

© Коллектив авторов, 2013
УДК 616-089.843:599.323.4

*И. В. Майбородин, И. В. Кузнецова, Е. А. Береговой, А. И. Шевела, М. И. Баранник,
А. А. Манаев и В. И. Майбородина*

ТКАНЕВЫЕ РЕАКЦИИ ПРИ ДЕГРАДАЦИИ ИМПЛАНТАТОВ ИЗ ПОЛИЛАКТИДА В ОРГАНИЗМЕ

Центр новых медицинских технологий (зав. — проф. А. И. Шевела), Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

Методами световой микроскопии изучали тканевые реакции, связанные с процессами деградации имплантатов из полилактида (ПЛ) после их помещения в подкожную основу 6-месячным крысам (n=24) линии Wag массой 180–200 г. Было обнаружено, что имплантат инкапсулируется соединительной тканью. В тех случаях, когда он или его фрагменты имеют острые края, которые повреждают ткани, формируется толстая капсула с отчетливой воспалительной инфильтрацией и склерозом окружающих тканей. Если имплантат не имеет острых краев, капсула тонкая, выраженность воспаления минимальная. Во всех случаях в капсуле и рядом с ней присутствуют гигантские клетки инородных тел. Постепенно в течение 6 мес активность воспалительного процесса снижается. Выраженность воспаления резко возрастает к 12 мес после имплантации, когда в результате действия ферментов фагоцитов и деформации капсулой имплантат или фрагментируется, или разжижается. Материалы на основе ПЛ не являются в полной мере биodeградируемыми и сохраняются в организме длительное время.

Ключевые слова: имплантация, деградация, инкапсуляция, гранулематозное воспаление, полилактид

Процессы взаимодействия живых тканей и искусственных материалов в различных условиях имеют большое значение для качества жизни больных, нуждающихся в применении различных эндопротезов в хирургии, травматологии и ортопедии, восстановительной медицине и стоматологии. В настоящее время для замещения утраченных тканей или с косметической целью применяют материалы, вызывающие минимальную макрофагальную и соединительнотканную реакцию и индуцирующие формирование как можно более тонкой капсулы вокруг имплантированного материала [2, 3].

Полимеры молочной кислоты (полилактиды — ПЛ) являются самыми старыми и потенциально одними из самых интересных и полезных биodeградируемых искусственных полимеров из-за их происхождения из возобновляемых источников, управляемого синтеза, хороших механических свойств и исходной биологической совместимости [17].

Полимеры, имеющие в своей структуре ПЛ, — перспективный класс материалов для замещения поврежденных тканей. Согласно литературным данным, эти имплантаты полностью резорбиру-

ются и элиминируются из организма через естественный путь (цикл Кребса). ПЛ обладают необходимыми механическими свойствами, которыми можно управлять, изменяя степень полимеризации и выраженность поперечных связей. В имплантаты можно добавлять необходимые лекарственные вещества, которые, по мере их деградации, будут медленно поступать в окружающие ткани [4].

В литературе практически нет данных о взаимодействии имплантата с организмом уже после отграничения его от живых тканей фиброзной капсулой, также нет сведений как далее ведет себя макрофагальная система и как организм реципиента избавляется от относительно массивного имплантата. Однако без учета указанных факторов невозможно разрабатывать эффективные методы профилактики и лечения развивающихся осложнений использования синтетических материалов для эндопротезирования.

В связи с изложенным были изучены особенности деградации твердых инородных тел на основе биodeградируемых материалов — ПЛ.

Материал и методы. Эксперименты проведены на 6-месячных самцах крыс инбредной линии Wag массой 180–200 г. Все манипуляции с животными осуществляли

Сведения об авторах:

Майбородин Игорь Валентинович (e-mail: imai@mail.ru), *Кузнецова Ирина Владимировна*, *Береговой Евгений Анатольевич*, *Шевела Андрей Иванович*, *Баранник Михаил Иванович*, *Манаев Андрей Александрович*, *Майбородина Виталина Игоревна*, Центр новых медицинских технологий, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 8

под общим ингаляционным эфирным наркозом в условиях чистой операционной с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». На каждую точку исследования было использовано по 6 крыс. ПЛ — гомополимер молочной кислоты — poly(D,L-lactide) для исследования был синтезирован и стерилизован группой клеточной биологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск).

