

© Коллектив авторов, 2011  
УДК 611.018:616.381-089.843-031:599.323.4

*И.В. Майбородин, А.И. Шевела, В.В. Анищенко, В.А. Матвеева, А.А. Шевела,  
М.Н. Дровосеков и В.В. Власов*

## ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ ТКАНЕЙ КРЫС НА ВНУТРИБРЮШИННЫЕ ИМПЛАНТАТЫ ИЗ БИОДЕГРАДИРУЕМОГО ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТА

Центр новых медицинских технологий (зав. — проф. А.И. Шевела), Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, e-mail: imai@mail.ru

Методами световой микроскопии изучена реакция тканей крыс через различное время после внутрибрюшинного введения имплантатов из биodeградируемых полигидроксиалканоев (И-ПГА). Обнаружено, что после введения И-ПГА в брюшную полость начинается активный спаечный процесс, приводящий к формированию фиброзных спаек между И-ПГА и петлями кишечника. На фоне введения И-ПГА в виде пленок происходит их окружение толстой фиброзной капсулой. В результате введения И-ПГА в виде ультратонких волокон образуются обширные гранулемы инородного тела с перифокальным воспалением и склерозом окружающих тканей. В этих гранулемах происходят фрагментация полимера и его фагоцитоз макрофагами с формированием гигантских клеток инородных тел. Сделано заключение, что И-ПГА не являются биodeградируемыми и вызывают такие же тканевые реакции, как и другие инородные тела.

**Ключевые слова:** *гранулематозное воспаление, инородное тело, имплантация, полигидроксиалканоев*

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.

Тканевый ответ на имплантацию инородного тела обычно включает в себя воспалительную реакцию. *In vitro* было показано, что лимфоциты могут влиять на способность макрофагов к адгезии к поверхности биоматериалов, но эти данные не подтвердились при исследовании на донорах. Сами макрофаги и гигантские клетки инородных тел могут синтезировать множество цитокинов и медиаторов при контакте с различными материалами имплантатов [13, 14]. Некоторые материалы могут индуцировать выброс провоспалительных цитокинов мононуклеарами периферической крови, не являясь поликлональным активатором CD4+ Т-лимфоцитов [11].

Задача создания новых имплантатов сводится к поиску максимально биоинертных материалов, достаточно прочных к сжатию капсулой и к фрагментированию и, при этом, сходных по эластичности с нормальными тканями организма [2].

Среди биополимеров особое место занимают биodeградируемые полигидроксиалканоев (ПГА) — полимеры гидроксипроизводных алкановых кислот (масляной, валериановой и др.), которые с середины 80-х годов активно изучают как материал, пригодный для хирургии, тканевой инженерии и создания биоискусственных органов.

ПГА могут представлять большой интерес для клинической медицины в связи с их механической прочностью, высокой биосовместимостью и медленной биodeградацией [3, 5, 17–19]

Цель настоящей работы — изучение местной реакции тканей в различные сроки после введения в брюшную полость имплантатов из биodeградируемого ПГА (полигидроксибутирата).

**Материал и методы.** Исследование проведено на самцах крыс линии Wag массой 180–200 г 6-месячного возраста. Все манипуляции с животными осуществляли под общим ингаляционным эфирным наркозом в условиях чистой операционной с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Имплантаты из ПГА (И-ПГА) в виде неперфорированной или перфорированной пленки, а также ультратонких волокон (авторские названия) были предоставлены для исследования Институтом биофизики СО РАН (г. Красноярск).

После обработки кожи спиртом производили разрез по срединной линии живота (лапаротомия) длиной 2–3 см. На расстоянии не менее 2 см от разреза справа со стороны брюшной полости к передней ее стенке (со стороны париетальной брюшины) И-ПГА фиксировали одним узловым швом, используя шовный материал капрофил (Джонсон и Джонсон, США). Перфорированную или неперфорированную пленку ПГА применяли в виде дисков диаметром 1 см (без острых углов). И-ПГА в виде ультратонких волокон размером, примерно, 1 см<sup>2</sup> вырезали ножницами *ex tempore*. Все имплантированные материалы были стерильными. Послеоперационную рану послойно ушивали непрерывными швами, кожу и кожные швы обрабатывали спиртом. Всего прооперировано 72 животных.

