

ВИВЧЕННЯ БІОДЕГРАДАЦІЇ БІОАКТИВНИХ ПОЛІМЕРІВ ЯК ПОТЕНЦІЙНИХ ІМПЛАНТАЦІЙНИХ МАТЕРІАЛІВ

Досліджено вплив модельних середовищ і внутрішнього середовища організму експериментальних тварин на процес біодеградації потенційних імплантаційних матеріалів на основі олігоєфіруретандіізоціанату з іммобілізованим лікарськими речовинами. Поліуретанові зразки з іммобілізованим піроксикамом характеризуються швидким і динамічним перебігом процесу біодеградації. Іммобілізація ізоніазиду на поліуретані призводила до стабільності структури полімерних зразків під час перебування в організмі впродовж тривалого часу. Показано, що біоактивні полімерні матеріали є біосумісними та викликають запальні реакції в місці імплантації за типом асептичного запалення.

Ключові слова: поліуретан, ізоніазид, піроксикам, біологічна активність, біодеградація.

Створення нових біоактивних полімерних матеріалів для застосування в медичній практиці як імплантаційного матеріалу потребує дотримання цілої низки обов'язкових вимог [1]. Серед основних виділяють питання біосумісності полімерних імплантатів, а також проблему їх біодеградації. Імплантати тимчасової дії повинні поступово руйнуватися в організмі та одночасно замінюватися новими тканинними структурами. Відповідно, два процеси, що протікають *in vivo* при імплантації, – деградація матеріалу та відновлення дефекту тканини чи органа – взаємопов'язані, часто проходять із заданими швидкостями, які залежать від природи та хімічної структури самого імплантату, рівня його мікрогетерогенності та інших факторів. За класичною схемою біодеградацію імплантатів поділяють на неклітинну і клітинну [2]. До першого типу належить неферментативний гідроліз та механодеструкція. До клітинного типу руйнувань зараховують всі інші процеси, пов'язані з дією клітинних елементів, які беруть активну участь в утилізації продуктів розпаду біоматеріалу, проявляючи фагоцитарну активність, та є основним джерелом активних форм кисню, ферментів. Тому актуальним і важливим є з'ясування процесу біодеградації полімерних імплантатів як *in vitro*, так й *in vivo*.

Метою роботи було провести детальне вивчення процесу біодеградації біоактивних полімерних імплантатів на основі сітчастого поліуретану після їх перебування в модельних середовищах, що моделюють фізіологічні умови, та після імплантації в організм експериментальних тварин.

Вихідним продуктом для отримання поліуретанових композицій був олігоєфіруретандіізоціанат, отриманий при взаємодії поліоксіпропілен-

гліколю з толуїлендіізоціанатом. Для надання полімерному матеріалу біологічної активності була проведена іммобілізація лікарських речовин – піроксикаму та ізоніазиду. Відомо, що піроксикам належить до класу нестероїдних протизапальних препаратів та застосовується для лікування різних патологічних станів, що супроводжуються запаленням. Ізоніазид належить до протитуберкульозних препаратів, механізм його дії пов'язаний з пригніченням дихання мікобактерій туберкульозу. Також відома здатність ізоніазиду блокувати активність ферментів (пролілгидроксилази та лізілоксидази) біосинтезу колагену, таким чином впливаючи на розвиток місцевого запального процесу [3].

Як об'єкти досліджень використовували такі полімерні зразки: поліуретанові без лікарських речовин як контрольні, поліуретанові з іммобілізованим піроксикамом (2 % ваг.) та поліуретанові з іммобілізованим ізоніазидом (4 % ваг.).

Біодеградацію полімерних зразків оцінювали за зміною їхніх основних фізико-механічних показників до і після інкубації в модельних середовищах, а також після імплантації в організм експериментальних тварин. Дослідження здійснювали за допомогою модернізованої розривної машини 2166 Р-5. Похибка вимірювання границі міцності (σ) не перевищувала $\pm 0,253$ МПа, а відносного подовження (ϵ) $\pm 0,13$ %.

