

Исследование биосовместимости нанокompозитных конструкций на основе углеродных нанотрубок при имплантации в мышечную ткань

Аннотация

Продемонстрированы биосовместимость и длительность существования белково-углеродной дисперсии и нанокompозитных конструкций, сформированных лазерным излучением из дисперсии. Дисперсия и нанокompозитные конструкции имплантировались лабораторным птицам, и изучалась гистологическая картина места имплантации. Показано, что через 35 дней после имплантации образовывалась соединительнотканная капсула, имплантированный материал в жидком и твердом состояниях прорастал тяжами ткани. Через 90 дней после имплантации данный процесс прогрессировал и наблюдалась биорезорбция материала, преимущественно в виде твердой конструкции. При этом наблюдалась нормальная для такой операции локальная воспалительная реакция, которая выражалась в скоплении лейкоцитов, преимущественно лимфоидного ряда, и формировании мышечных волокон в области имплантации. Выявлен эффект постепенного рассасывания наноматериалов на фоне картины хронического воспаления и при отсутствии изменений в состоянии здоровья лабораторных птиц.

Введение

В условиях современной медицины наиболее актуальными проблемами являются недостаточное количество донорских органов, трудоемкость проведения имплантации и высокий риск отторжения имплантируемого материала. Одно из наиболее перспективных и безопасных решений – разработка искусственных материалов, с помощью которых возможно произвести полноценную замену поврежденных биотканей. Подходящие материалы должны быть схожи по физико-химическим характеристикам с заменяемой тканью, обладать биосовместимостью и быть биорезорбируемыми для стимуляции восстановления биоткани в поврежденном участке. Очень важным параметром имплантатов является скорость биодеградации, которая должна быть соизмерима со скоростью регенерации тканей в месте имплантации. Биоткани сердечно-сосудистой системы могут регенерировать в течение длительного периода времени – до 4-х месяцев, а иногда и более – при реконструкции стенок внутренних органов, например кровеносных сосудов или сердца.

Для решения вышеописанных проблем используются подходы биомедицинской наноинженерии, а именно технология лазерного наноструктурирования углеродных нанотрубок в биоорганических матрицах для создания 3D клеточно- и тканеинженерных конструкций (нанокompозитных конструкций). Нанотрубки имеют значительное сходство с компонентами внеклеточного матрикса и используются для создания медико-биологических наноматериалов с момента их появления [1]. В результате лазерного наноструктурирования формируются композитные наноматериалы на основе нанотрубок в биополимерных матрицах (альбумин, коллаген, хитозан); их физико-химические характеристики исследованы в работах [2]-[4]. Такие наноматериалы обладают высокими механическими (твердость ~ 300 МПа) и электрическими свойствами (удельная электропроводность ~ 1 См/м). Продемонстрировано положительное влияние нанокompозитных конструкций на пролиферацию клеток, распределенных по их объему [3], [5].

В настоящей статье приведены результаты исследования биосовместимости и длительности существования в организме нанокompозитных конструкций при их имплантации в мышечную ткань лабораторных птиц с последующим изучением гистологической картины места имплантации.

Экспериментальные исследования

В экспериментах использовались два типа образцов белково-углеродной дисперсии и объемных образцов нанокompозитных конструкций (рис. 1). Концентрация одностенных уг-

леродных нанотрубок составляла 0,01 % мас., концентрация альбумина – 25 % мас., остальное – деионизованная вода. Изготовление нанокompозитных конструкций осуществлялось путем лазерного отверждения белково-углеродной дисперсии по методике, описанной в [3]. При этом дисперсия облучалась непрерывным полупроводниковым лазером с длиной волны 810 нм до формирования твердого материала.

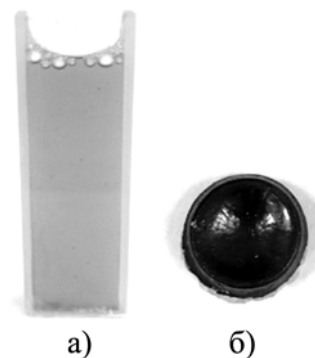


Рис. 1. Внешний вид белково-углеродной дисперсии (а) и нанокompозитной конструкции (б)

Перед имплантацией дисперсия и объемные образцы подвергались стерилизации с помощью ультрафиолетового облучения в течение 48 ч. Исследование биосовместимости образцов проводилось на лабораторных птицах – половозрелых петухах породы московская. Белково-углеродная дисперсия вводилась в мышцы латеральной области голени в объеме 0,5 мл. Перед введением кожный покров обрабатывался 70%-ным раствором этилового спирта. Вывод из эксперимента проводили по 3 птицы через 10, 14, 42 и 90 дней. Для имплантации нанокompозитных конструкций хирургическим скальпелем производился разрез мышц голени и грудной мышцы глубиной до 10 мм и длиной 15...20 мм. В разрез помещались конструкции размером ~ 5 мм по каждой из сторон, далее стенки хирургической раны фиксировались при помощи медицинского клея. Вывод из эксперимента проводился спустя 35 и 90 дней.