Спустя 4, 12, 18 сут и 1 мес после операции имплантированные материалы биопротировали вместе с окружающими тканями, фиксировали в 4% растворе параформальдегида

на фосфатном буфере (рН 7,4) не менее 24 ч, обезвоживали в серии этанола возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заливали в парафин. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином–эозином, по Ван-Гизону и по Романовскому, изучали под световым микроскопом Axioimager M1 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении до 1200 раз. На каждую временную точку эксперимента с каждым видом полимера исследовано по 6 крыс.

**Результаты исследования.** Через 4 сут после операции в тканях вокруг И-ПГА, независимо от вида имплантируемого материала, были обнаружены грануляции и явления острого воспалительного процесса, причем среди лейкоцитов, инфильтрирующих ткани, было очень много сегментоядерных нейтрофильных гранулоцитов (рисунок, а). Макроскопические явления разлитого или местного перитонита у всех животных отсутствовали.

В некоторых случаях к 12-м суткам все имплантаты были окружены очень толстой соединительнотканной капсулой (см. рисунок, б). К этому сроку в таких капсулах уже присутствовали признаки фиброобразования и крупные многоядерные макрофаги со слившейся цитоплазмой (гигантские клетки инородных тел) (см. рисунок, б). Однако значительно чаще вокруг имплантатов были отмечены отчетливо выраженная лейкоцитарная (лимфоцитарно-макрофагальная) инфильтрация тканей, развитие молодой грануляционной ткани (см. рисунок, в) и геморагии.

Спустя 18 сут после введения И-ПГА в виде пленок также было отмечено образование фиброзной капсулы со склерозом окружающих тканей, развитием грануляций и гранулем инородного тела (см. рисунок, г). После введения И-ПГА в виде ультратонких волокон имплантат был окружен толстой капсулой, в ее толще и между волокнами И-ПГА присутствовало множество различных по размеру гигантских клеток инородных тел.

Через 1 мес после введения И-ПГА в виде ультратонких волокон происходило формирование обширных гранулем инородного тела, окруженных толстой фиброзной капсулой (см. рисунок, д, е). В таких гранулемах были обнаружены мелкие фрагменты ПГА, поглощенные многоядерными макрофагами со слившейся цитоплазмой (см. рисунок, е).

После введения И-ПГА в виде перфорированной или неперфорированной пленки в большинстве наблюдений через 1 мес было отмечено склерозирование окружающих тканей и формирование грубой фиброзной капсулы вокруг инородного материала, которая деформировала И-ПГА (см. рисунок, ж, з). В толще таких капсул всегда присутствовали участки геморагий, в основном по краю имплантатов (см. рисунок, ж), и неболь-

шие гранулемы инородных тел. Иногда в капсуле и тканях вокруг нее были обнаружены макрофаги с бурными гранулами (см. рисунок, ж).

В единичных случаях после использования И-ПГА в виде пленок имелись обширные гранулемы инородного тела, окруженные фиброзной капсулой с фрагментацией и поглощением материала ПГА. Эти гранулемы на макро- и микроскопическом уровне выглядели практически так же, как и после имплантации ПГА, в виде ультратонких волокон.

