

Влияние модуля Юнга полиуретановых имплантатов на иммунную реакцию организма

Аннотация

Синтезирован ряд полиуретанов с низким модулем упругости для имплантации мягких тканей. Полиуретановые образцы были имплантированы мышам на 7 дней, после чего были проведены гистологические исследования образовавшейся капсулы. Показано, что механические свойства полиуретана влияют на иммунный ответ организма в местах около имплантата, где возникают специфические условия концентрации биомеханических напряжений в тканях, в частности около торцов полиуретановых пленок. Более мягкий полиуретан с модулем упругости, наиболее близким к модулю упругости тканей, практически не вызывает реакции на биомеханические напряжения, тогда как реакция на инородную поверхность имплантата остается.

Искусственные кардиоваскулярные имплантаты, применяемые в современной практике, позволяют значительно увеличить число спасенных жизней пациентов. Однако существующие проблемы иммунного ответа организма на внедрение «инородного тела» оставляют значительную часть пациентов неоперабельной. Особенно это касается пациентов пожилого возраста, когда очень часто кардиоваскулярные проблемы отяжелены букетом различных заболеваний и методы медикаментозного угнетения иммунной системы пациента неприменимы. Для таких пациентов решение проблемы регулирования иммунной реакции на внедрение имплантата является жизненно важным.

Одним из важных требований биосовместимости тканей организма с искусственным имплантатом является совместимость биомеханических свойств [1]-[3]. Сертифицированные к применению материалы для кардиоваскулярных имплантатов не обеспечивают полной совместимости их биомеханических свойств с мягкими тканями. Так, например, модуль Юнга широко применяемых полиуретанов фирмы «Доу Кемикл» (США) составляет десятки и сотни мегапаскалей в зависимости от марки полиуретана, тогда как модуль Юнга тканей варьируется от десятков до сотен килопаскалей [4]-[7].

В рассматриваемой работе синтезирован и исследован ряд полиуретанов с уменьшенным модулем Юнга на основе компонентов, применяемых для сертифицированных полиуретанов. Синтезированные полиуретановые материалы испытаны методами циклического механического нагружения, и полученные параметры сопоставлены с механическими параметрами мягких тканей организма. Полученные образцы полиуретанов были имплантированы в организм мелких животных (мышей), и были проведены гистологические исследования тканей, окружающих имплантированные образцы.

Для синтеза полиуретана использовались компоненты фирмы «Сигма-Элдридж» (США). Полиуретан синтезировали из форполимера на основе полипропиленгликоля с концевыми гидроксильными группами, терминированными 2,4-толуилендиизоцианатом. Концентрация концевых изоцианатных групп составляла 3,2 %. Форполимер смешивали с политетрагидрофураном (ПТГФ) или полиэтиленгликолем (ПЭГ) в сухой атмосфере в боксе при влажности 2...3 % и температуре 23 °С в течение 5 мин и наносили на нужные формы из стекла и тефлона. Соотношение изоцианатных и гидроксильных групп составляло 1:0,35; 1:0,5 и 1:0,7. Реакция отверждения проводилась в боксе 3 дня в заданных условиях, после чего полученный полиуретан отжигали в вакуумном термощкафу при температуре 120 °С и давлении 0,01 атм. Затем форму с полиуретаном погружали в гептан (растворитель, сертифицированный для медицинского применения) до равновесного набухания полиуретана. После этого полиуретан отслаивали от стеклянной формы и сушили на воздухе до полного удаления растворителя, что детектировалось методом ИК-спектроскопии. Затем полученный имплантат отмывали в деионизованной воде и снова сушили на воздухе. При сушке полиуретан защищали от попадания пыли из воздуха.

Полученный полиуретан исследовали методами ИК-спектроскопии на присутствие изоцианатных групп, методами ме-

ханического разрушения – на эластичные и прочностные свойства, набуханием в трибутилфосфате и формамиде – на формирование трехмерной шивки, выдержкой в водном растворе – на присутствие и выделение непрореагировавших примесей, на гидролизную стабильность – в водных растворах при повышенной температуре, на токсичность – методами клеточных культур.