Для гистологического исследования были отобраны фрагменты ткани из области введения. Изготавливались желатиновые и парафиновые срезы и окрашивались красителями гематоксилином и эозином. На протяжении всего периода проведения эксперимента ухудшения здоровья подопытных птиц не наблюдалось. Также не наблюдалось изменений в потреблении корма и социальном поведении.

Результаты

Белково-углеродная дисперсия

Через 10 дней после введения белково-углеродной дисперсии на гистологических препаратах можно наблюдать, что в перимизии локализуются скопления нанотрубок. Наблюдается значительная инфильтрация клетками крови, из которых хорошо идентифицируются эритроциты, гранулоциты с ацидофильной зернистостью (псевдоэозинофилы и эозинофилы), а также клетки агранулоцитарного ряда в соединительной ткани вокруг и в самой массе препарата. Эритроциты и другие клетки крови лежат как в пределах кровеносных сосудов, так и вне сосудов, в соединительной ткани. В соединительной ткани наблюдается большое количество лейкоцитов, которые образуют вал вокруг препарата, и небольшое количество макрофагов с фагоцитированным материалом в цитоплазме. В целом гистологическая картина характерна для поздней стадии остро го воспаления (рис. 2).

Выраженная капсула из соединительной ткани появляется через две недели после введения препарата. Концентрация препарата продолжает оставаться достаточно высокой. Начинается консолидация лейкоцитов (преимущественно агранулярного ряда) в шаровидные структуры, которые располагаются между скоплениями препарата. В соединительной ткани очага и вокруг него обнаруживаются макрофаги, захватывающие частицы конструкции.

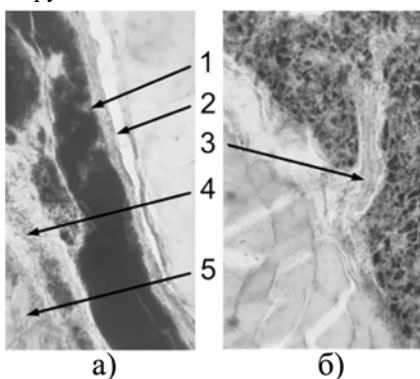


Рис. 2. Гистологическая картина места введения белково-углеродной дисперсии: а) через 10 дней при увеличении $\times 300$; б) через 90 дней при увеличении $\times 600$ (1 – частицы от дисперсии; 2 – капсула соединительной ткани; 3 – соединительнотканная тяга; 4 – клетки крови; 5 – мышечное волокно)

Через 42 дня в месте введения белково-углеродная дисперсия разделяется на отдельные небольшие конгломераты, между которыми можно увидеть лейкоциты, лежащие как диффузно, так и образуя шаровидные скопления. Кроме того, идентифицируются скопления осевших эритроцитов за пределами кровеносных сосудов. Лейкоциты с картиной фагоцитоза встречаются реже. Место введения препарата окружает соединительнотканная капсула. Такая картина характерна для хронического воспалительного процесса.

В конце максимального срока также наблюдаются скопления слипшихся эритроцитов. От соединительнотканной капсулы начинают активно прорастать внутрь препарата достаточно толстые тяжи рыхлой соединительной ткани (рис. 3). Фагоцитозы наблюдаются достаточно редко, шаровидные структуры из лейкоцитов агранулярного ряда и мононуклеарных макрофагов говорят о переходе воспалительного процесса в хроническую стадию. Можно говорить о гранулематозном воспалении с образованием неинфекционных гранулем. Согласно литературным источникам, такое воспаление может разрешаться либо рассасыванием гранулем, либо – при значительном развитии соединительнотканной капсулы – путем склерозирования очага [6], [7].

Объемные нанокompозитные конструкции

На гистологических препаратах, изготовленных с использованием желатиновой и парафиновой заливок, конструкция

идентифицируется в виде отдельных скоплений черного цвета. Через 35 дней гистологическое исследование биоткани в области голени показало, что размер введенного образца значительно уменьшился – примерно на 40...50 %. За истекший период нанокompозитная конструкция разделилась на фрагменты и представляла собой островки, окруженные и инфильтрованные различными типами клеток, преимущественно лейкоцитами агранулоцитарного ряда и другими макрофагами (рис. 3а).