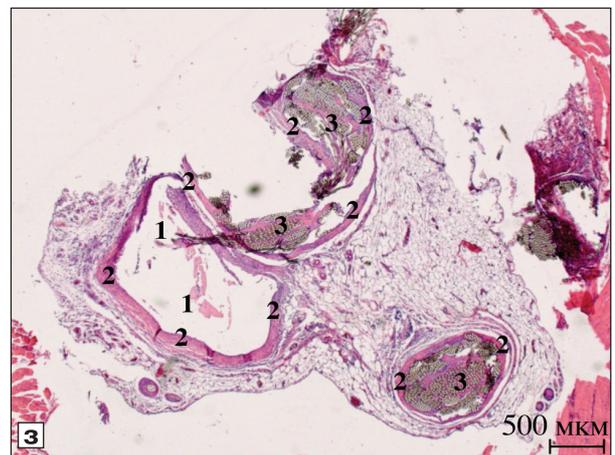
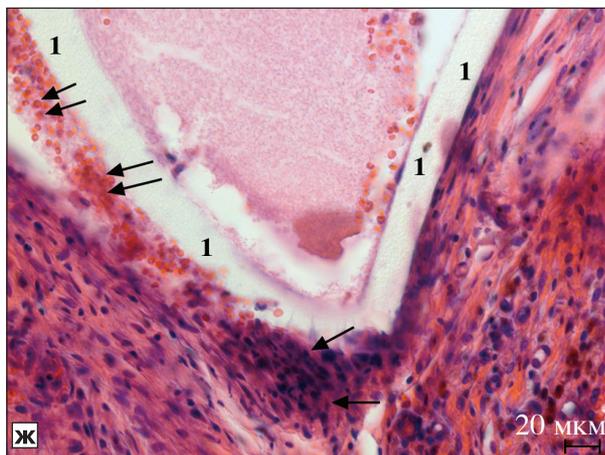
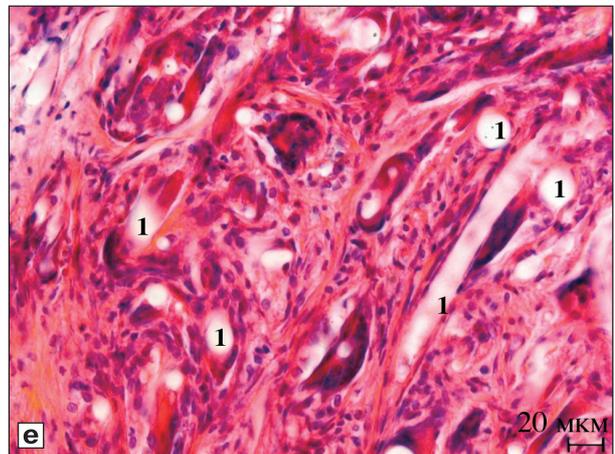
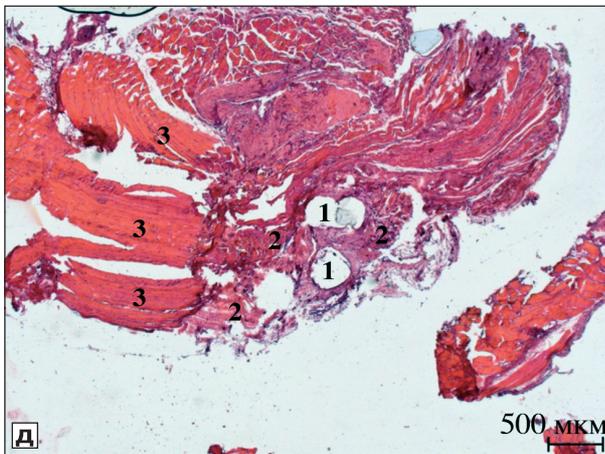
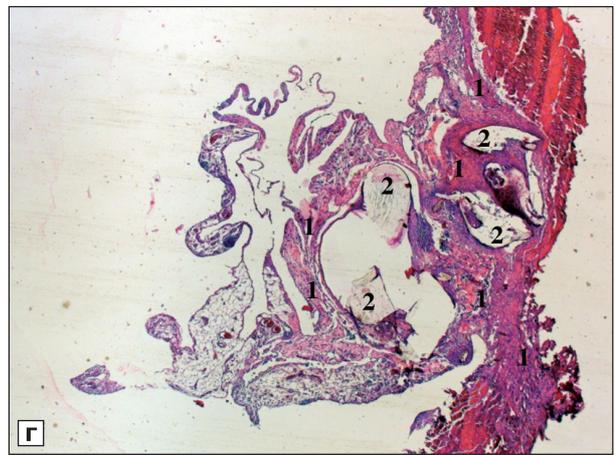
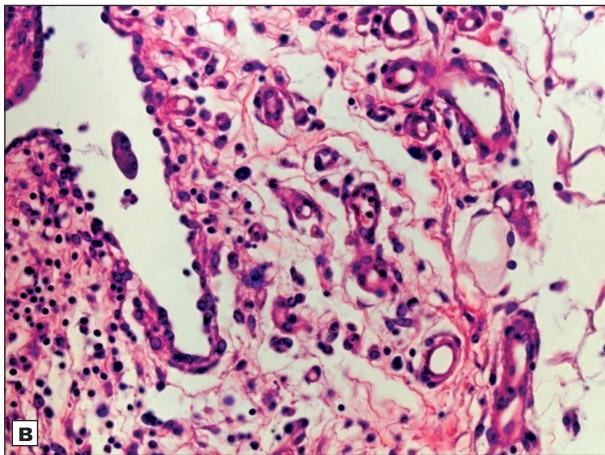
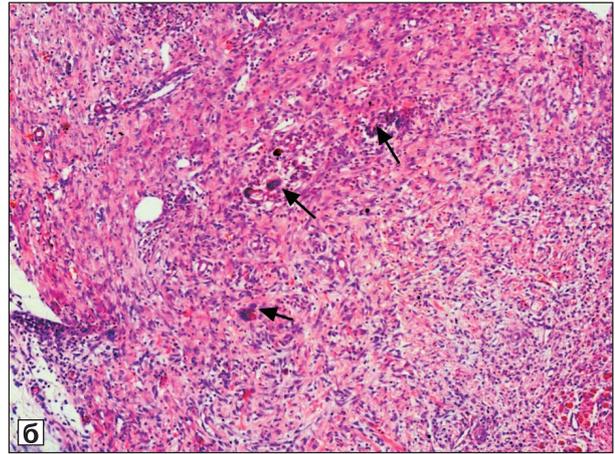
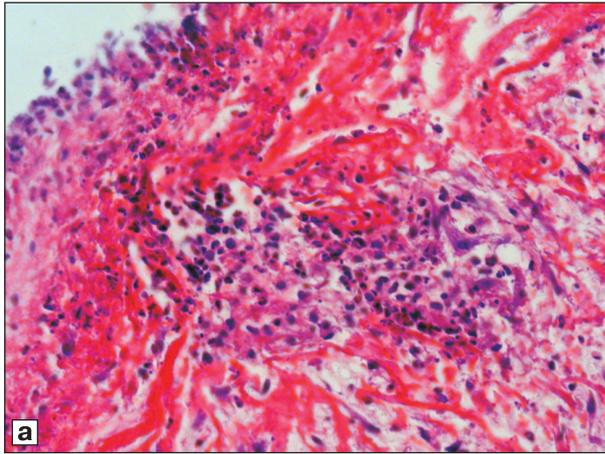
Необходимо обратить внимание на то, что в некоторых случаях рядом с И-ПГА находились нити шовного материала, окруженные тонкой капсулой, частично фрагментированные и окруженные соединительной тканью с явлениями умеренно выраженного гранулематозного воспаления. Степень выраженности воспалительной реакции и толщина капсулы вокруг шовного материала были значительно меньше, чем после введения И-ПГА (см. рисунок, з).