Зразки полімерів у вигляді смужок розміром $5 \times 50 \times 0,4$ мм поміщали в стерильні пробірки, заливали 30 мл модельного середовища, герметично закривали і витримували в термостаті за температури $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ протягом 30, 90 та 180 діб, періодично замінюючи розчини модельних середовищ свіжоприготовленими. Модельними середовищами були обрані такі:

Таблиця 1. Фізико-механічні властивості полімерних зразків після їх інкубації в модельних середовищах

Модельне середовище	Контроль		Термін інкубації, діб					
			30		90		180	
	σ, МПа	ε, %	σ, МПа	ε, %	σ, МПа	ε, %	σ, МПа	ε, %
<i>Поліуретан без лікарської речовини</i>								
Середовище 199	10,08	1796	10,64	1287	12,83	1172	10,85	1088
Хімотрипсин	10,08	1796	11,54	1366	12,3	1554	10,88	1698
Реактив Фентона	10,08	1796	11,47	1369	13,34	1135	10,96	1294
<i>Поліуретан з 2 % ваг. піроксикаму</i>								
Середовище 199	8,37	1217	9,25	1082	9,74	931	8,22	656
Хімотрипсин	8,37	1217	9,71	1143	10,37	1246	8,48	1215
Реактив Фентона	8,37	1217	9,65	928	10,89	793	8,31	621
<i>Поліуретан з 4 % ваг. ізоніазиду</i>								
Середовище 199	5,23	771	7,41	787	6,07	612	5,53	641
Хімотрипсин	5,23	771	4,49	616	7,56	896	5,67	763
Реактив Фентона	5,23	771	6,18	692	6,17	533	5,83	470

- біологічне середовище 199 (за хімічним складом моделює плазму крові);
- 0,01 % буферний розчин протеолітичного ферменту – хімотрипсину в 0,1 М розчині Na_2HPO_4 та KH_2PO_4 при рН 8,0;
- реактив Фентона – розчин сильно розбавленого пероксиду водню (H_2O_2) та солі дво-валентного заліза ($\text{FeSO}_4 \cdot x \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), що моделює умови запального процесу при контакті матеріалу з кров'ю.

Паралельно проводили імплантацію полімерних смужок розміром $5 \times 50 \times 0,4$ мм в організм лабораторних шурів. Через 30, 90 та 180 діб тварин виводили з експерименту, діставали полімерні зразки, промивали їх дистильованою водою та сушили за кімнатної температури.

Результати фізико-механічних досліджень полімерних зразків після їхнього перебування в модельних середовищах протягом різних термінів вказано в табл. 1.

Випробування контрольних поліуретанових зразків до інкубації в модельних середовищах показало, що введення лікарської речовини у структуру поліуретану призводило до зміни фізико-механічних характеристик досліджуваних композицій. Особливо значне зниження показників міцності при розриві та відносного подовження в 2,0 та 2,3 рази відповідно спостерігалось в поліуретанових зразках з ізоніазидом. Введення піроксикаму в структуру поліуретану також призводило до зменшення фізико-механічних показників, але не такого суттєвого. Зменшення основних фізико-механічних показників можна пояснити наявністю лікарської речовини у складі поліуретану, ймовірним розпушенням полімерних ланцюгів, а отже, послабленням міжмолекулярних водневих зв'язків.

При інкубації поліуретанових зразків у модельних середовищах найсильнішу гідролітичну

дію мало середовище 199 та реактив Фентона. При інкубації поліуретану без лікарської речовини в цих середовищах показник відносного подовження знижувався з 1796 до 1088 та 1294 відповідно. Показник міцності при розриві дещо зростав для тієї ж серії зразків протягом усього терміну дослідження. При інкубації поліуретанових зразків з піроксикамом в середовищі 199 та реактиві Фентона спостерігалось незначне збільшення показника міцності при розриві та зменшення показника відносного подовження майже удвічі. Для поліуретанових зразків з ізоніазидом спостерігалось збільшення показників міцності при розриві, а також зменшення відносного подовження для зразків, що перебували в середовищі 199 та реактиві Фентона. Інкубація поліуретанових зразків із піроксикамом та ізоніазидом у буферному розчині хімотрипсину навпаки призводила до збільшення показника міцності при розриві та порівняної стабільності показника порівняного подовження. Тобто, хімотрипсин мав інгібуючий вплив на біодеградацію полімеру, що узгоджується з даними [див.: 2].

Після імплантації полімерних зразків без лікарської речовини, із піроксикамом та ізоніазидом в організм експериментальних тварин було виявлено, що порівняне подовження зменшувалося у всіх зразках, а міцність при розриві дещо зростала (табл. 2).