В тканях, окружающих область имплантации, наблюдаются разрастание соединительной ткани и инкапсуляция наноматериала. На препаратах хорошо видны пучки волокон и аморфное межклеточное вещество с клетками, характерными для соединительной ткани (фибробластами). В соединительную ткань капсулы обильно прорастают кровеносные сосуды. Соединительнотканная волокна (тяжи) начинают обнаруживаться в скоплении лейкоцитов в области введения конструкции. На рис. 3а показано, что в окружающей мышечной ткани наблюдаются нормальные при имплантации изменения отдельных мышечных волокон, которые выражаются в перерождении и замещении саркоплазмы части мышечных волокон соединительной тканью, в некоторых случаях лейкоцитарной массой. Также наблюдается повышенное содержание лейкоцитов в эндомизии (прослойках соединительной ткани между отдельными мышечными волокнами). Среди лейкоцитов в месте введения препарата идентифицируются группы клеток, фагоцитировавших частицы нанокompозитной конструкции.

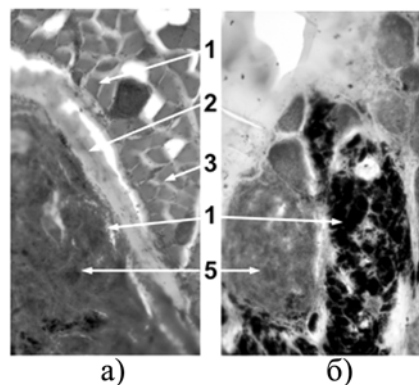


Рис. 3. Гистологическая картина места имплантации нанокompозитной конструкции при увеличении $\times 100$ через 35 (а) и 90 (б) дней после имплантации в область голени лабораторных птиц (1 – мелкие частицы нанокompозитной конструкции; 2 – капсула соединительной ткани; 3 – мышечные волокна; 4 – перерожденные мышечные волокна; 5 – скопления агранулоцитов)

Через 90 дней наблюдалось значительное уменьшение объема нанокompозитной конструкции. Вокруг места введения препарата присутствовала соединительнотканная капсула, внутри области имплантации проросло намного большее число прослоек соединительной ткани, которые были значительно толще, чем наблюдались на более ранних гистопрепаратах (рис. 3б). Между фрагментами конструкции были видны лейкоциты с фагоцитированными частицами в цитоплазме (рис. 4). Наблюдалось постепенное уменьшение объема имплантата в течение 3-х месяцев, вероятно, за счет фагоцитирования его лейкоцитами и другими макрофагами. Постепенно происходило уменьшение инфильтрации лимфоидной тканью, фрагментами конструкции, но наблюдалась консолидация лейкоцитов в крупные шарообразные структуры, подобные лимфатическим фолликулам.

Поскольку наблюдались преимущественно клетки агранулоцитарного ряда (лимфоциты и моноциты) и происходило разрастание соединительной ткани, можно сказать, что наблюдалась стадия хронического воспаления. Такая гистологическая картина вполне типична для имплантационных крупных и плотных материалов на таком сроке. Хроническое воспаление возникает как следствие остро го воспаления в том случае,

если в организме находится инородный имплантат, а учитываемая достаточно большие размеры композитного материала, который имплантировался в мышцу, и достаточно медленный процесс его рассасывания, хроническое воспаление, видимо, становится неизбежным процессом при регенерации мышечной ткани.

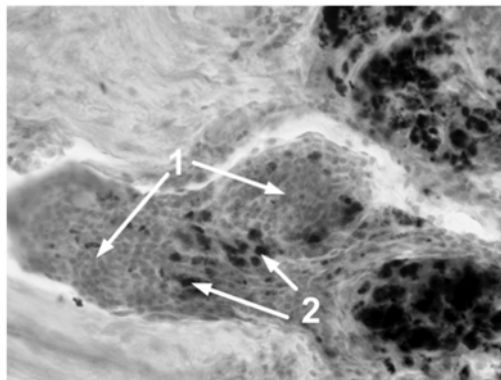


Рис. 4. Лейкоциты с фагоцитированными частицами нанокompозитной конструкции в цитоплазме через 90 дней при увеличении $\times 400$ (1 – скопления агранулоцитов; 2 – лейкоциты с фагоцитированными частицами в цитоплазме)