Для механических испытаний вырезали образцы полиуретана толщиной 0,8 мм, шириной 1 см и длиной 5 см. Образцы полиуретана стабилизировались в лаборатории в течение 24 ч при температуре 23 °С и относительной влажности воздуха 70 %. Для каждого типа полиуретана вырезали несколько образцов. Вырезанные образцы анализировали на видимые дефекты и отбирали лучшие 3 образца с однородной структурой по всему объему образца для испытаний. Образцы испытывали на разрывной машине «Инстрон 5943» (США) с датчиком на 100 Н. Перед измерением измерительный датчик калибровали по стандартной методике. Образцы закрепляли в зажимах гидравлического типа, обеспечивающих отсутствие проскальзывания образца во время нагрузки и разрыва образца около зажима. Образцы полиуретана нагружали при постоянной скорости движения зажима 500 мм/мин до 100 % относительной деформации и обратно с такой же скоростью до 0 % относительной деформации. Такой цикл повторяли 3 раза, после чего полиуретан нагружали до точки разрыва образца. Диаграмму нагрузки анализировали для получения параметров образцов: прочности при разрыве, удлинению при разрыве, модулю Юнга при 10 и 100 % относительной деформации и остаточной деформации. Результаты измерений для каждого типа полиуретана усредняли с определением стандартного отклонения.

Все исследованные полиуретаны имеют нелинейную кривую растяжения, соответствующую эластомерным материалам. Относительная деформация при разрыве характерна для таких материалов в области сотен процентов. Вместе с тем, материалы показывают достаточно большие остаточные деформации от 10 (ПТГФ-0,35) до 30 % (ПЭГ-0,7), что сравнимо с остаточными деформациями некоторых мягких тканей организма (до 100 %). Модули упругости полученных материалов варьируются от 120 (ПЭГ-0,7) до 400 кПа (ПТГФ-0,35), что сравнимо или даже равно модулям упругости, характерным для мягких тканей организма (100 кПа). Вместе с тем, прочность материалов достаточно высокая (1 МПа для ПТГФ-0,35), что позволит использовать данные материалы для изготовления имплантатов. Для полиуретанов на основе ПЭГ наблюдается явная зависимость модуля упругости и остаточных напряжений от рецептуры материала. Наименее упругий материал с наибольшими остаточными деформациями наблюдается при соотношении изоцианатных и гидроксильных групп компонентов полиуретана 0,7. Наиболее жесткие полиуретаны с наименьшими остаточными напряжениями получены на основе ПТГФ. Полиуретан с наибольшей механической прочностью получен при соотношении изоцианатных и гидроксильных групп компонентов полиуретана 0,35. Все полученные полиуретаны показали присутствие трехмерной полимерной сетки и стабильность в растворах, имитирующих среду организма.

Для экспериментов с животными вырезали диски полиуретана толщиной 0,3 мм и диаметром 5 мм. Образцы стерилизовали непосредственно перед операцией в спиртовом растворе и сушили в стерильной атмосфере. В экспериментах использовались серые мыши (самцы, серия С57В1/6). Средний вес мыши составлял 20 г. Перед операцией выдерживался карантин в течение 2 недель с контролем физиологического состояния животных согласно протоколу наблюдения за лабораторными животными. Операции проводили в один день на всех животных. Животным вводили анестетик Авертин из расчета 125 мкг на 1 г веса животного. Спинка животного была побрита и обработана Бетадином для стерильности. Полиуретановые образцы вставляли подочно в 6 карманов, расположенных на спинке животного вдоль позвоночника. На разрез накладывали один шов шелковыми хирургическими нитями.

После операции мышей помещали в отдельные боксы, обеспеченные пищей и водой, и наблюдали в течение первого дня ежечасно и потом каждодневно в течение всего времени эксперимента с регистрацией наблюдений по протоколу наблюдения за лабораторными животными.

Животные выходили из наркоза примерно в течение 1 ч. В первый день их активность была заторможена. В дальнейшем операционные нарушения исчезли на следующий день после операции. Все животные восстановили активность, прием пищи и питья. Расположение разрезов на спинке не позволяло расчесывать швы, и нарушений швов не наблюдалось.

После 7 дней животным проводили эвтаназию. Образцы полиуретанов с окружающими тканями размерами 10 × 10 × 10 мм вырезали и немедленно помещали в 75%-ный раствор этанола при температуре 4 °С на ночь.

На следующий день образцы помещали в 96%-ный раствор этанола на 4 ч при температуре 4 °С. Затем образцы помещали в автоматический процессор гистологических образцов и запускали программу обработки образцов. Образцы выдерживали в 70%-ном растворе этанола 40 мин, 80%-ном растворе этанола 40 мин, 95%-ном растворе этанола 40 мин, 100%-ном растворе этанола 1 ч и потом 1,5 ч при смене раствора, в ксиле 1 и 1,5 ч при смене раствора. Затем образцы заливали расплавленным парафином под вакуумом при 60 °С по 1,5 ч каждый раз при смене парафина. Залитые парафином и охлажденные до комнатной температуры образцы нарезали на микро-томе стеклянным ножом на слайды толщиной 5 мкм. Нарезанные слайды наносили на стеклянные пластинки для микроскопии из водяной ванны при температуре 45 °С. Слайды сушили 24 ч при температуре 37 °С и затем использовали для гистологического анализа.

Окрашивание тканей на слайдах проводили гематоксилином и эозином. Для этого образцы были депарафинизированы в ксиле: 2 раствора ксилена по 10 мин. Затем образцы были гидратированы в растворах этанола последовательно в 100, 95 и 70 % по 2 мин в каждом растворе, а затем в воде 2 мин. Для окрашивания образцы опускали в раствор гематоксилина на 3 мин, промывали водой, опускали в 70%-ный раствор соляной кислоты в этаноле 3 раза, выдерживали в растворе реактива Скотта 30 с, отмывали в воде. После этого качество окрашивания проверяли под микроскопом. Качественные образцы погружали в 70%-ный раствор этанола, затем в раствор эозина 2 раза по 30 с, затем образцы дегидрировали в растворах этанола последовательно в 70, 95 и 100%-ном растворах. Окончательно образцы выдерживали в растворе ксилена 2 раза по 10 мин каждый раз, сушили и фиксировали канадским бальзамом.

Микрофотографии гистологических образцов были сделаны на микроскопе «Nicon» (Япония). Для анализа микрофотографий использовали программное обеспечение «Image J Pro Plus 7» (США) с макросом для гистологического анализа. Имплантаты располагали в центре области фотографирования, но при нарезке слайдов образцы полиуретана удалялись ножом микро-тома вследствие их высокой эластичности по сравнению с тканями организма. Однако в некоторых случаях отдельные кусочки полиуретана оставались в слайде. Они были заметны по слабому равномерному окрашиванию в сравнении

с сильным структурированным окрашиванием тканей организма.

Анализ тканей около имплантатов показывает отсутствие токсичности имплантатов: некротические образования в тканях не наблюдаются, капсула около имплантата четко выделенная, гигантских клеток в капсуле и окружающих тканях не наблюдается. Усредненная толщина капсулы остается одинаковой (в пределах стандартного отклонения) для различных типов полиуретанов (табл. 1). Для сравнения приведена толщина капсулы около имплантата, изготовленного из полиэтилена низкого давления как стандартного сертифицированного материала для имплантатов. Толщина капсул синтезированных имплантатов и полиэтилена одинаковая в пределах погрешности эксперимента.

Таблица 1

Толщина капсулы (а), усредненная по всей поверхности имплантата

	ПТГФ-0,35	ПТГФ-0,5	ПЭГ-0,5	ПЭГ-0,7	ПЭНП
а, мкм	102 ± 21	95 ± 18	88 ± 14	104 ± 13	100 ± 11

Однако толщина капсулы в разных местах около имплантата различается. В тканях, контактирующих с плоской стороной имплантата, толщина капсулы минимальна для всех типов полиуретанов. Но со стороны торцов имплантатов реакция тканей более выражена и толщина капсулы значительно больше (до 200 мкм). Для понимания причины различия реакции тканей необходимо рассмотреть геометрию имплантата и окружающих тканей.