**Обсуждение полученных данных.** Формирование соединительнотканной капсулы вокруг И-ПГА обусловлено реакцией организма на инородное тело. При этом процесс заживления очень длителен из-за физического присутствия имплантата [2, 7, 10].

Последовательность реакций организма на введение чужеродного материала идентична, хотя их выраженность не одинакова. Первоначально стимулируется система свертывания крови и происходит активация тромбоцитов. Через несколько минут отмечают накопление лейкоцитов для нейтрализации инородного тела. Поскольку фагоциты не могут быстро разрушить материал имплантата, образуется макрофагальный вал, отграничивающий имплантат от окружающих тканей. Если нет гиперреактивности, фибробласты внутри окружают имплантат соединительной тканью в формирующейся грануле [10, 20].

Ткань большинства искусственных имплантатов и их плотных оболочек активно разрушается и поглощается фагоцитами [4, 7, 8]. При исследовании капсулярных и перикапсулярных тканей вокруг имплантатов были найдены их частицы, расположенные экстрацеллюлярно, в лизосомах гистиоцитов или в гранулемах инородных тел в окружающих тканях [2, 9, 12].

В разных местах быстрее или медленнее фагоциты разрушают поверхность имплантированного материала. На ней есть микрошероховатости, к которым прикрепляется коллаген. Благодаря действию миофибробластов и ферментов фагоцитов большие и маленькие микровыросты на поверхности имплантата вытягиваются еще больше и



постепенно или отшнуровываются, или отрываются от протеза. Далее эти фрагменты снова окружаются макрофагами и соединительной тканью, мигрируют за пределы капсулы и постепенно измельчаются до той степени, когда могут быть поглощены фагоцитами и элиминированы вместе с ними из организма [2].

Скорее всего, именно от скорости фрагментации И-ПГА после инкапсуляции зависит, будет ли он просто отграничен капсулой от тканей организма или активно поглощаться макрофагами с формированием обширных гранулем инородного тела.

Понятно, что после введения И-ПГА в виде ультратонких волокон, когда макрофаги могут быстро проникнуть между структурами инородного тела и не требуется их длительной фрагментации, гранулема инородного тела образуется намного раньше.