Для подкожной имплантации производили разрез кожи в области шеи от основания черепа до лопаток длиной 1–2 см. Тупым способом (сомкнутым зажимом) формировали слепой канал длиной 1,5–2 см над правой лопаткой [2, 3], в который помещали имплантат из ПЛ с размером каждой грани 3–5 мм, вырезанный ex tempore ножницами из большого куска. Послеоперационную рану ушивали непрерывными швами, кожу и кожные швы обрабатывали спиртом. Воспалительных осложнений в месте послеоперационных швов обнаружено не было.

Спустя 1, 2, 6 и 12 мес после операции имплантированные материалы биоптировали вместе с окружающими тканями, фиксировали в 4% растворе параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7,4) не менее 24 ч, обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в парафин. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином — эозином, изучали под световым микроскопом Axioimager M1 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении до 1200 раз.

Результаты исследования. Имплантат из биodeградируемого полимера на основе молочной кислоты, помещенный в подкожную основу, через 1 мес всегда присутствовал. Однако во всех наблюдениях непосредственно в месте имплантации инородное тело обнаружено не было. Имплантат находился в межлопаточной области посередине (чаще всего), справа и даже слева от средней линии. Визуально имплантат был отграничен тонкой прозрачной капсулой, признаков гиперемии и воспалительных изменений не наблюдалось. Капсула была плотно спаяна с тканями межлопаточной области, кожа и подкожная основа над имплантатом легко смещались.

Микроскопически имплантат из ПЛ был заключен в тонкую капсулу из рыхлой соединительной ткани, содержащей мало межклеточного вещества и множество клеточных элементов, среди которых преобладали фибробласты, лимфоциты и макрофаги (рис. 1, а). Вокруг капсулы наблюдалось множество мелких тонкостенных кровеносных сосудов и формирование единичных слившихся многоядерных макрофагов (см. рис. 1, б).

К 2 мес после операции макроскопическая картина не изменилась. Имплантат присутствовал в межлопаточной области справа или слева от средней линии, был окружен тонкой прозрачной капсулой без признаков воспаления.

С этого срока начиналась деформация имплантата. Чаще (у 4 животных) он был деформирован и окружен тонкой капсулой из плотной соединительной ткани с минимальными воспалительными изменениями в окружающих тканях (лимфоцитарная и макрофагальная инфильтрация). Однако в них даже в этих случаях присутствовали гигантские клетки инородных тел. Толщина капсулы была значительно больше в области острых краев имплантата, там же была значительно выражена лейкоцитарная инфильтрация (см. рис. 1, в, г).

Несколько реже имплантат был покрыт толстой капсулой из плотной соединительной ткани с отчетливо выраженной лейкоцитарной (макрофагальной) инфильтрацией. В капсуле было множество различных по размерам гигантских клеток инородных тел. Окружающие ткани были в значительной степени склерозированы, инфильтрированы лейкоцитами (преимущественно лимфоцитами и макрофагами) и содержали полнокровные кровеносные сосуды с широким просветом и тонкими стенками (см. рис. 1, д, е).

Через 6 мес после имплантации инородное тело по-прежнему можно было найти в тканях между лопаток. Имплантат был окружен очень тонкой прозрачной капсулой без признаков воспаления. Прочность прикрепления имплантата к подлежащим тканям стала намного меньше, и он легко смещался относительно кожи и фасций. Визуально объем имплантированного материала не изменился, и имплантат все также имел острые края.

Овальные фрагменты имплантата были окружены тонкой плотной соединительнотканной капсулой с умеренно выраженной лейкоцитарной инфильтрацией с преобладанием лимфоцитов, за которой располагался тонкий слой склерозированных тканей, а затем — жировая ткань (рис. 2, а, б).

