрофилов и лимфоцитов вокруг имплантата сравнения (ПМК) было выше (табл. 2). Следов разрушения матриксов из ПГА не отмечено.

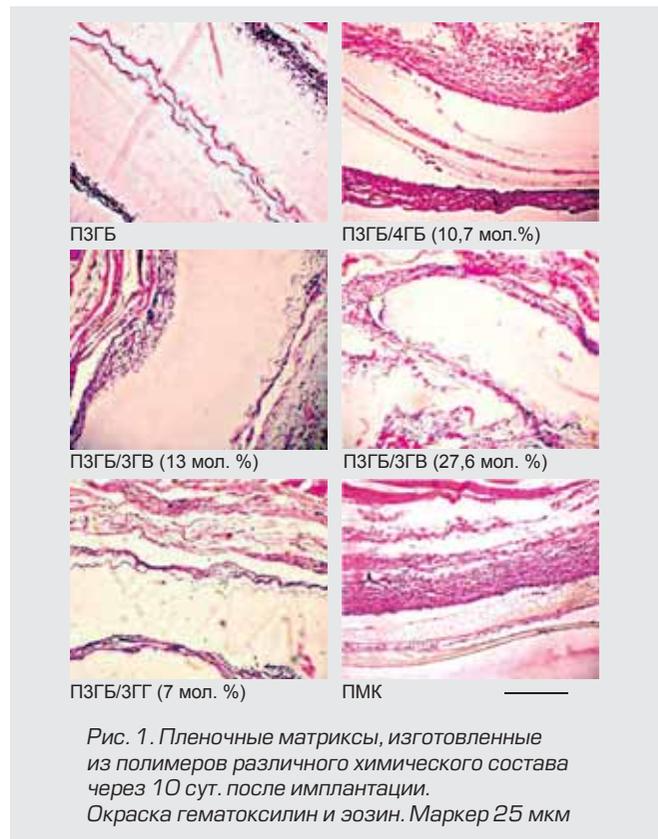


Рис. 1. Пленочные матриксы, изготовленные из полимеров различного химического состава через 10 сут. после имплантации. Окраска гематоксилин и зозин. Маркер 25 мкм

Через 30 сут. после имплантации вокруг матриксов всех типов сформировались тонкие фиброзные капсулы (рис. 2). Прорастание соединительной ткани в имплантат не отмечено. По периферии в окружающей фиброзно-мышечной ткани некрозов, кровоизлияний, лимфо-гистиоцитарной инфильтрации и отека не наблюдалось. Капсула характеризовалась наличием небольшого количества макрофагов и фибробластов, располагающихся на внутренней поверхности капсулы, на границе с пленкой. Определялись единичные гигантские клетки инородных тел (ГКИТ), лежащие в толще внутренней поверхности капсулы. Минимальная толщина капсулы в эти сроки ($22,48 \pm 4,16$ мкм) определялась вокруг имплантатов из гомополимерного ПЗГБ; максимальная ($42,36 \pm 3,43$) – вокруг сополимеров ПЗГБ/4ГБ. Более плотная и сформированная капсула характерна для контрольного ПМК ($56,75 \pm 4,5$ мкм). Клеточная инфильтрация капсул, формирующихся вокруг матриксов из всех типов ПГА, возросла преимущественно за счет фибробластов и активных макрофагов; отмечено в небольших количествах присутствие в окружающих тканях клеток воспаления (нейтрофилов и лимфоцитов). В капсуле вокруг контрольного матрикса из ПМК количество нейтрофилов и лимфоцитов было выше в несколько раз. Отмечено также присутствие большого количества ГКИТ, являющихся, как известно, одним из основных агентов биорезорбции ПМК, а также и ПГА. Дегенерации матриксов из ПГА в виде появления трещин или фрагментации не было отмечено.

Существенных отличий в состоянии тканей и структуре фиброзных капсул вокруг экспериментальных ПГА-матриксов спустя 60 сут. после имплантации не отмечено, за исключением увеличения количества ГКИТ и снижения количества клеток воспаления (табл. 2, рис. 3).