Таким чином, у процесі біодеградації в полімерному матеріалі відбувався перерозподіл надмолекулярних структур, при якому тип цих структур залишався таким самим, але змінювалися розміри глобулярних частинок. У модельних середовищах, ймовірно, відбувалася організація великих, можливо, гідрофобних фрагментів деструкції у великі глобулярні утворення, що позначалося на збільшенні деяких фізико-механічних показників.

Таблиця 2. Фізико-механічні властивості полімерних зразків після їх імплантації в організм експериментальних тварин

Зразок	Контроль (без імплантації)		Термін імплантації, дб					
			30		90		180	
	σ , МПа	ϵ , %	σ , МПа	ϵ , %	σ , МПа	ϵ , %	σ , МПа	ϵ , %
Поліуретан без лікарської речовини	10,08	1796	12,80	1612	12,42	1358	11,44	1237
Поліуретан з 2 % ваг. піроксикаму	8,37	1217	7,36	1038	7,74	651	6,38	373
Поліуретан з 4 % ваг. ізоніазидом	5,23	771	4,91	489	5,83	437	4,77	421

Для детальнішого вивчення розподілу лікарської речовини у структурі поліуретану та процесу біодеградації поліуретанових зразків з 2 % ваг. піроксикаму та з 4 % ваг. ізоніазиду під дією модельних середовищ та внутрішнього середовища організму були проведені мікроскопічні дослідження. Піроксикам рівномірно розподілявся у структурі поліуретану (рис. 1, *a*), при імплантації в організм експериментальних тварин спостерігався швидкий та динамічний процес руйнування полімерних зразків, який проявлявся «розтріскуванням» полімеру (рис. 1, *б*), що відмічалось вже через 30 дб після імплантації. Через 180 дб після імплантації «розтріскування» ставало масштабнішим і спостерігалось по всій площі полімерних зразків. Інкубація полімерних зразків із піроксикамом у модельних середовищах не призводила до таких руйнувань, а виражалась в зовсім незначній локальній деградації, «розтріскування» як в імплантованих зразках майже не спостерігалось. Мікроскопічні дослідження показали, що ізоніазид також однорідно розподілявся в структурі поліуретану. Поліуретанові зразки з ізоніазидом характеризувалися більш повільним протіканням процесу біодеградації як в модельних середовищах, так і в організмі експериментальних тварин, на відміну від зразків, що містили піроксикам. У зразках з ізоніазидом не відбувалося «розтріскування» та значних змін у структурі поліуретану навіть після 90 дб імплантації (рис. 1, *в*).

При імплантації полімерний матеріал піддавали клітинній резорбції за рахунок активності фагоцитарних фрагментів, а також механічним навантаженням, що сприяло видаленню продуктів деструкції з маси полімеру та призводило до зменшення основних фізико-механічних показників.

За даними гістологічного аналізу виявилось, що навколо поліуретану з піроксикамом уже через 7 дб сполучнотканинна капсула була тонкою та зрілою (рис. 2, *a*), у той час як процес дозрівання капсули й зменшення виразності запальної реакції в контрольній групі прогресував тільки на 14-ту добу після імплантації (рис. 2, *б*). При імплантації зразків поліуретану з піроксикамом на ранніх термінах відмічалися запальні явища, пов'язані з операційною травмою, котрі майже

повністю нівелювалися вже до 14-тої доби дослідження. Такі реакції закономірні на ранніх термінах і послідовно змінюються, а саме зменшуються площі інфільтратів, своєчасно редується судинне русло, що завершується утворенням зрілої сполучної тканини навколо імплантата без явищ хронічного запалення. На фоні дозрівання сполучнотканинної капсули у контрольній групі (поліуретанові зразки) дещо увиразнювалася запальна реакція за рахунок появи вогнищ лейкоцитарної інфільтрації, що склалися з поліморфно-ядерних лейкоцитів, макрофагів і лімфоцитів. Пізніше відбувалося збільшення кількості колагенових волокон і стабілізація тканинної реакції на імплантат.