У фрагментов имплантата практически отсутствовали острые края, но небольшие гигантские клетки инородных тел и скопления макрофагов все же присутствовали в тканях рядом с капсулой.

Спустя 12 мес после операции имплантат из ПЛ все еще присутствовал в тканях межлопаточной области крыс. Толщина окружающей его капсулы варьировала от очень большой (2 наблюдения), через промежуточные формы (3 случая), вплоть до очень тонкой (1 наблюдение), практически полностью отсутствующей, и очень подвижной. В толстой капсуле наблюдались признаки воспалительной реакции, в первую очередь, гиперемия и спаянность с окружающими тканями.

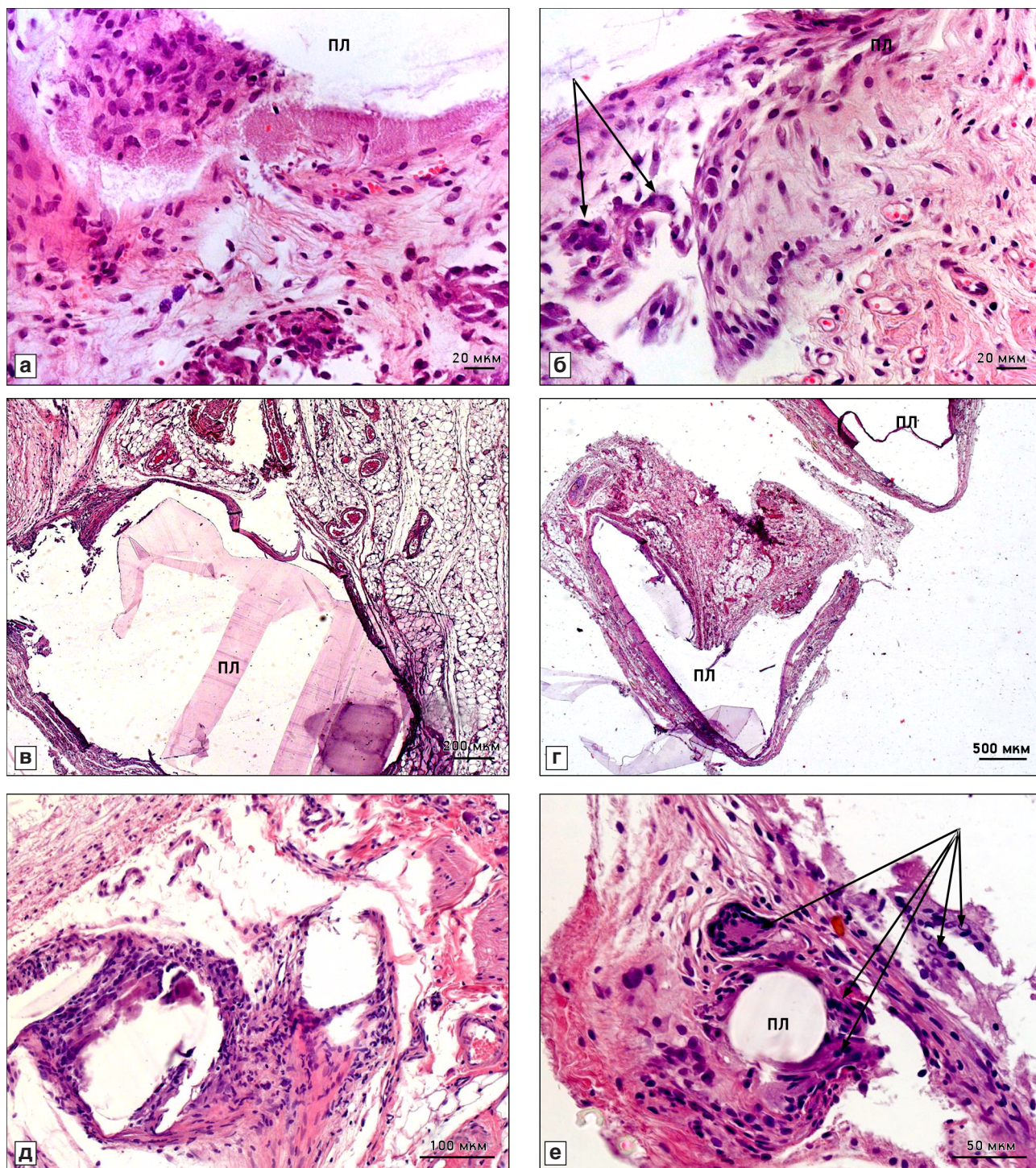


Рис. 1. Тканевые реакции в ранние сроки после помещения имплантата из полилактида (ПЛ) (а, б — 1 мес; в–е — 2 мес) в под-
кожную основу взрослой крысы.

а — соединительнотканная капсула вокруг инородного тела с множеством клеточных элементов; б — единичные гигантские клетки инородных тел (стрелки) в соединительнотканной капсуле, сформированной вокруг имплантата; в — имплантат деформирован и окружен тонкой капсулой из плотной соединительной ткани с минимальными воспалительными изменениями в окружающих тканях; г — фибрирование капсулы, окружающей имплантат, более выраженное в области его острых краев, там же более выражена лейкоцитарная инфильтрация; д — толстая капсула из плотной соединительной ткани с признаками фибрирования и лейкоцитарной инфильтрации, сформированная вокруг небольших фрагментов имплантата из ПЛ с острыми краями; окружающие ткани также в значительной степени склерозированы; е — небольшие фрагменты имплантата из ПЛ, окруженные толстой капсулой с макрофагальной инфильтрацией и гигантскими клетками инородных тел (стрелки). Окраска гематоксилином—эозином

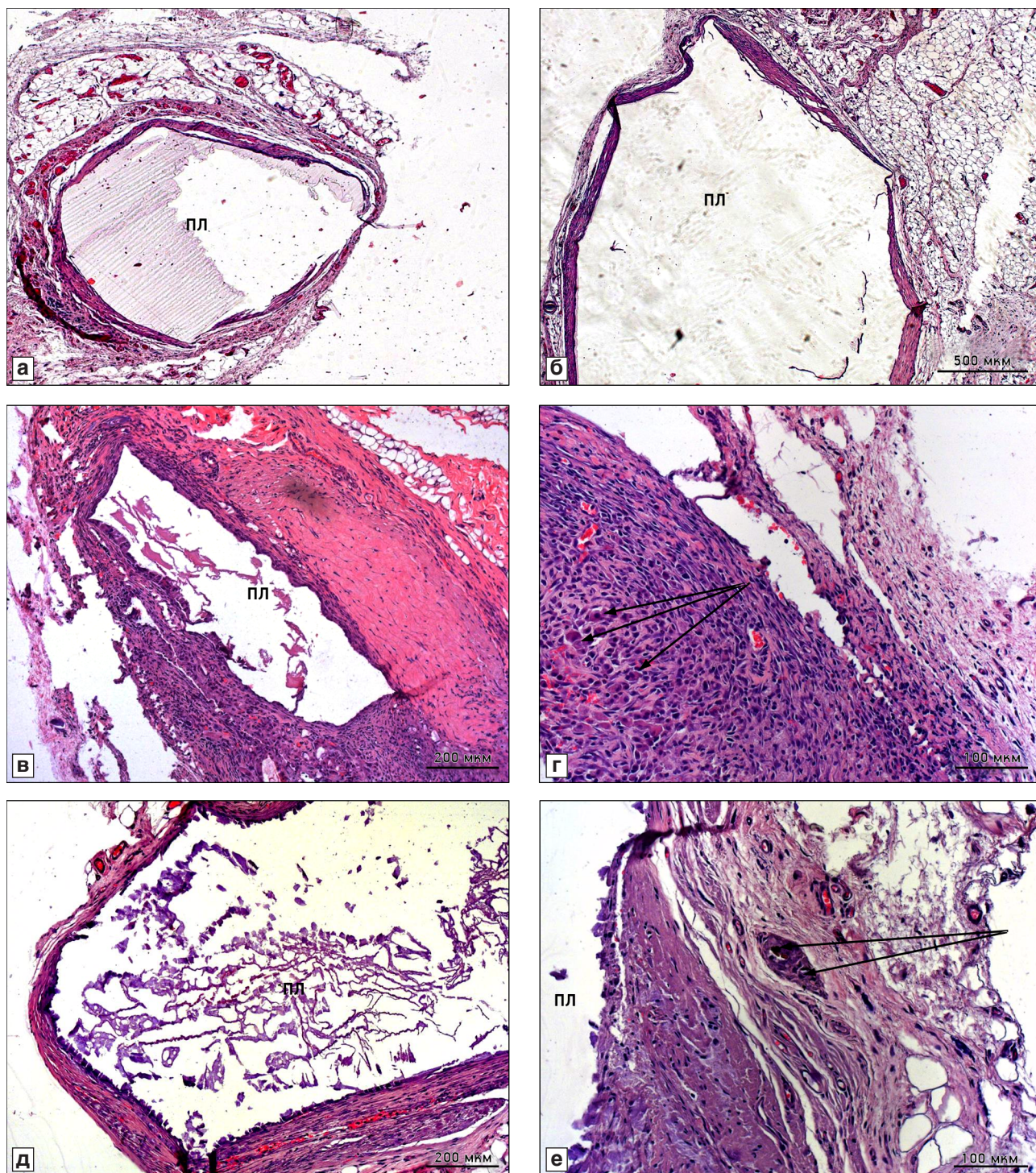


Рис 2. Тканевые реакции в поздние сроки (а, б — 6 мес; в–е — 12 мес) после помещения имплантата из полилактида (ПЛ) в подкожную основу взрослой крысы.

а — большой овальный фрагмент имплантата, окруженный тонкой плотной соединительнотканной капсулой, окружающие ткани склерозированы на небольшую глубину; б — тонкая соединительнотканная капсула практически без признаков воспаления вокруг крупного фрагмента имплантата; в — имплантат, покрытый толстым слоем фиброзной ткани, инфильтрированной лейкоцитами; окружающие ткани склерозированы на значительном протяжении; г — в толстой капсуле вокруг полимера множество лейкоцитов и небольшие гигантские клетки инородных тел (стрелки); д — инкапсулированная сеть остатков имплантата, фибрина и различных клеточных элементов, капсула сильно фиброзирована и инфильтрирована лейкоцитами; е — в капсуле вокруг остатков полимера и окружающих склерозированных тканях мелкие гранулемы, содержащие небольшие фрагменты имплантата и слившиеся многоядерные макрофаги (стрелки). Гематоксилин—эозин

Микроскопически толстая капсула имела отчетливо выраженные воспалительные изменения: лейкоцитарную инфильтрацию (лимфоцитарную и макрофагальную), грануляции, гигантские клетки инородных тел. Подкожная основа вокруг такой капсулы была также в большой степени склерозирована на значительную толщину. Имплантат часто был разделен на несколько крупных фрагментов, каждый из которых имел свою капсулу (см. рис. 2, в, г).