Таблица 2. Морфометрические показатели реакции тканей на имплантацию 2D матриц из полимеров различного химического состава ($M^* \pm m$)

Тип матрикса	Время, сут.	Толщина капсулы, мкм	Кол-во макрофагов+ фибробластов (поле/зр)	ГКИТ	Нейтрофилы	Лимфоциты
ПЗГБ (100%)	10	–	20,64±2,31	0	16	24
	30	22,48±4,16	29,36±3,42	1	14	16
	60	48,23±6,6	45,50±5,85	5	4	12
	90	43,56±5,93	83,56±6,87	8	2	15
	180	28,09±3,28	71,93±0,98	7	0	8
ПЗГБ/4ГБ (10 мол. %)	10	–	33,14±4,32	0	12	18
	30	42,36±3,43	55,50±4,40	2	11	17
	60	40,67±5,98	70,79±8,0	12	6	12
	90	76,08±8,37	103,79±9,74	7	3	6
	180	38,71±3,11	100,93±10,84	6	0	4
ПЗГБ/3ГВ (13 мол. %)	10	–	31,00±4,19	0	9	20
	30	35,99±3,70	43,36±5,14	3	11	16
	60	52,49±6,4	68,43±7,19	5	5	9
	90	78,17±9,46	70,14±6,19	8	0	12
	180	35,49±4,63	81,29±9,21	9	0	7
ПЗГБ/3ГВ (27 мол. %)	10	–	45,21±6,06	0	8	18
	30	33,69±5,5	67,00±7,65	2	12	23
	60	51,68±6,51	70,64±8,0	4	4	14
	90	60,76±7,0	87,14±9,45	11	1	8
	180	32,00±4,68	98,43±10,45	9	0	8
ПЗГБ/3ГГ (7 мол. %)	10	–	35,21±4,66	0	12	21
	30	37,59±5,5	54,00±5,65	5	6	24
	60	59,25±6,51	75,64±8,70	14	8	16
	90	54,21±6,06	82,14±7,45	10	3	9
	180	42,00±5,68	79,43±8,45	6	1	4
ПМК (100%)	10	–	45,21±6,66	3	32	43
	30	56,75±4,5	84,00±7,65	18	23	56
	60	78,25±8,51	95,64±10,70	24	16	40
	90	87,21±12,0	89,14±9,45	14	8	29
	180	32,00±5,68	67,43±7,45	5	2	8

Примечание: Аббревиатуры аналогичны табл. 1; ГКИТ – гигантские клетки инородных тел.

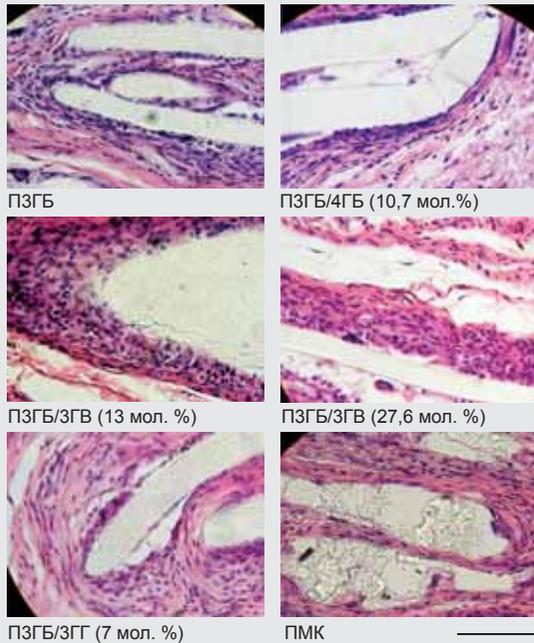


Рис. 2. Пленочные матриксы, изготовленные из полимеров различного химического состава через 30 сут. после имплантации. Окраска гематоксилин–эозин. Маркер 40 мкм

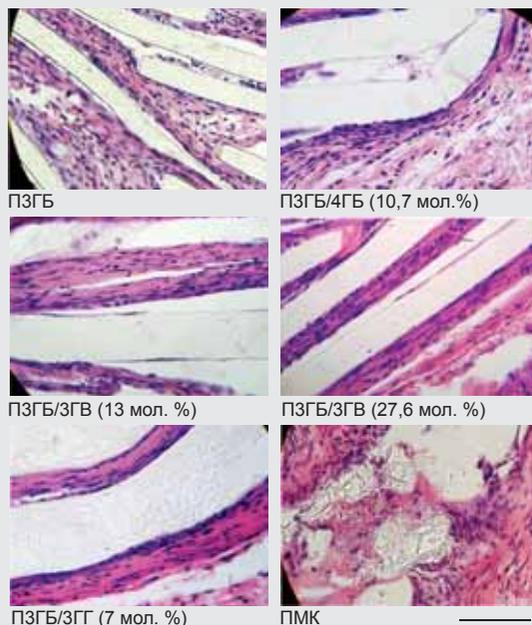


Рис. 3. Пленочные матриксы, изготовленные из полимеров различного химического состава через 60 сут. после имплантации. Окраска гематоксилин и эозин. Маркер 40 мкм