Здесь уместно задать вопрос: что происходит с мелкими фрагментами ПГА после поглощения их макрофагами? В данном случае возможно развитие событий по нескольким гипотетическим путям. Во-первых, разложение ПГА на мономеры и полная их деградация. Во-вторых, элиминация макрофагов вместе с ПГА из организма, например, через легкие или печень. В-третьих, гибель макрофагов из-за невозможности лизиса поглощенного материала в самих гранулемах инородного тела или в регионарных лимфатических узлах, фагоцитоз выброшенного ПГА другими макрофагами, снова деструкция их и т.д. Разрушение макрофагов, выход незализованного чужеродного синтетического материала с последующим его поглощением и гибелью других фагоцитов описаны при изучении судьбы некоторых других синтетических материалов: силикона [8], поливинилпирролидона, полиглюкина и реополиглюкина [1].

Высокая активность гранулематозного воспаления, формирование толстой капсулы с признаками фиброобразования после введения всех

видов ПГА в брюшную полость, скорее всего, являются неблагоприятными прогностическими признаками, указывающими на высокую вероятность развития в дальнейшем различных осложнений [6, 15, 16]. Кроме того, считаем необходимым отметить, что инкапсуляция фрагментов ПГА или образование обширных гранулем инородного тела свидетельствует не в пользу биodeградируемости указанных материалов, а наоборот, является доказательством их биоинертности. Материалы из ПГА ведут себя в живом организме точно так же, как и другие инородные тела: инкапсулируются соединительной тканью и, по мере их фрагментации, поглощаются макрофагами с развитием гранулематозного воспалительного процесса.

*Работа выполнена при финансовой поддержке программы Фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине» (проект № 21.31 «Разработка технологий управления процессами регенерации костных тканей с применением биodeградируемых полимеров»).*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гаврилин В.Н. и Шкурупий В.А. Влияние накопления поливинилпирролидона в синусоидальных клетках печени на характер токсического повреждения органа. Бюл. СО РАМН, 1995, № 2, с. 24–28.
2. Майбородин И.В., Ковынец Н.Н. и Добрякова О.Б. Нарушения микроциркуляции как причина капсулярной контрактуры после увеличивающей маммопластики. Хирургия, 2007, № 3, с. 49–53.
3. Шишацкая Е.И., Войнова О.Н., Горева А.В. и др. Реакция тканей на имплантацию микрочастиц из резорбируемых полимеров при внутримышечном введении. Бюл. экспер. биол., 2007, т. 144, № 12, с. 635–639.
4. Caffee H.H., Hardt N.S. and Torre la G. Detection of breast implant rupture with aspiration cytology. Plast. Reconstr. Surg., 1995, v. 95, № 7, p. 1145–1149.
5. Coskun S., Korkusuz F. and Hasirci V. Hydroxyapatite reinforced poly (3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) based degradable composite bone plate. J. Biomat. Sci. Polymer Ed., 2005, v. 16, p. 1485–1502.

Реакция тканей крыс вокруг полигидроксиалканоата (ПГА) в различные сроки после его интраперитонеальной имплантации.

а — участок нейтрофильной инфильтрации соединительной ткани вокруг перфорированной пленки ПГА через 4 сут после ее трансплантации; б — обширная соединительнотканная капсула с явлениями гранулематозного воспаления через 12 сут после имплантации ПГА (перфорированная пленка). Стрелки — гигантские клетки инородных тел в толще капсулы; в — лейкоцитарная (лимфоцитарно-макрофагальная) инфильтрация и развитие грануляционной ткани через 12 сут после имплантации ПГА в виде неперфорированной пленки; г — фиброзная капсула (1) со склерозом окружающих тканей, развитием грануляций и гранулем инородного тела спустя 18 сут после имплантации ПГА в виде перфорированной пленки. 2 — фрагменты имплантированного материала; д — обширная гранулема инородного тела, непосредственно примыкающая к мышцам передней брюшной стенки, через 1 мес после имплантации ПГА в виде ультратонких волокон. 1 — фрагменты имплантированного материала; 2 — фиброзная капсула; 3 — поперечнополосатая мышечная ткань; е — гранулема инородного тела вокруг мелких фрагментов ПГА, при имплантации имевшего вид ультратонких волокон, через 1 мес после операции. 1 — фрагменты имплантированного материала; ж — толстая фиброзная капсула, деформировавшая ПГА в виде перфорированной пленки спустя 1 мес после имплантации. В толще капсулы имеются геморагии и макрофаги с бурными включениями. Стрелки — участок фиброобразования капсулы; двоянные стрелки — кровоизлияния. 1 — фрагменты имплантированного материала; з — нити шовного материала, расположенные рядом с инкапсулированным ПГА, имплантированным в виде неперфорированной пленки через 1 мес после операции. 1 — фрагмент имплантированного материала; 2 — фиброзная капсула; 3 — шовный материал. Окраска гематоксилином–эозином. Ув.: а — 240; б — 180; в — 320; г — 70.

