

ВИВЧЕННЯ БІОСУМІСНОСТІ ТА БІОСТАБІЛЬНОСТІ ФТОРВМІСНИХ ПОЛІУРЕТАНІВ

Л.Н. Жернова, Г.Г. Луговська, Н.А. Галатенко,
Е.С. Савицька, Л.Ф. Наражайко

*Інститут хімії високомолекулярних сполук Національної академії наук України
Харківське шосе 48, 02160 Київ-160*

Вивчено вплив введення фторованих фрагментів у полієфіуретансечовини на біосумісність синтезованих полімерів. Визначена біостабільність синтезованих матеріалів на тримісячних термінах імплантації.

The effect of insertion of fluorinated fragments into polyetheurethaneureas on the biocompatibility of polymers synthesized has been studied. The biostability of materials obtained at three months implantation has been determinated.

Вступ

Імплантати довгострокової дії в основному використовують в ортопедії та серцево-судинній хірургії, та як контейнери для різноманітних біологічних матеріалів та органів. Досі не знайдено необхідного біосумісного матеріалу, який задовольняв би всім висунутим до медико-біологічних полімерів вимогам, тому створення нових та модифікація вже відомих біостійких полімерів є актуальним.

В попередніх роботах нами були досліджені полієфіуретансечовини (ПЕУС), які містять у складі жорсткого блоку фторовані ароматичні фрагменти та вирізняються ізомерним пара-, мета-, орто- положеннями подовжувача полімерного ланцюга [1, 2]. Також раніше був зроблений висновок, що такі ПЕУС з подовжувачем полімерного ланцюга в пара-положенні мають стабільну надмолекулярну структуру та фізико-хімічні властивості [3], перспективні для медико-біологічних застосувань.

Метою даної роботи є визначення біостабільності та біосумісності ПЕУС, що містить фторовані фрагменти.

Експериментальна частина

Нами була використана сегментована ПЕУС, яка містить у складі жорсткого блоку фторований ароматичний фрагмент (ПЕУС-1), синтезована на основі толуїлендізоціанату (ТДІ, співвідношення ізомерів 2,4 : 2,6 = 65:35) та поліпропіленгліколю (ППГ, M1500). Подовжувачем полімерного ланцюга був ароматичний фторвмісний діамін - 4,4'-біс(*n*-амінофеніловий) ефір тетрафторгідрокінону. Для порівняння властивостей досліджуваних полімерів було синтезовано ПЕУС на основі ППГ, ТДІ та ароматичних нефторованих діамінів: біс(4-амінофенілового) ефіру гідрокінону (ПЕУС-2) та 4,4'-діамінодифенілметану (ПЕУС-3) [1].

Структура полімерного ланцюга синтезованих ПЕУС відображена на схемі:



де R_1 – метил-1,3-фенілен або метил-1,5-фенілен; $\text{R}_2 = [-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{O}-]_{26}$;

$R_3 = n\text{-}[-C_6H_4-CH_2-C_6H_4-]$; $n\text{-}[-C_6H_4-O-C_6H_4-O-C_6H_4-]$; $[n\text{-}C_6H_4-O-C_6F_4-O\text{-}n\text{-}C_6H_4-]$;
 $[m\text{-}C_6H_4-O-C_6F_4-O\text{-}m\text{-}C_6H_4-]$; $[o\text{-}C_6H_4-O-C_6F_4-O\text{-}o\text{-}C_6H_4-]$.

Плівки одержаних ПЕУС відливали з 20% розчину в диметилформаміді на тефлонові поверхні, сушили в вакуумній шафі при 60°C до постійної маси і потім використовували для фізико-хімічних та біологічних досліджень. Механічні випробування проводили на розривній машині марки FU-1000 (Німеччина) при швидкості навантаження $1,17 \cdot 10^{-3}$ м/с за стандартною методикою.

З метою вивчення біостабільності та біосумісності, вихідні зразки були імплантовані в черевну порожнину безпорідним білим щурам. Після одного та трьох місяців імплантації плівки виймали, промивали дистильованою водою та сушили до постійної маси.