Заключение

В ходе проведения исследования установлено, что с течением времени, после имплантации в живой организм, наблюдается уменьшение объема белково-углеродной дисперсии вплоть до небольших остатков и значительное уменьшение твердых образцов нанокompозитной конструкции. Кроме того, для конструкций наблюдалась картина локальной воспалительной реакции. Также было отмечено формирование соединительнотканной капсулы вокруг места введения препарата с последующим прорастанием прослоек соединительной ткани вглубь очага. Обнаруженное локальное хроническое воспаление происходило на фоне отсутствия изменений состояния здоровья лабораторных птиц. Таким образом, было показано, что нанокompозитные конструкции способствуют биорезорбции мышечной ткани и могут существовать в организме более 90 дней. Следовательно, такие конструкции могут использоваться в качестве клеточных матриц для осуществления долгосрочной терапии, например при лечении заболеваний сердечно-сосудистой системы, таких как инфаркт миокарда, аневризма и других нарушений архитектоники биотканей.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (14.578.21.0234, RFMEFI57817X0234.). Экспериментальные исследования выполнялись с использованием оборудования ЦКП МСТ и ЭКБ. Авторы выражают благодарность профессорам С.В. Селищеву, В.М. Подгаецкому и С.А. Терещенко за дискуссию и полезные советы.

Список литературы:

- Hirata E., Uo M., Nodasaka Y., Takita H., Ushijima N., Akasaka T., Watari F., Yokoyama A. 3D collagen scaffolds coated with multiwalled carbon nanotubes: Initial cell attachment to internal surface // Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. 2010. Vol. 93B (2). PP. 544-550.
- Ichkitidze L.P., Gerasimenko A.Yu., Podgaetsky V.M., Selishchev S.V., Dudin A.A., Pavlov A.A. Electrical conductivity of the nanocomposite layers for use in biomedical systems // Materials Physics and Mechanics. 2018. Vol. 37 (2). PP. 140-145.

- Gerasimenko A.Yu., Glukhova O.E., Savostyanov G. V. Laser structuring of carbon nanotubes in the albumin matrix for the creation of composite biostructures // Journal of Biomedical Optics. 2017. Vol. 22 (6). P. 065003.
- Ichkitidze L.P., Selishchev S.V., Gerasimenko A.Yu., Podgaetsky V.M. Mechanical Properties of Bulk Nanocomposite Biomaterial // Biomedical Engineering. 2016. Vol. 49 (5). PP. 308-311.
- Privalova P.Yu., Gerasimenko A.Yu., Zhurbina N.N., Petukhov V.A., Pyankov E.S., Ichkitidze L.P., Suetina I.A., Mezentseva M.V., Russu L.I. Electrical Stimulation of Human Connective Tissue Cells on Layers of Composite Structures with a Nanocarbon Framework // Biomedical Engineering. 2018. Vol. 52 (5). PP. 8-10.
- Белкин Б. Патоморфологическая диагностика болезней животных. – М.: Аквариум, 2013. 231 с.
- Жаров А.В. Патологическая анатомия животных. – СПб.: Лань, 2013. 608 с.

Александр Юрьевич Герасименко,
канд. физ.-мат. наук, доцент,
начальник лаборатории,
ФГБОУ ВПО «НИУ «МИЭТ»,
г. Зеленоград, г. Москва,
Первый Московский государственный
медицинский университет им. И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения РФ,
г. Москва,
Анна Эдуардовна Семак,
канд. с.-хоз. наук, доцент,
Надежда Геннадьевна Черепанова,
ст. преподаватель,
Алексей Сергеевич Комарчев,
канд. с.-х. наук, доцент,
Российский государственный аграрный
университет – МСХА им. К.А. Тимирязева,
г. Москва,
Дарья Константиновна Соколова,
студент,
ФГБОУ ВПО «НИУ «МИЭТ»,
г. Зеленоград, г. Москва,
Валентин Сергеевич Бояркин,
студент,
Первый Московский государственный
медицинский университет им. И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения РФ,
г. Москва,
Иван Владимирович Пьянов,
канд. физ.-мат. наук, доцент,
Леван Павлович Ичкитидзе,
канд. физ.-мат. наук, доцент,
ст. научный сотрудник,
ФГБОУ ВПО «НИУ «МИЭТ»,
г. Зеленоград, г. Москва,
Первый Московский государственный
медицинский университет им. И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения РФ,
г. Москва,
e-mail: gerasimenko@bms.zone