6. Englert H., Joyner E., McGill N. et al. Women's health after plastic surgery. *Intern. Med. J.*, 2001, v. 31, № 2, p. 77–89.
7. Ersek R.A. and Beisang A.A. 3rd. Bioplastique: a new textured copolymer microparticle promises permanence in soft-tissue augmentation. *Plast. Reconstr. Surg.*, 1991, v. 87, № 4, p. 693–702.
8. Greene W.B., Raso D.S., Walsh L.G. et al. Electron probe microanalysis of silicon and the role of the macrophage in proximal (capsule) and distant sites in augmentation mammoplasty patients. *Plast. Reconstr. Surg.*, 1995, v. 95, № 3, p. 513–519.
9. Hodgkinson D.J. Buckled upper pole breast style 410 implant presenting as a manifestation of capsular contraction. *Aesthetic Plast. Surg.*, 1999, v. 23, № 4, p. 279–281.
10. Kaiser W. and Zazgornik J. Does silicone induce autoimmune diseases? Review of the literature and case reports. *J. Rheumatol.*, 1992, v. 51, № 1, p. 31–34.
11. Miro-Mur F., Hindié M., Kandhaya-Pillai R. et al. Medical-grade silicone induces release of proinflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells without activating T cells. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 2009, v. 90, № 2, p. 510–520.
12. Raso D.S., Greene W.B., Harley R.A. and Maize J.C. Silicone deposition in reconstruction scars of women with silicone breast implants. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1996, v. 35, № 1, p. 32–36.
13. Rodriguez A. and Anderson J.M. Evaluation of clinical biomaterial surface effects on T lymphocyte activation. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 2010, v. 92, № 1, p. 214–220.
14. Rodriguez A., Meyerson H. and Anderson J.M. Quantitative in vivo cytokine analysis at synthetic biomaterial implant sites. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 2009, v. 89, № 1, p. 152–159.
15. Rouanet P., Duchene M. and Quenet F. Cancer update on breast reconstruction. *Bull. Cancer*, 2002, v. 89, № 1, p. 125–129.
16. Ruot-Worley J. Augmentation mammoplasty: implications for the primary care provider. *J. Am. Acad. Nurse Pract.*, 2001, v. 13, № 7, p. 304–309.
17. Shishatskaya E.I., Voinova O.N., Goreva A.V. et al. Biocompatibility of polyhydroxybutyrate microspheres: in vitro and in vivo evaluation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2008, v. 19, № 6, p. 2493–2502.
18. Sudesh K. Microbial polyhydroxyalkanoates (PHAs): an emerging biomaterial for tissue engineering and therapeutic applications. *Med. J. Malaysia*, 2004, v. 59, p. 55–66.
19. Volova T.G., Gladyshev M.I., Trusova M.Y. et al. Degradation of bioplastics in natural environment. *Dokl. Biol. Sci.*, 2004, v. 397, p. 330–332.
20. Zeller J.M. Surgical implants. Physiological response. *AORN J.*, 1983, v. 37, № 7, p. 1284–1291.

Поступила в редакцию 02.09.10  
Получена после доработки 10.12.10

#### THE PECULIARITIES OF RAT TISSUE REACTIONS TO INTRAPERITONEAL IMPLANTS MADE OUT OF BIODEGRADABLE POLYHYDROXYALKANOATES

*I.V. Maiborodin, A.I. Shevela, V.V. Anishchenko, V.A. Matveyeva, A.A. Shevela, M.N. Drovosekov and V.V. Vlasov*

The reaction of rat tissues to intraperitoneal placement of implants made out of biodegradable polyhydroxyalkanoates (PHA), was studied at different time points after the operation by the methods of light microscopy. It was found that after intraperitoneal PHA implant placement, the active adhesive process started leading to formation of fibrous adhesions between PHA implants and intestinal loops. When PHA implants were used in the form of films, they became surrounded by a thick fibrous capsule. As a result of PHA implant placement in the form of ultrathin fibers, the extensive foreign body granulomas with perifocal inflammation and sclerosis of surrounding tissues were formed. In these granulomas the polymer fragmentation and phagocytosis by macrophages with formation of giant cells of foreign body occurred. It is concluded that PHA implants are not biodegradable and induce tissue reactions similar to those caused by other foreign bodies.

**Key words:** *granulomatous inflammation, foreign body, implantation, polyhydroxyalkanoate*

Center of Modern Medical Technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk