

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ БОЛЕЗНЕЙ ОРГАНОВ КРОВООБРАЩЕНИЯ FUNDAMENTAL ISSUES IN CIRCULATORY SYSTEM DISEASES

УДК 616.13-089.844-77:577.12:615.9]-092.9

ИЗУЧЕНИЕ КАРДИОТОКСИЧНОСТИ ПРОДУКТОВ ГИДРОЛИТИЧЕСКОЙ ДЕГРАДАЦИИ ТРУБЧАТЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МАТРИКСОВ, ПРИГОДНЫХ ВЫСТУПИТЬ В КАЧЕСТВЕ СОСУДИСТОГО ИМПЛАНТА МАЛОГО ДИАМЕТРА

Л. В. АНТОНОВА¹, Е. А. СЕРГЕЕВА¹, О. О. БАБИЧ², А. Ю. ПРОСЕКОВ²,
Т. В. ГЛУШКОВА¹, О. В. ГРУЗДЕВА¹, А. А. КУЗЬМИНА¹, Л. С. БАРБАРАШ¹

¹ *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Россия*

² *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности», Кемерово, Россия*

Проведен анализ кардиотоксичности продуктов деградации полимеров полигидроксибутирата/валерата и поликапролактона, явившихся основой для изготовления трубчатого каркаса методом электроспиннинга и подвергнутых 6-месячной гидролитической деградации в стерильном фосфатно-солевом буфере при температуре 37 °С. Исследование состава аналитов на наличие мономеров и прочих соединений после инкубации матриксов в буфере проводили ежемесячно с помощью жидкостной хроматографии. Кардиотоксичность аналитов оценивали на модели изолированного сердца крыс-самцов линии Wistar методом Langendorff. На фоне введения аналитов измеряли скорость коронарного протока и изучали ферментативную активность миокардиальной фракции креатинфосфокиназы и лактатдегидрогеназы. Полигидроксибутират/валерат и поликапролактон не имели достоверных признаков распада до мономеров через 6 месяцев гидролитической деградации, а фосфатно-солевой буфер, в котором инкубировали данные образцы в течение 6 месяцев, не вызывал кардиотоксического эффекта в экспериментах на модели изолированного сердца и достоверного повышения активности ферментов в перфузате.

Ключевые слова: биорезорбируемые полимеры, гидролитическая деградация, лактатдегидрогеназа.

EVALUATION OF CARDIOTOXICITY OF HYDROLYTIC DEGRADATION PRODUCTS OF TUBULAR POLYMER MATRICES SUITABLE FOR SMALL DIAMETER VASCULAR GRAFTS

L. V. ANTONOVA¹, E. A. SERGEEVA¹, O. O. BABICH², A. YU. PROSEKOV²,
T. V. GLUSHKOVA¹, O. V. GRUZDEVA¹, A. A. KUZMINA¹, L. S. BARBARASH¹

¹ *Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institut for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia*

² *Federal State Budget Educational Institution of Higher Education Kemerovo Institute of Food Science and Technology, Kemerovo, Russia*

The evaluation of cardiotoxicity of the degradation products of electrospun polyhydroxybutyrate-valerate and polycaprolactone tubular matrices, subjected to 6-month hydrolytic degradation in sterile phosphate buffered saline (PBS) at 37 °C, was performed. After matrices incubation in PBS, high performance liquid chromatography was used to analyze individual analytes for the presence of monomers and other compounds each month. Cardiotoxicity of analytes was evaluated in a model of isolated perfused rat heart (male Wistar rats) using the Langendorff technique. The rate of coronary flow and enzymatic activity of creatine phosphokinase and lactate dehydrogenase myocardial fractions were measured during the analytes injections. Both, polyhydroxybutyrate-valerate and polycaprolactone, had no significant signs of hydrolytic degradation of polymers into monomers after 6-month storage time. PBS after 6-month incubation of the studied samples did not produce any cardiotoxic effect in the experiments on isolated rat heart and did not demonstrate any significant increase of enzyme activity in the perfusate.

Key words: bioresorbable polymers, hydrolytic degradation, chromatography, cardiotoxicity, creatine phosphokinase, lactate dehydrogenase.

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в реконструктивной хирургии, по-прежнему остается актуальным поиск новых высокофункциональных материалов, пригодных для кон-

струирования систем, способных воспроизвести биологические функции живого организма [1, 2]. На сегодняшний день одной из нерешенных проблем в кардиохирургии является отсутствие

протезов для замещения артерий малого диаметра. Однако интенсивное развитие тканевой инженерии в последние годы стимулировало разработку методов создания различных гибридных органов, в том числе протезов кровеносных сосудов [2–6].