Подкожное введение имплантата в виде пленки раздвигает слои соединительной ткани, мышц и кожи так, что с торцов имплантата образуется область деформирования окружающих тканей. Клетки ткани в этом месте оказываются под большим биомеханическим напряжением, чем соседние клетки. В свою очередь, биомеханические напряжения в тканях вызывают нарушения в клетках вплоть до лизиса клеток, что ведет к продолжительной реакции иммунной системы и в итоге к формированию более толстой капсулы. Максимальные значения биомеханических напряжений связаны с геометрией и упругостью имплантата. При одинаковых геометрических параметрах пленок максимальные напряжения будут определяться модулем упругости пленки полиуретана и его остаточными напряжениями.

Для исследованных полиуретанов толщина в торцевых областях имплантатов различная. Для полиуретанов на основе ПТГФ различия в толщине капсулы для разного соотношения изоцианатных и гидроксильных групп компонентов полиуретана незначительны. Это соответствует небольшому различию модуля Юнга и остаточных деформаций данных полиуретанов в зависимости от рецептуры.

Для полиуретанов на основе ПЭГ толщина капсулы более значительно зависит от рецептуры. Для полиуретана с соотношением изоцианатных и гидроксильных групп 0,7 толщина капсулы на торцах пленок практически такая же, как толщина капсулы, контактирующей с плоской поверхностью пленки. Данный полиуретан имеет наименьший модуль Юнга из всех исследуемых полиуретанов и наибольшие остаточные деформации.

Для анализа клеток окружающих тканей были сделаны микрофотографии гистологических образцов с большим увеличением. В тканях, прилегающих к поверхности имплантатов, хорошо заметны макрофаги и формирующие капсулу фиброциты. Присутствие данных клеток объясняется иммунной реакцией организма на внедрение «инородного тела». Тучные клетки как более активная фаза реакции не наблюдаются для всех типов полиуретановых имплантатов. Это показывает, что полиуретаны не провоцируют интенсивную реакцию организма. Для сопоставления реакции клеток тканей на синтезированные полиуретаны был сделан анализ реакции тканей на коммерческий полиуретан фирмы «Эрапол» (Австралия). Ре-

акция клеток иммунной системы на коммерческий и вновь синтезированные полиуретаны одинаковая.

Таким образом, синтезированы полиуретаны с разными механическими свойствами, и проведены гистологические исследования влияния рецептуры полиуретанов и их механических свойств на иммунную реакцию организма. Показано, что механические свойства полиуретана влияют на иммунный ответ организма в местах около имплантата, где возникают специфические условия концентрации биомеханических напряжений в тканях, в частности около торцов полиуретановых пленок. Более мягкий полиуретан с модулем упругости, наиболее близким к модулю упругости тканей, практически не вызывает реакции на биомеханические напряжения, тогда как реакция на инородную поверхность имплантата все же остается.

Данные исследования были поддержаны грантами РФФИ № 16-48-590767_р_Урал_а и субсидии (гранта) Пермского края (соглашение № С-26/057 от 11 марта 2016 г.).

Список литературы:

1. Kannan R. Y., Salacinski H. J., Butler P. E., Hamilton G., Seifalian A. M. Current status of prosthetic bypass grafts: A review // Journal of Biomedical Materials Research. В. Applied Biomaterials. 2005. Vol. 74. PP. 570-581.
2. Ballyk P. D., Walsh C., Butany J., Ojha M. Compliance mismatch may promote graft-artery intimal hyperplasia by altering suture-line stresses // Journal of Biomechanics. 1998. Vol. 31. PP. 229-237.
3. Holst J., Watson S., Lord M. S., Eamegdool S. S., Bax D. V., Nivison-Smith L. B., Kondyurin A., Ma L., Oberhauser A. F., Weiss A. S., Rasko J. E. J. Substrate elasticity provides mechanical signals for the expansion of hemopoietic stem and progenitor cells // Nature Biotechnology. 2010. Vol. 28. PP. 1123-1128.
4. Akhtar R., Sherratt M. J., Cruickshank J. K., Derby B. Characterizing the elastic properties of tissues // Materials Today. 2011. Vol. 14. № 3. PP. 96-105.