Имплантат из ПЛ в случае тонкой капсулы подвергался деградации и представлял собой его остатки, окруженные фибрином и различными клеточными элементами (в основном лимфоцитами и макрофагами). В капсуле также содержались слившиеся многоядерные макрофаги (см. рис. 2, д, е).

Обсуждение полученных данных. В литературе имеется множество сообщений о спонтанных смещениях, перемещениях, ротации и элиминации трансплантированных объектов [1, 5, 9]. При этом последний перемещается по раневому каналу к месту имплантации как к точке наименьшего сопротивления в результате сжатия капсулярными миофибробластами [1, 6, 12].

Скорее всего, имплантат, несмотря на свой состав из мономеров молочной кислоты и потенциальную легкую биodeградируемость, о которой широко сообщается в литературе [11, 20], при попадании в ткани организма сразу покрывается фибрином, как и другие инородные тела [2, 3]. Далее в фибрин мигрируют лейкоциты и фибробласты. Лейкоциты разжижают и лизируют фибрин, а фибробласты начинают синтез межклеточного вещества соединительной ткани, и инородное тело постепенно инкапсулируется [2, 3]. Макрофаги в этой капсуле при невозможности быстро лизировать имплантат сливаются и формируют многоядерные формы — гигантские клетки инородных тел, т.е. идет асептическая воспалительная реакция, вызванная присутствием инородного тела. Об этом же свидетельствуют мелкие кровеносные сосуды, входящие в состав грануляций.