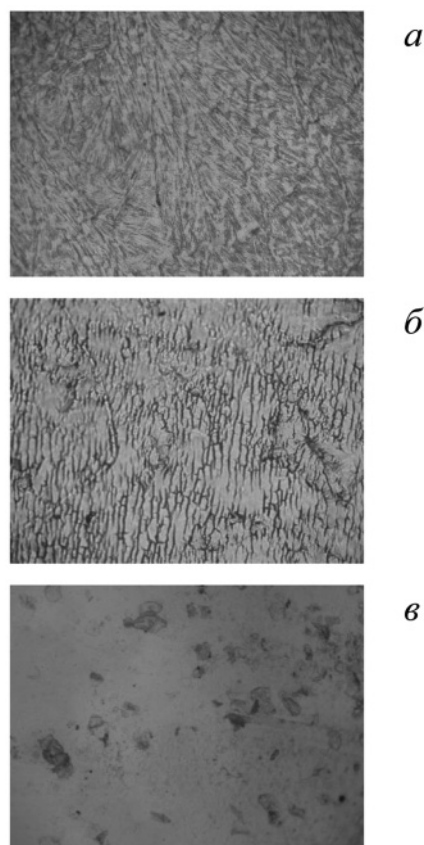
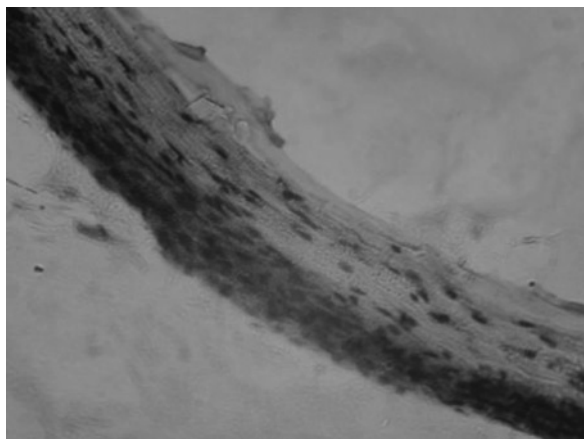
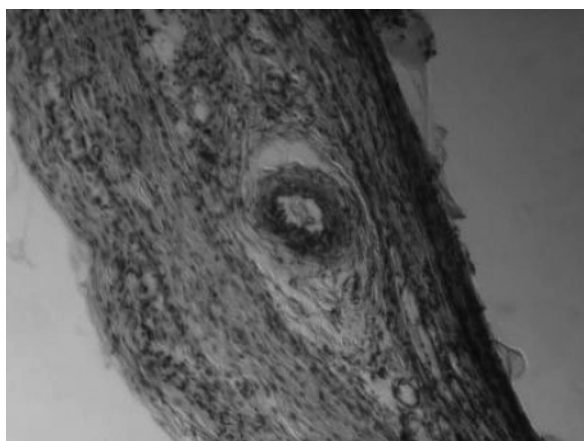


Рис. 1. Мікрофото біоактивних полімерних зразків, $\times 150$: *a* – рівномірний розподіл піроксикаму в структурі поліуретану; *б* – біодеградація поліуретану з 2 % ваг. піроксикаму після 90 дб імплантації; *в* – біодеградація поліуретану з 4 % ваг. ізоніазиду після 90 дб імплантації



а



б

Рис. 2. Гістологічна картина навколо імпантованих полімерних зразків: *а* – тонка і зріла сполучнотканинна капсула навколо поліуретанових зразків з піроксикамом на 14-ту добу експерименту. Забарвлення пікрофуксином за Ван-Гізоном, X280; *б* – товста сполучнотканинна капсула з великою кількістю кровоносних судин навколо поліуретану без вмісту лікарських речовин через 30 днів після імплантації, X150

Навколо поліуретанових зразків з ізоніазидом спостерігалася досить виражена, тривала (до 1 місяця) реакція за типом асептичного запалення. При цьому клітинний склад сполучнотканинної капсули свідчив про досить добру переносимість полімерного матеріалу з пролонгованим вивільненням ізоніазиду. Треба зазначити, що навколо поліуретанових зразків з ізоніазидом відбувалася значно виразніше макрофагальна реакція, ніж навколо контрольних зразків. Саме велику кількість макрофагів (клітин мезенхімального походження, здатних до активного захоплення та перетравлення чужорідних для організму часток) було зафіксовано як у самій сполучнотканинній капсулі, так і в навколишній щодо полімерного матеріалу сполучній тканині (рис. 3).