Сформированные капсулы в основном были представлены фибробластами и коллагеновыми волокнами; отмечено наличие сосудов микроциркуляторного русла; в их структуре преобладали коллагеновые волокна зрелого типа. В отличие от реакции тканей на ПГА, в тканях вокруг матрикса из ПМК отмечено увеличение количества клеток всех типов, а также увеличение толщины фиброзной капсулы. В зоне,

окружающей матриксы, по-прежнему регистрировали большое количество активных макрофагов. Видимые повреждения матриксов из ПЗГБ/4ГБ и ПЗГБ/3ГГ, среди таковых – выраженная шероховатость поверхности, появление трещин в толще матриксов и вакуолизация. Матрикс, изготовленный из ПМК, выглядел более деструктурированным, в тканях присутствовало значительное количество кристаллизованной остаточной полимерной массы.

Спустя 90 сут. после имплантации (рис. 4), отмечено возрастание толщины фиброзных капсул вокруг всех типов матриксов, однако капсулы были не грубыми, а их толщина не превышала 100 мкм. Капсулы характеризуются наличием ярко выраженной двухслойности, внутренний слой занимает 1/3 толщины, представлен рыхлой фиброзной тканью с большим количеством макрофагов, фибробластов и ГКИТ. Наружная поверхность представлена плотной фиброзной тканью в виде пучков коллагеновых волокон и прилегающих к ним фиброцитов. Капсулы характеризуются высокой зрелостью коллагена с наличием фиброцитов во внешнем слое, внутренний – представлен тонким слоем фибробластов с макрофагами, молодой фиброзной тканью с умеренной инфильтрацией лейкоцитами. Наружная поверхность представлена плотной фиброзной тканью в виде пучков коллагеновых волокон и прилегающих к ним фиброцитов, с обеднением клеточного состава инфильтрата. Характерной реакцией тканей на имплантацию матриксов из ПГА было увеличение количества ГКИТ на фоне значительного снижения нейтрофильно-лимфоцитарной инфильтрации. Матриксы были существенно деструктурированы.

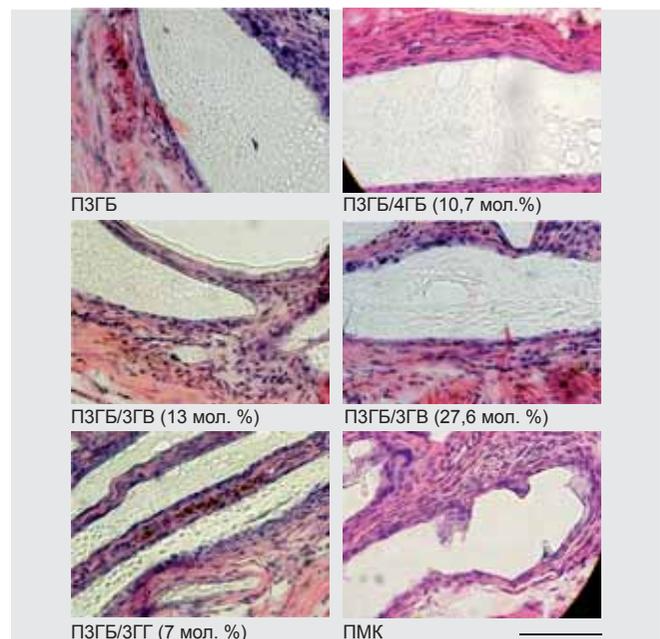


Рис. 4. Пленочные матриксы, изготовленные из полимеров различного химического состава через 90 сут. после имплантации. Окраска гематоксилин и эозин. Маркер 40 мкм

Через 180 сут. после имплантации вокруг ПГА-матриксос зафиксировано значительное (в 1,5–2,3 раза) истончение капсул (рис. 5 и табл. 2) по сравнению со сроком 90 сут. Однако количество активных макрофагов в тканях, примыкающих к имплантатам, по-прежнему оставались на высоком уровне. Среди фибробластических элементов преобладали «зрелые» клетки. Клетки воспалительного ряда не определялись. В периферических частях капсулы наблюдали образование зрелой соединительной ткани в виде пучков коллагеновых волокон и прилегающих к ним фиброцитов. За исключением ПЗГБ, практически все матриксы были сильно разрушены и фрагментированы. Остаточное содержание матриксос из ПЗГБ/ЗГГ, ПЗГБ/4ГБ и ПМК – минимально в виде обрывков дефрагментированных пленок и небольших фрагментов.