Активность воспалительного процесса — очень невысокая, на что указывают тонкая капсула, слабая инфильтрация ее лейкоцитами, значительная васкуляризация капсулы, позднее формирование гигантских клеток инородных тел и их малочисленность.

Деформация инородных тел в организме происходит вследствие контракции капсулы в результате действия миофибробластов [1, 6, 12] для минимизации объема, занятого этими телами, или

смещения их к кожному разрезу с целью элиминации. Деформация может приводить к сгибанию и фрагментированию инородного тела [3].

Утолщение капсулы в области острых краев имплантата из ПЛ, скорее всего, также связано с контракцией капсулы под действием миофибробластов. Когда капсула сокращается, ее ткани травмируются об острые края инородного тела. Как реакция на травму развивается воспалительный процесс, в результате которого утолщается капсула для отграничения тканей организма от повреждающего фактора, и усиливается лейкоцитарная инфильтрация самой капсулы и окружающих тканей.

Формирование слившихся многоядерных макрофагов в капсуле и окружающих тканях в данных случаях, видимо, обусловлено наличием мелких частиц имплантата, которые попадают туда при его фрагментации при контракции капсулы.

Образование толстой капсулы из плотной соединительной ткани, инфильтрированной лейкоцитами, в некоторых случаях спустя 2 мес после операции, по-видимому, обусловлено тем, что фрагменты имплантата имеют острые края, которые сильнее травмируют окружающие ткани как сами по себе, так и при контракции капсулы [3]. Такая постоянная травматизация капсулы и тканей вокруг нее при ее разрывах приводит к склерозу окружающих тканей, утолщению капсулы и более выраженной воспалительной реакции: лейкоцитарной инфильтрации, образованию слившихся многоядерных макрофагов и значительному объему грануляций.

К 6 мес от начала опыта, видимо, воспалительная реакция на инородное тело уменьшается и, соответственно, сокращается толщина отграничивающей его капсулы, а также прочность ее прикрепления к окружающим тканям.

Возможно, что под действием лизосомальных ферментов макрофагов (возможен экзоцитоз ферментов лизосом фагоцитами [7, 10]) постепенно лизируются острые выступы на поверхности имплантата из ПЛ, который, согласно литературным данным, является быстро биodeградируемым полимером [11, 20]. Также не исключено, что острые выступы на поверхности инородного тела отламываются и сглаживаются при деформации его в результате сжатия капсулой [3].

После сглаживания поверхности имплантата и уменьшения численности его мелких фрагментов снижается степень травмирования капсулы и окружающих тканей, следствием чего является снижение интенсивности воспалительной реак-

ции, выраженности макрофагальной инфильтрации, постепенное уменьшение толщины капсулы и объема склерозированных тканей вокруг нее.

Резкое возрастание уровня воспалительной реакции в случае тонкой и в случае толстой капсулы к окончанию времени наблюдения, видимо, связано с уровнем деградации полимера. В том случае, когда имплантат фрагментирован макрофагами и сжатием капсулой (размягчение под действием ферментов макрофагов и разделение на несколько частей при деформации капсулой), образуются несколько фрагментов с острыми краями, каждый из которых травмирует ткани, повреждает капсулу и активирует воспалительный процесс.

Когда имплантат деградировал и представляет собой полужидкое или жидкое вещество, идет активное поглощение различных по величине цепочек имплантата как клетками (фагоцитами), так и методом диффузии через окружающие ткани в лимфатическое и кровеносное русло. Воспалительная реакция усиливается в результате миграции в такие участки лейкоцитов для поглощения инородного материала. Скорее всего, свой вклад вносит и повреждение тканей в результате закисления среды (мономеры и различные по длине полимеры молочной кислоты) [16], хотя другие исследователи отрицают такую возможность [8]. Оставшиеся твердыми фрагменты имплантата, в силу тех или иных причин устойчивые к деградации, вызывают формирование гигантских клеток инородных тел в капсуле или окружающих тканях.