З використанням методу культури тканин [4] морфометрично за зонами росту фібробластичних елементів навколо експлантатів визначають порогові значення показника гістотоксичності (ПГТ) для полімерів медичного призначення [5]. При $ПГТ \geq 0,72$ полімер вважається нетоксичним; при $0,72 \geq ПГТ \geq 0,48$ - малотоксичним; при $ПГТ < 0,27$ - сильнотоксичним.

Як об'єкти для дослідження гістотоксичності за методом культури тканин використовували зразки ПЕУС-1 та ПЕУС-2, для визначення можливого впливу фтору на токсичність полімерів. Джерелом клітин слугувала підшкірна клітковина щурів, яка в умовах культивування дає ріст фібробластичних та фібробластоподібних елементів. Культури були досліджені методом експлантації в згустку плазми у флаконах Карреля з додаванням живильного середовища 199 для культури тканини за співвідношення 1 см^2 полімерної плівки до 1 мл рідини і витримували протягом 24 год. при 37°C. На третю добу культивування рідинну фазу живильного середовища повністю замінювали одержаною витяжкою (2 мл). Як контроль використовували культуру, що виросла без додавання витяжки. Кількісна оцінка проводилась, як описано в роботі [6].

Результати та їхнє обговорення

Результати досліджень показали, що міграція фібробластичних елементів при внесенні витяжки зразка нефторованого аналога в середовище культивування настає на третю добу спостереження. Первинна зона формувалась за рахунок одиничних клітин, які мають веретеноподібну форму, та тяжів. Як правило, ріст фібробластів відбувався з однаковою інтенсивністю по всьому периметру експлантату. Однак, в деяких випадках ріст клітинних елементів відбувався лише з одного боку шматочка культивованої тканини. На 5-6 добу дослідження площа росту фібробластичних елементів характеризується трьома зонами: компактною, сітководною та зоною одиничних мігруючих клітин. Будова цих зон росту в досліджених зразках істотно не відрізняється від контролю. На десятю добу відбувається збільшення площі росту. Найбільша кількість клітин, що діляться, відмічається в третій зоні. В компактній зоні росту виявляються окремі клітини з ознаками дегенеративних змін. На чотирнадцяту добу клітинна популяція вступає в фазу вираженої дегенерації з вакуолізацією та зернистим переродженням цитоплазми, як і в контрольних флаконах, що характерно для даного терміну цієї культури. Визначений $ПГТ = 0,84 \pm 0,01$.

Динаміка росту та розвитку клітинних елементів для фторованого зразка порівнюється з аналогічними показниками нефторованого аналога. Однак, слід зазначити, що на 10-у добу дослідження в компактних зонах росту є клітинні елементи з вакуолізованою цитоплазмою, трохи інтенсивніше відбувається дегенерація клітинних елементів. $ПГТ = 0,79 \pm 0,01$.

Нами також були проведені гістологічні дослідження одержаних систем після підшкірної імплантації зразків в область спини щурів. Одержаний матеріал фіксували у формаліні, дослідження проводили за звичайною гістологічною методикою із забарвленням одержаного матеріалу гематоксилін-еозином.

Макроскопічні дослідження показали, що через 1 місяць навколо імплантованих зразків ПЕУС-1 сформовані сполучнотканинні капсули, які майже однорідні за товщиною та ступенем зрілості. В основному, капсули характеризуються вираженою двошаровістю. Більш зрілий зовнішній шар складається із вздовж орієнтованих пучків колагенових волокон та веретеновидних фібробластів між ними. Внутрішній шар, як правило, є менш зрілим. Він складається з хаотично орієнтованих колагенових волокон та фібробластичних елементів, які відрізняються за формою та ступенем зрілості. Ближче до полімера визначаються прошарки круглоклітинних елементів, які також проникають в мікродефекти на поверхні зразків. Іноді капсула втрачає двошаровість та складається з хаотично орієнтованих колагенових волокон та круглоклітинних елементів, які спостерігаються і в тканинах за межами капсули (рис. 1).