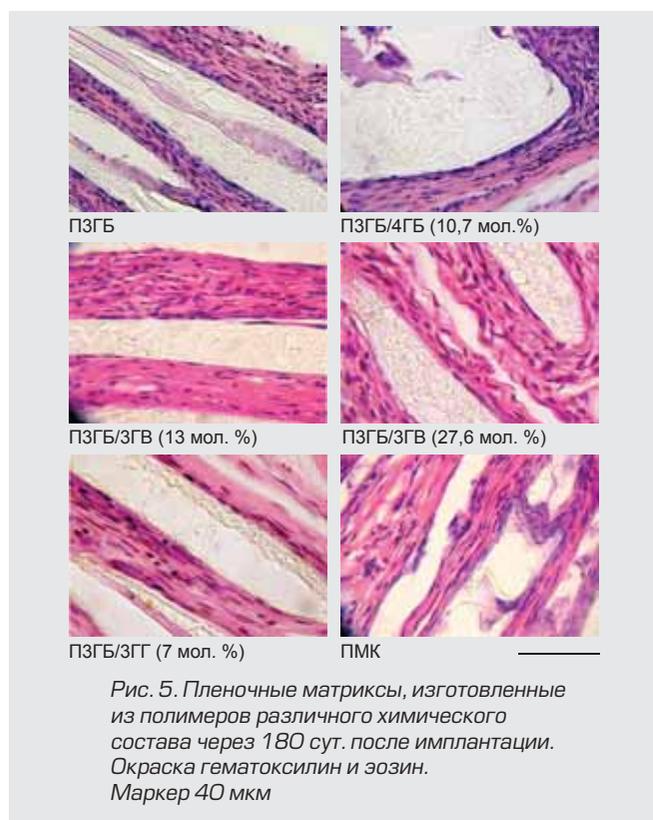


Рис. 5. Пленочные матриксы, изготовленные из полимеров различного химического состава через 180 сут. после имплантации. Окраска гематоксилин и эозин. Маркер 40 мкм

Полученные результаты показали, что матриксы, изготовленные из всех исследованных типов ПГА, биосовместимы и реакция на них со стороны окружающих тканей умеренная, при этом не выявлено существенных отличий и не отмечено, что ПЗГБ вызывает более выраженный тканевой ответ по сравнению с другими типами исследованных ПГА. Нельзя не отметить, однако, что в цитированных работах [7, 8, 11] ничего не сказано о процедуре экстракции образцов ПГА и степени химической чистоты исследованных образцов. Вместе с тем, это весьма существенный момент, так как даже следовое присутствие в полимере остаточных количеств макромолекул, присутствующих в биомассе бактерий, из которой выделяют ПГА, может вызвать пирогенные, воспалительные реакции, активировать ферментные системы крови и пр. Поэтому в наших исследованиях в клеточных культурах и в экспериментах на животных использованы только высокоочищенные

образцы ПГА, не содержащие каких-либо примесей органической природы [22, 27, 28].

Следующая задача включала изучение кинетики разрушения матриксос, изготовленных из ПГА in vivo. На рис. 6 показано изменение веса матриксос в ходе 180 сут. подкожной имплантации.

Наиболее активно разрушался контрольный матрикс из ПМК. Дефекты его поверхности видны на сроке 10 сут. (см. рис. 1); его остаточная масса через 30 сут. не превышала 60%, через 60 сут. определялась на уровне 36%; спустя 90 сут. – около 10–15 % от исходных значений. Через 180 сут. остаточная масса матриксос из ПМК была следовой. Следующими, активно разрушаемыми были матриксы, полученные из сополимеров ПЗГБ/ЗГГ и ПЗГБ/4ГБ. Через 30 сут. их остаточная масса составила порядка 75–80 % от исходной; через 90 сут. – 20 и 33 %; к концу эксперимента (180 сут.), 10 и 20%, соответственно. Разрушение матриксос, изготовленных из сополимеров ПЗГБ/ЗГВ (включение 3-гидроксивлаерата 13 и 27,6 мол. %) происходило практически одинаково и было менее замедленным по сравнению с выше описанными сополимерами.