Присутствие самого имплантированного материала и гигантских клеток инородных тел во все сроки наблюдения служит свидетельством того, что имплантат на основе молочной кислоты (ПЛ) не является в полной мере биodeградируемым и подвергается разрушению в течение длительного времени и в основном через лизис макрофагами. В литературе также содержатся данные об очень длительном лизисе ПЛ [14, 18, 19] и об активном участии в этом процессе макрофагов [13–15].

Таким образом, на основании изложенного, можно заключить, что большой имплантат из ПЛ инкапсулируется соединительной тканью. В тех случаях, когда его фрагмент имеет острые края, которые повреждают ткани при контракции капсулы, последняя становится более толстой с отчетливо выраженной воспалительной инфильтрацией и наблюдается склероз окружающих тканей. Если имплантат не имеет острых краев, капсула тонкая, воспаление минимальное. Во всех случаях в капсуле и рядом с ней присутствуют

гигантские клетки инородных тел. Постепенно у крыс в течение 6 мес активность воспалительного процесса снижается. Выраженность воспаления резко возрастает к 12 мес после имплантации, когда в результате действия ферментов фагоцитов и деформации капсулой имплантат из ПЛ или фрагментируется, или разжижается. Имеет место волнообразное течение воспаления. Сначала постепенное стихание, затем — по мере деградации полимера — воспалительная реакция может активизироваться. Материалы на основе ПЛ не являются в полной мере биodeградируемыми и сохраняются в организме длительное время.

ЛИТЕРАТУРА

1. Добрякова О. Б. и Ковынцев Н. Н. Аугментационная маммопластика силиконовыми эндопротезами. М., МОК ЦЕНТР, 2000.
2. Майбородин И. В., Егоров Д. В., Родишева Т. М. и др. Изменения тканей и регионарных лимфатических узлов крыс при хроническом воспалительном процессе в условиях применения интерлейкина-2. Морфология, 2011, т. 139, вып. 1, с. 43–48.
3. Майбородин И. В., Шевела А. И., Матвеева В. А. и др. Морфологические изменения тканей после имплантации упругих пластинчатых инородных тел в эксперименте. Морфология, 2012, т. 141, вып. 2, с. 54–60.
4. Alst van M., Eenink M. J., Krufft M. A. and Tuil van R. ABC's of bioabsorption: application of lactide based polymers in fully resorbable cardiovascular stents. *EuroIntervention*, 2009, v. 5, Suppl. F, p. F23–F27.
5. Baeke J. L. Breast deformity caused by anatomical or teardrop implant rotation. *Plast. Reconstr. Surg.*, 2002, v. 109, № 7, p. 2555–2564.
6. Coleman D. J., Sharpe D. T., Naylor I. L. et al. The role of the contractile fibroblast in the capsules around tissue expanders and implants. *Br. J. Plast. Surg.*, 1993, v. 46, № 7, p. 547–556.
7. Fredriksson M. I., Gustafsson A. K., Bergstrom K. G. and Asman B. E. Constitutionally hyperreactive neutrophils in periodontitis. *J. Periodontol.*, 2003, v. 74, № 2, p. 219–224.
8. Heidemann W., Jeschkeit S., Ruffieux K. et al. Degradation of poly(D,L)lactide implants with or without addition of calciumphosphates in vivo. *Biomaterials*, 2001, v. 22, № 17, p. 2371–2381.
9. Jorquera F., Gounot N., Lopez R. et al. Tolerance, reliability and efficiency of inflatable breast implants after breast reconstruction. Retrospective study of 101 consecutive cases. *Ann. Chir. Plast. Esthet.*, 2000, v. 45, № 2, p. 90–96.
10. Kanzler M. H. Basic mechanisms in the healing cutaneous wound. *J. Dermatol. Surg. Oncol.*, 1986, v. 12, № 11, p. 1156–1164.
11. Leiggener C. S., Curtis R., Müller A. A. et al. Influence of copolymer composition of polylactide implants on cranial bone regeneration. *Biomaterials*, 2006, v. 27, № 2, p. 202–207.
12. McLean A. L., Talmor M., Harper A. et al. Expression of cyclooxygenase-2 in the periprosthetic capsule surrounding a silicone shell implant in the rat. *Ann. Plast. Surg.*, 2002, v. 48, № 3, p. 292–297.