Наиболее перспективными для создания сосудов малого диаметра являются биodeградируемые полимеры, такие как полиоксикапраны и поликапролактон. Отличительная особенность этих полимеров – способность постепенно замещаться новообразованной тканью, претерпевая деградацию и разлагаясь в организме до простейших нетоксичных веществ (в идеале – углекислый газ и вода). На основе данных полимеров создаются шовные материалы, трансплантаты для восстановления хрящевой, костной ткани и кожи [2, 7–9]. Ведутся разработки по созданию сосудистых протезов [10–13]. При этом материал, на основе которого создаются конструкции, предназначенные для имплантации в сосудистое русло, помимо достаточных прочностных характеристик должен обладать высокой биологической совместимостью с клетками и тканями организма и низкой токсичностью продуктов собственной резорбции. Место локализации сердечно-сосудистых имплантов обеспечивает длительное влияние продуктов резорбции материалов, на основе которых изготовлены импланты, в первую очередь на сердечно-сосудистую систему. Поэтому изучение кардиотоксичности данных материалов должно являться неотъемлемым атрибутом при разработке изделий для нужд сердечно-сосудистой хирургии.

Цель. На модели изолированного сердца крысы изучить кардиотоксичность продуктов гидролитической деградации полимерных трубчатых каркасов на основе полигидроксикапраната/валерата и поликапролактона, инкубируемых в стерильном фосфатно-солевом буфере в течение 6 месяцев.

Материалы и методы

Для осуществления 6-месячного эксперимента по изучению кардиотоксичности продуктов гидролитической деградации полимеров, потенциально пригодных выступить в качестве материала для изготовления биорезорбируемого каркаса сосудистого импланта малого диаметра, на основе раствора полигидроксикапраната/валерата (ПГБВ) с включением гидроксикапраната не более 10 % (Sigma-Aldrich, США) и поликапролактона (ПКЛ) с молекулярной массой 80 тыс. кДа (Sigma-Aldrich, США) в хлороформе ХЧ (Вектон, Россия) методом электроспиннинга на аппарате NANON (МЕСС, Япония) были изготовлены трубчатые не-

тканые матриксы с использованием следующего режима: напряжение – 20 кВ, скорость подачи – 0,3 мл/ч, игла – 22G, диаметр наматочного коллектора – 4 мм.

Структуру поверхности матриксов изучали методом сканирующей электронной микроскопии в условиях высокого вакуума на микроскопе Hitachi S 3400 N (Япония).

Полученные трубчатые нетканые матриксы были разделены на одинаковые части длиной 2,5 см, взвешены в сухом состоянии и подвергнуты газовой стерилизации с использованием этиленоксида. Затем матриксы (всего 18 шт.) помещены по одному в стерильные пробирки типа Эппендорф, заполненные стерильным фосфатно-солевым буфером с pH 7,4±0,2, и в термостат с выставленной температурой 37 °С. В течение 6 месяцев ежемесячно (в соответствии с требованиями ГОСТа ИСО 10993-13-2009) начиная со второго месяца по три пробирки с образцами изымали и осуществляли следующие виды исследований: определение массы высушенного образца после инкубации, измерение pH аналита, определение мономеров и прочих соединений в анализе методом газовой хромато-масс-спектрометрии, выявление кардиотоксичности аналитов на системе изолированного сердца с измерением скорости коронарного протока и ферментативной активности миокардиальных маркеров в оттекаемом перфузате. В качестве контроля во всех исследованиях выступил интактный стерильный фосфатно-солевой буфер (группа PBS0).

Исследование состава аналита на наличие мономеров и прочих соединений было проведено методом газовой хромато-масс-спектрометрии (газовый хромато-масс-спектрометр GCMS-QP2010 Ultra / GCMS-QP2010 SE, Shimadzu, Япония) с предварительным определением общей фракции липидов по методу Фолча.

Кардиотоксичность аналитов оценена на модели изолированного сердца крыс-самцов линии Wistar методом Langendorff с выполнением всех требований и принципов гуманного обращения с экспериментальными животными. Все эксперименты проводились в осенний период. Было выполнено шесть серий экспериментов, послуживших формированию пяти опытных групп и одной контрольной, каждая из которых включала по шесть животных. Все серии следовали одному алгоритму.

Через 15 минут после наркотизации тиопенталом натрия (25 мг/кг внутривенно) животному проводили срединную торакотомию. Быстро извлекали сердце с достаточно длинной аортой

для канюлирования и погружали в «ледяной» ($t = 2-4^{\circ}\text{C}$) раствор Кребса – Хензеляйта следующего состава (мм): $\text{NaCl} - 118$; $\text{NaHCO}_3 - 25$; глюкоза – 11 ; $\text{KCl} - 4,8$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1,2$; $\text{MgSO}_4 - 1,2$; $\text{CaCl}_2 - 1,2$. После прекращения спонтанных сокращений выделяли аорту, фиксировали, надев ее на канюлю перфузионной системы. Начинали перфузию методом Langendorff по открытому контуру 25 минут раствором Кребса – Хензеляйта, обогащенным карбогеном (95 % O_2 , 5 % CO_2), $\text{pH} = 7,3-7,4$ при $t = 37^{\circ}\text{C}$ под давлением 80 см вод. ст.