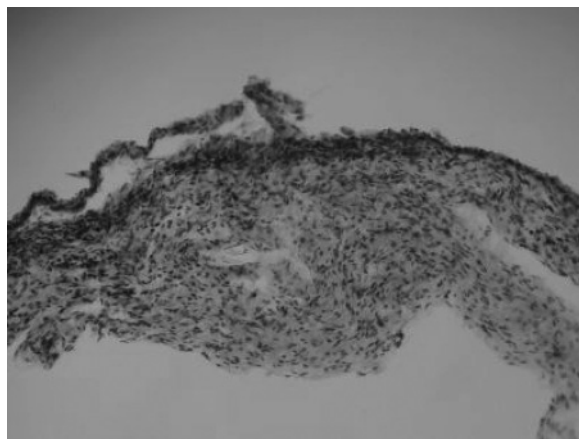


Рис. 3. Круглоклітинна інфільтрація навколо поліуретанових зразків з ізоніазидом через 7 днів після імплантації. Забарвлення гематоксилін-еозином, X150

Таким чином, досліджувані полімерні матеріали з піроксикамом у перші три доби після операції сприяли зменшенню явищ альтерації та ексудації, що призводило до прискорення процесів регенерації та формування сполучнотканинної капсули, яка вже через 30 днів після операції характеризувалася високим ступенем зрілості. Гістологічні дослідження показали, що навколо поліуретанових зразків з ізоніазидом спостерігалася досить виражена, тривала (до 1 місяця) реакція за типом асептичного запалення. Ізоніазид, іммобілізований на сітчастому поліуретані, пролонговано вивільнявся в навколишні тканини, стимулюючи малодиференційовані клітинні елементи, що спричиняло прискорене перетворення їх у макрофагальні елементи, велика кількість яких помічалася протягом всього терміну дослідження.

Таким чином, в результаті проведеної роботи досліджено вплив модельних середовищ і внутрішнього середовища організму експериментальних тварин на біодеградацію біоактивних полімерів як потенційних імплантаційних матеріалів. З'ясовано, що наявність піроксикаму та ізоніазиду в структурі сітчастого поліуретану по-різному впливають на процес біодеградації. Поліуретанові зразки з іммобілізованим піроксикамом характеризуються швидким та динамічним перебігом процесу біодеградації, що спричиняє суттєве зменшення основних фізико-механічних ознак, а також поверхневе руйнування структури імплантату. Іммобілізація ізоніазиду на поліуретані стабілізувало структуру полімерних зразків під час перебування в організмі впродовж тривалого часу. У цьому випадку процес біодеградації відбувався повільно і не спостерігалася руйнування структури полімерних зразків під дією внутрішнього середовища організму, а зменшувалися основні фізико-механічні показники.

Література

1. Пхакадзе Г. А. Биологическая оценка полимерных материалов, используемых для эндопротезирования / Г. А. Пхакадзе // Полимеры в медицине. – К. : Наук. думка, 1976. – С. 28–33.
2. Пхакадзе Г. А. Биодеструктурируемые полимеры / Г. А. Пхакадзе. – К. : Наук. думка, 1990. – 160 с.
3. А. с. 1697314 СССР. МКИ А61К31/455 Средство для профилактики спаечной болезни «Изонидез» / С. П. Гладких, Г. П. Сухина, Р. М. Магалашвили, В. В. Ремиш, В. С. Карпов, Л. И. Логинова, В. И. Стуков. № 4474405/14, заявл. 15.08.88. Научно-исследовательский институт технологии и безопасности лекарственных средств. – Оубл. 10.12.97. – Бюл. – 1999. – № 22.

D. Kulyesh, N. Galatenko

STUDY OF BIODEGRADATION OF BIOACTIVE POLYMERS AS POTENTIAL IMPLANTS

The influence of model atmospheres and internal environment of experimental animals in the process of biodegradation potential implantation materials based on polyurethane with immobilized drugs. Shown that the obtained polymeric materials with piroxicam and isoniazid have different effects on the process of biodegradation. Polyurethane samples with immobilized piroxicam characterized by rapid and dynamic progress of the process of biodegradation, resulting in a significant reduction in the basic physical and mechanical characteristics, as well as destruction of surface structure of the implant. Immobilization of isoniazid on polyurethanes led to the stability of the structure of polymer samples during their stay in the body for a long time. Shown that in this case, the process of biodegradation was slow and there was no destruction of the structure of polymer samples under internal environment, but the reduction was the main physical and mechanical properties.

Keywords: polyurethane, isoniazid, piroxicam, biological activity, biodegradation.

Матеріал надійшов 30.08.2011