Через 3 місяці капсули в цілому трохи тонші, ніж на попередньому терміні, однак, поряд з круглоклітинними елементами зберігаються незначні місця круглоклітинної інфільтрації.

Через 1 місяць після імплантації навколо дослідних зразків полімера ПЕУС-2 реєструвались порівняно тонкі сполучнотканинні капсули, в основному щільні, які складаються з 5-7 рядів фібробластів, витягнутих ланцюгами між паралельно орієнтованими сполучнотканинними волокнами. Місцями волокна втрачають правильну орієнтацію (розташовані хаотично). Спостерігаються також менш зрілі клітинні елементи - круглі та овальні, а іноді - місця круглоклітинної інфільтрації. Круглоклітинні елементи спостерігаються також і по краях полімерного зразка (рис. 2).

Через 3 місяці після імплантації капсули навколо дослідних зразків більш зрілі, місцями характеризуються вираженою двошаровістю. На більш зрілому зовнішньому шарі, який складається з пучків вздовж орієнтованих колагенових волокон та веретеновидних фібробластів, є шар круглоклітинних елементів. Тут же реєструються великі макрофаги, які місцями виходять в тканини за межі капсули.

Капсули навколо дослідних зразків полімера ПЕУС-3 через 1 місяць після імплантації дуже відрізняються за товщиною та ступенем зрілості. Іноді вони дуже тонкі, складаються з 2-3 шарів веретеновидних фібробластів, розташованих між пучками порівняно зрілих колагенових волокон, які орієнтовані вздовж дослідних зразків, а місцями - досить товсті, складаються з хаотично розташованих колагенових волокон та круглих і овальних веретеновидних фібробластів (рис. 3). Наявна круглоклітинна інфільтрація, яка місцями виходить за межі капсули в навколишні тканини.

Через 3 місяці капсули навколо даних полімерних зразків характеризуються більш зрілою та однорідною за товщиною будовою, яка місцями набуває двошаровості. Круглоклітинні елементи на даному терміні виявляються, в основному, у внутрішньому шарі по краю капсули та іноді в мікродефектах на поверхні зразків.

На основі проведених досліджень можна зробити висновок, що всі три досліджених зразки відрізняються тільки ступенем зрілості капсули - більш низькою на ранньому (1 міс.) терміні дослідження, та підвищеною при більш тривалому (3 міс.) терміні після проведеної імплантації. Гістологічна картина для обох термінів дослідження близька до контролю та мало відрізняється від такої при підсадці інертного матеріалу. Можна зробити висновок, що матеріал всіх трьох складів протягом всього терміну дослідження (до трьох місяців) виявив себе інертним, не подразнює оточуючі тканини.

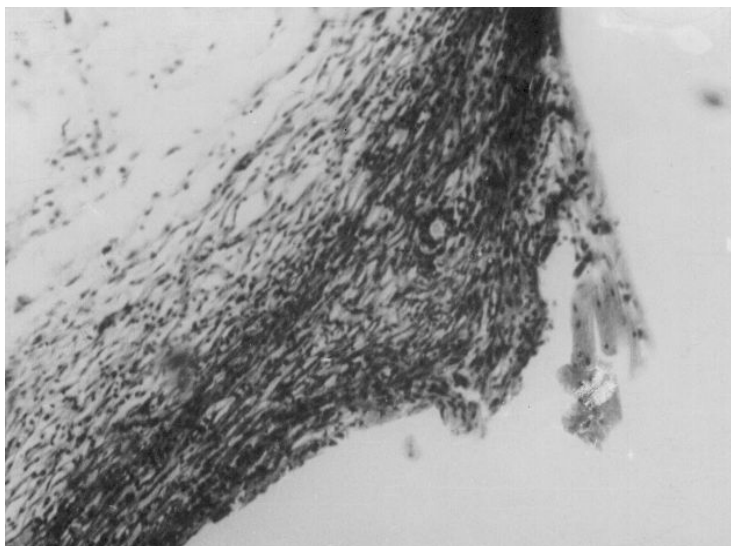


Рис. 1. Мікрофотографія ($\times 150$, гематоксилін-еозин) тканинної реакції навколо полімера ПЕУС-1 після 1 міс. імплантації.