13. Niu C., Wang Z., Zuo G. et al. Poly(Lactide-co-glycolide) ultrasonographic microbubbles carrying Sudan black for preoperative and intraoperative localization of lymph nodes. *Clin. Breast Cancer*, 2012, v. 12, № 3, p. 199–206.
14. Raghoobar G. M., Liem R. S., Bos R. R. et al. Resorbable screws for fixation of autologous bone grafts. *Clin. Oral Implants Res.*, 2006, v. 17, № 3, p. 288–293.
15. Sena P., Manfredini G., Barbieri C. et al. Application of poly-L-lactide screws in flat foot surgery: histological and radiological aspects of bio-absorption of degradable devices. *Histol. Histopathol.*, 2012, v. 27, № 4, p. 485–496.
16. Shi X., Wang Y., Ren L. et al. Novel mesoporous silica-based antibiotic releasing scaffold for bone repair. *Acta Biomater.*, 2009, v. 5, № 5, p. 1697–1707.
17. Sinha B., Mukherjee B. and Pattnaik G. Poly-lactide-co-glycolide nanoparticles containing voriconazole for pulmonary delivery: in vitro and in vivo study. *Nanomedicine*, 2013, v. 9, № 1, p. 94–104.
18. Stockheim M., Most-Ehrlein S., Rothschenk H. J. and Wirbel R. Cartilage damage caused by a dislocated resorbable interference screw of poly(L-lactide) 46 months after anterior cruciate ligament reconstruction. *Z. Orthop. Unfall.*, 2010, v. 148, № 1, p. 44–48.
19. Walton M. and Cotton N. J. Long-term in vivo degradation of poly-L-lactide (PLLA) in bone. *J. Biomater. Appl.*, 2007, v. 21, № 4, p. 395–411.
20. Yang Y., Laporte de L., Zelivyanskaya M. L. et al. Multiple channel bridges for spinal cord injury: cellular characterization of host response. *Tissue Eng. Part A*, 2009, v. 15, № 11, p. 3283–3295.

Поступила в редакцию 10.01.2013
Получена после доработки 10.04.2013

TISSUE REACTIONS DURING THE DEGRADATION OF POLYLACTIDE IMPLANTS IN THE BODY

*I. V. Maiborodin, I. V. Kuznetsova, E. A. Beregovoy,
A. I. Shevela, M. I. Barannik, A. A. Manayev
and V. I. Maiborodina*

Tissue reactions, accompanying the degradation processes of polylactide (PLA) implants after their placement into the subcutaneous tissue, were studied by the methods of light microscopy in 6 month-old Wag rats (n=24) weighing 180–200 g. It was found that PLA implants became encapsulated by connective tissue. If the implant or its fragment had sharp margins that damaged the tissues, a thick capsule was formed with a distinct inflammatory infiltration and the sclerosis of the surrounding tissues. If the implant had no sharp margins, the capsule was thin, and the activity of inflammation was minimal. In all cases, the giant cells of foreign body type were present in the capsule and next to it. Gradually, during 6 months, the activity of inflammatory process subsided. Inflammation sharply increased 12 months after the implantation, when, as a result of effect of enzymes released by phagocytes and deformation by a capsule, PLA implants were either fragmented or is liquified. PLA-based materials are not totally biodegradable, and may persist in the body for a long time.

Key words: *polylactide, degradation, encapsulation, implantation, granulomatous inflammation*

The Center of New Medical Technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, RAS Siberian Branch, Novosibirsk