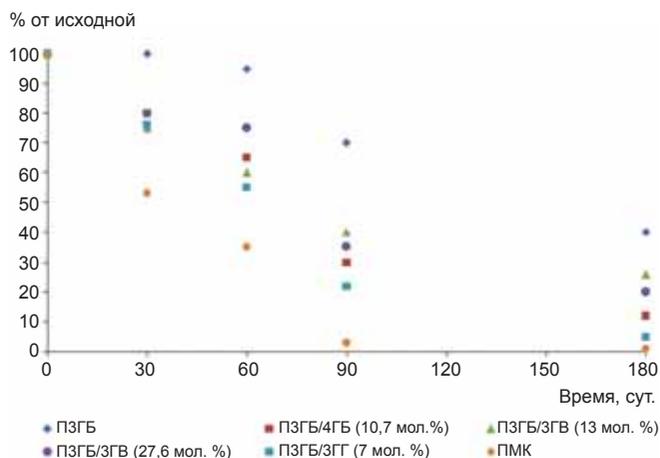


Рис. 6. Изменение веса полимерных матриксос в ходе 180-суточной подкожной имплантации

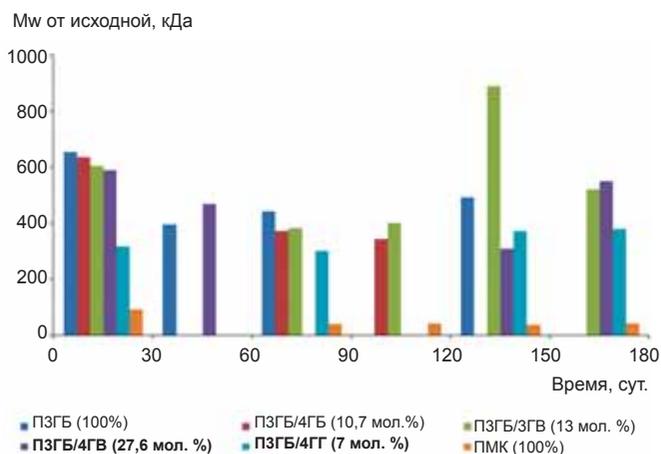


Рис. 7. Динамика молекулярной массы полимерных матриксос в ходе 180-суточной подкожной имплантации