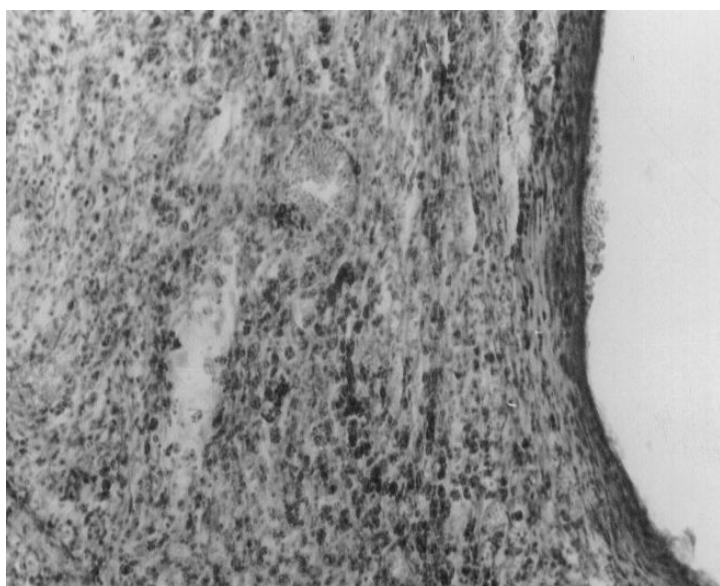


Рис. 2. Мікрофотографія ($\times 150$, гематоксилін-еозин) сполучнотканинної капсули навколо полімера ПЕУС-2 після 1 міс. імплантації.

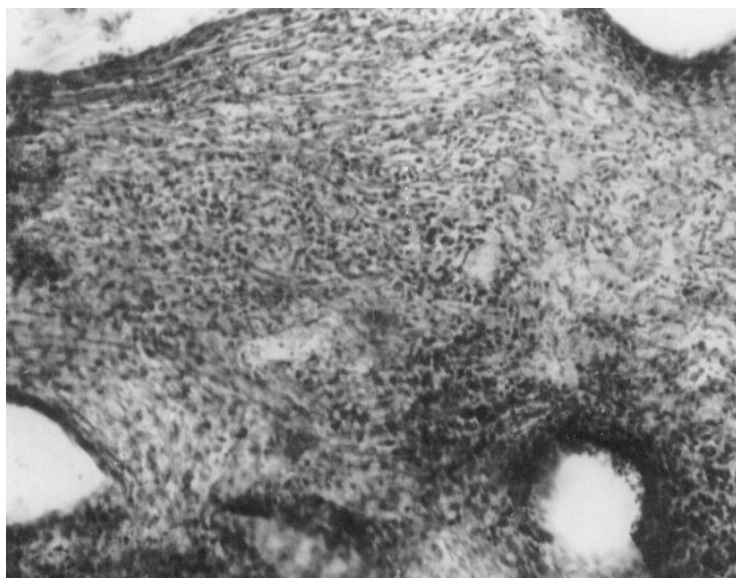


Рис. 3. Мікрофотографія ($\times 150$, гематоксилін-еозин) сполучнотканинної капсули навколо полімера ПЕУС-3 після 1 міс. імплантації.