5. Ahn B., Kim J. Measurement and characterization of soft tissue behavior with surface deformation and force response under large deformations // Medical Image Analysis. 2010. Vol. 14. PP. 138-148.
6. Bergstrom J. S., Boyce M. C. Constitutive modelling of the time-dependent and cyclic loading of elastomers and application to soft biological tissues // Mechanics of Materials. 2001. Vol. 33. PP. 523-530.
7. Wells S. M., Walter E. J. Changes in the Mechanical Properties and Residual Strain of Elastic Tissue in the Developing Fetal Aorta // Annals of Biomechanical Engineering. 2010. Vol. 38 (2). PP. 345-356.

*Ирина Викторовна Кондюрина,
аспирант,
Сиднейская школа медицины,
Университет Сиднея, Сидней, Австралия,
Вячеслав Сергеевич Чудинов,
аспирант,
Институт механики сплошных сред
Уральского отделения РАН –
филиал ФГБУН «Пермский федеральный
исследовательский центр
Уральского отделения РАН,
Виктор Николаевич Терпугов,
канд. техн. наук, доцент,
кафедра механики сплошных сред
и вычислительных технологий,
ФГБОУ ВО «Пермский государственный
национальный исследовательский университет»,
г. Пермь,
Алексей Викторович Кондюрин,
канд. техн. наук, сеньор исследователь,
Сиднейская школа физики,
Университет Сиднея, Сидней, Австралия,
e-mail: terpugov@psu.ru*

**Международное научно-техническое общество приборостроителей и метрологов (МНТО ПМ) –
издатель журнала «ПРИБОРЫ»**

Международное научно-техническое общество приборостроителей и метрологов издает отраслевой научно-технический и производственный журнал «ПРИБОРЫ», отражающий состояние современного российского рынка приборостроительной продукции, интересы предприятий и потребителей, результаты деятельности разработчиков новых изделий и систем автоматизации, аналитические обзоры состояния этой сферы науки, техники и производства. Журнал ориентирован на широкий круг специалистов промышленности, предпринимателей, работников фирм и вузов, заинтересованных в систематическом получении актуальной и достоверной информации о выпускаемых в России и странах СНГ приборах и средствах автоматизации, о новых изделиях, предлагаемых потребителям, а также о действующих нормативных документах и рекомендациях. Журнал публикует материалы о новых методах измерений, сбора и представления измерительной и контрольной информации, новых конструкторских и технологических решениях, новых технологиях и материалах, составляющих основу создания новой конкурентоспособной продукции, осуществляет систематические публикации материалов по созданию и эксплуатации систем автоматизации различного назначения для отраслей промышленности, науки, по информационным технологиям, программно-техническим комплексам. Публикуется информация о профиле и продукции отдельных приборостроительных предприятий, их новых разработках, производственных и технологических возможностях и интересах. Тесные связи нашего Общества и редакции с Международной конфедерацией по измерениям (ИМЕКО) позволяют постоянно знакомить наших читателей с материалами этой весьма авторитетной международной профессиональной организации.

Журнал зарегистрирован в ВАК РФ как научное издание.

Журнал выходит 12 раз в год и распространяется по подписке.
Индекс журнала в каталоге Агентства «Роспечать» – 79727.

В редакции можно оформить льготную подписку на 2019 год.
Стоимость годовой подписки (12 экз.) – 14400 руб.

Заявки принимаются по тел./факсу: (495) 695-10-71
или по e-mail: kavalerov@mail.ru.

Более подробная информация о журнале «Приборы» – на сайте: www.pribory-smi.ru.