Так, через 90 сут. их остаточная масса составила порядка 40%, а через 180 сут. – 30–35% от исходной. Наиболее устойчивы к разрушению матриксы из ПЗГБ, заметное разрушение которых (на уровне 25%) зафиксировано на сроке 90 сут, а через 180 сут. остаточная масса этого типа матрикса составила 45% от исходной величины. Более медленная разрушаемость ПГА матриксов сопровождалась более поздним развитием гиганто-клеточной реакции в месте их имплантации. По разрушаемости исследуемые матриксы из ПГА находятся в ряду: ПЗГБ/ЗГГ – ПЗГБ/4ГБ – ПЗГБ/ГВ – ПЗГБ.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Штильман М.И. Полимеры медико-биологического назначения. М.: Академкнига; 2006.
2. Хенч Л., Джонс Д. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей. Серия «Мир биологии и медицины». М.: Техносфера; 2007.
3. Volova T.G. Polyhydroxyalkanoates – plastic materials of the 21st century: production, properties, application. NY: Nova Science Pub; 2004: 7.
4. Волова Т.Г., Севастьянов В.И., Шишацкая Е.И. Полиоксиканоаты – биоразрушаемые полимеры для медицины. Красноярск: «Платина»; 2006.
5. Sudesh K., Abe H., Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. Prog. Polym. Sci. 2000; 25: 1503–55.
6. Hocking P., Marchessault R. Chemistry and technology of biodegradable polymers (G. Griffin (Ed.). Glasgow: Blackie; 1994.
7. Qu X.-H., Wu Q., Zhang K.-Y. Et al In vivo studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) based polymers: Biodegradation and tissue reactions. Biomaterials 2006; 27: 3540–8.
8. Zhou J., Peng S.-W., Wang Y.-Y. et al. The use of poly(93-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds for tarsal repair in eyelid reconstruction in the rat. Biomaterials 2010; 31: 7512–8.
9. Ying T.H., Ishii D., Mahara A. et al. Scaffolds from electrospun polyhydroxyalkanoate copolymers: Fabrication, characterization, bioabsorption and tissue response. Biomaterials 2008; 29: 1307–17.
10. Williams D.F., Martin D.P., Horowitz D.M. et al. PHA applications: addressing the price performance issue. I. Tissue engineering. Int. J. Biol. Macromol. 1999; 25: 111–21.
11. Williams S.F., Martin D.P. Applications of PHAs in medicine and pharmacy. In: A. Steinbüchel, editor. Series of biopolymers in 10 vol. 2002; 4: 91–121.
12. Williams S.F., Martin D.P. Applications of PHAs in Medicine and Pharmacy. In: A. Steinbüchel, editor. Biopolymers. 2004; 4: 91–103.
13. Шишацкая Е.И., Волова Т.Г., Гордеев С.А. и др. Биодegradация шовных нитей на основе полиоксиканоатов в биологических средах. Перспективные материалы 2002; 2: 56–62.
14. Volova T.G., Shishatskaya E.I., Sevastianov V.I. et al. Results of biomedical investigations of PHB and PHB/PHV fibers. Biochemical Engin. J. 2003; 16(2): 125–33.
15. Shyshatskaya E.I., Volova T.G., Efremov S.N. et al. Tissue response to the implantation of biodegradable polyhydroxyalkanoate sutures. J. Mat. Sci. 2004; 15 (6): 719–28.
16. Shyshatskaya E.I., Khlusov I.A., Volova T.G. A hybrid PHB-hydroxyapatite composite for biomedical application: production, in vitro and in vivo investigation. J. Biomater. Sci. Polymer Edn. 2006; 17(5): 481–98.
17. Шишацкая Е.И. Биосовместимые и функциональные свойства гибридного композита полигидроксibuтират/гидроксиапатит. Вестник трансплантологии и искусственных органов 2006; 3: 34–8.
18. Shishatskaya E.I., Goreva A.V., Voinova O.N. et al. Tissue reaction to intramuscular injection of resorbable polymer microparticles. Bulletin of experimental biology and medicine 2007; 144(6): 786–90.
19. Shishatskaya E.I., Voinova O.N., Goreva A.V. et al. Biocompatibility of polyhydroxybutyrate microspheres: in vitro and in vivo evaluation. J. Mat. Sci. 2008; 19(6): 2493–502.
20. Шишацкая Е.И., Горева А.В., Калачева Г.С. и др. Распределение и резорбция полимерных микрочастиц в тканях внутренних органов лабораторных животных при внутривенном введении. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2009; 11: 542–46.
21. Shishatskaya E.I., Goreva A.V., Kalacheva G.S. et al. Biocompatibility and resorption of intravenously administered polymer microparticles in tissue of internal organs of laboratory animals. J. Biomat. Sci. 2011; 22: 2185–203.
22. Шишацкая Е.И., Волова Т.Г., Гительзон И.И. Исследование токсикологических свойств полиоксиканоатов в эксперименте in vivo. Доклады РАН 2002; 383 (4): 565–7.
23. Shyshatskaya E.I., Volova T.G. A comparative investigation of biodegradable polyhydroxyalkanoate films as matrices for in vitro cell cultures. J. Mat. Sci. 2004; 15(8): 915–23.
24. Николаева Е.Д., Шишацкая Е.И., Мочалов К.Е. и др. Сравнительное исследование клеточных носителей, полученных из резорбируемых полигидроксиканоатов различного химического состава. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2011; 6(4): 54–63.
25. Лакин Г.Ф. Биометрия: учебное пособие для вузов. М.: Высшая школа; 1990.
26. Шехтер А.Б., Серов В.В. Воспаление и регенерация. М.: Медицина; 1995.
27. Sevastianov V.I., Perova N.V., Shishatskaya E.I. et al. Production of purified polyhydroxyalkanoates (PHAs) for applications in contact with blood. J. Biomat. Sci. 2003; 14: 1029–42.
28. Shishatskaya E.I. Biomedical investigation, application of PHA. Macromol. Sympos. 2008; 269: 65–81.

Поступила 24.01.2012