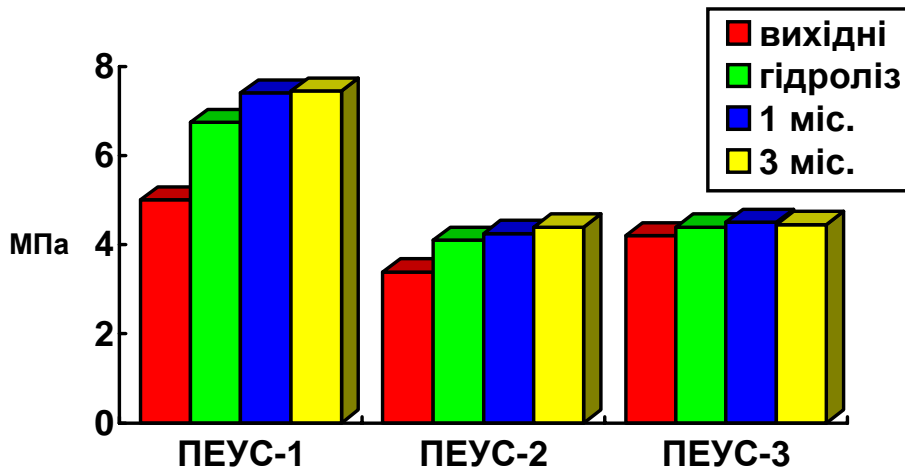


Рис. 4. Діаграма змін розривної міцності досліджених зразків.

Проведені механічні дослідження показали незначні підвищення міцності ПЕУС після імплантації протягом 1 міс. та стабілізацію розривної міцності при тримісячному терміні імплантації (рис. 4), причому для ПЕУС-1 це спостерігається більшою мірою. Підвищення міцності обумовлене, на нашу думку, частковим перерозподілом різних типів водневих зв'язків, що призводить до розриву міжланцюгових зв'язків та збільшення упорядкування в жорстких доменах, зменшення їхньої дефектності, і, в кінцевому підсумку, поліпшує фізико-механічні показники полімера. Результати механічних досліджень підтверджуються даними ІЧ-спектроскопії. Аналіз ІЧ-спектрів досліджених поліуретанів показав, що поглинання валентних коливань $C=O$ уретанових (1720 см^{-1}) і сечовинних (1710 см^{-1}) груп при утворенні водневих зв'язків зміщуються, відповідно, до 1690 і 1640 см^{-1} .

Виходячи із співвідношення оптичної густини смуги 1640 см^{-1} до оптичної густини внутрішнього стандарту ($C-C$ валентних коливань бензольного кільця при 1600 см^{-1}), знайдено, що відносна інтенсивність смуги 1640 см^{-1} для ПЕУС-1 збільшилася на 25%, а для ПЕУС-2 - на 11% [7]. Зміщення смуг поглинання та збільшення відносної інтенсивності вказує на більш міцні водневі зв'язки та упорядкування надмолекулярної структури полімерів.

Висновки

Проведені дослідження показали, що введення атомів фтору до складу жорсткого блоку ПЕУС не погіршує його біосумісність. Синтезована фторвмісна ПЕУС є біосумісною і має хороші фізико-механічні показники та високу біостійкість на тримісячних термінах імплантації. Це дає підставу пропонувати даний полімер для медико-біологічного застосування як імплантат довгострокової дії.

Література

1. Фторвмісні полімери. Синтез та властивості сегментованих полієфіруретаносечовин/ О.В. Шекера, Л.М. Жернова, В.В. Мужев, В.О. Храновський, А.Є. Бородін// Доп. НАН України. - 1998. - №8. - С.151-154.
2. Шерстнев П.П. Полимеры в медицинской технике. - М.: Медицина, 1980. - 376 с.
3. Соединения фтора. Синтез и применение/ Под ред. Н.Исикава. - М.: Мир, 1990. - 405 с.

4. Лаппо В.Г., Тимохина В.И., Яценко В.П. Некоторые результаты и перспективы использования метода тканевых культур в токсикологии медицинских полимеров// Гигиена и санитария. - 1981 - №4. – С.44-48.
5. Галатенко Н.А., Яценко И.П., Пхакадзе Г.А. Определение гистотоксичности полимеров медицинского назначения с использованием тканевой культуры// Докл. АН УССР. - 1982. - №9. - С.54-58.
6. Яценко В.П., Галатенко Н.А. Изучение закономерности роста клеточных элементов подкожной клетчатки белых крыс в условиях тканевой культуры// Проблемы создания лечебных препаратов и полимерных материалов для медицины. - Киев: Наук. думка, 1979. - С.33-36.
7. Жерновая Л.Н., Галатенко Н.А., Храновский В.А. Изучение биостабильных фторированных полиуретанов// Композиційні полімерні матеріали. - 2000. - Т.22, №1. - С.26-30.