На 26-й минуте поток раствора Кребса – Хензеляйта перекрывали. Вместо него в течение 6 секунд через канюлю вводили подогретый до 37°C 1 мл стерильного фосфатно-солевого буфера (PBS), что определило первую серию экспериментов как контрольную группу (PBS0). Аналогично сформированы опытные группы: 2-я группа – введение анализата (инкубируемого с образцом буфера), в котором образец графта находился в течение двух месяцев (PBS2), 3-я группа – в течение трех месяцев (PBS3), 4-я группа – четырех месяцев (PBS4), 5-я группа – пяти месяцев (PBS5) и 6-я группа – шести месяцев (PBS6).

Дальнейший этап был един для всех групп. После введения «интактного» PBS или PBS, в котором определенное количество времени находились образцы, поток раствора Кребса – Хензеляйта восстанавливали и незамедлительно начинали собирать перфузат, оттекающий от сердца каждую минуту в течение 5 минут, для измерения коронарного протока и последующего проведения прочих вышеуказанных исследований. Повреждение кардиомиоцитов определяли по ферментативной активности миокардиальных маркеров в забранном перфузате: миокардиальной фракции креатинфосфокиназы (КФК – МБ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Активность ферментов определяли на автоматическом биохимическом анализаторе Konelab 30i фирмы Thermo Fisher Scientific (Финляндия) с использованием стандартных тест-систем этой же фирмы.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы Statistica 6.0. Нормальность распределения оценивали при помощи критерия Колмогорова – Смирнова. Достоверность различий определяли с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни для несвязных пар. При всех видах статистического анализа учитывался уровень статистической значимости 95,0 % ($p < 0,05$). Данные представляли как медиана и квартильный размах Me (25 %; 75 %).

Результаты и обсуждение

На основе раствора ПГБВ/ПКЛ методом электроспиннинга получены трубчатые матриксы с высоким отношением площади поверхности к объему. Матриксы образованы хаотично расположенными нитями толщиной $1,8-2,45$ мкм, формируемыми при своем расположении поры размером $21,3-34,8$ мкм (рис. 1).

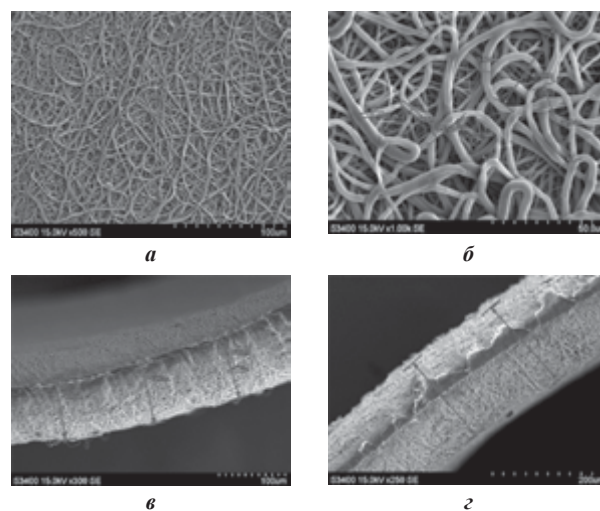


Рис. 1. Сканирующая электронная микроскопия нетканых матриксов на основе ПГБВ/ПКЛ, выполненных методом электроспиннинга: а, б – внутренняя поверхность; в, г – вид трубчатых матриксов на поперечном разрезе

Суммарная масса сухих образцов трубчатых каркасов на основе ПГБВ/ПКЛ до начала эксперимента составила $0,5149$ г, а на последней временной точке эксперимента (спустя 6 месяцев инкубации) – $0,5082$ г. Таким образом, достоверной разницы изменения суммарной массы инкубируемых полимерных образцов не выявлено. Также не отмечено изменений pH анализата на разных сроках инкубации.

Результаты исследования анализатов (стерильного фосфатно-солевого буфера, в котором инкубировали трубчатые полимерные матриксы) методом газовой хромато-масс-спектрометрии показали, что анализируемые образцы содержат следующие компоненты: 1-фенантрен-карбоновую кислоту; 1,2,3,4,4а,9,10,10а-тетрагидро-1-метил-метилловый эфир; 2-метил-6-фенил-1,6-гептадиен; 1,3,5-трис(3-метил)-3-бутенилбензол; 1,1'-бис(2-пентен-1,5-диил)-бензол; 1,1'-бис(2-пентен-1,5-диил)-бензол; 2-бензофуранкарбоновую кислоту; цис-2,4,5,6,7, 7а-гексагидро-4,4,7а-триметил-метилловый эфир; 5-(фенил-циклопентил)-[1,3,4] оксадиазол-2-2-тиол, додекаметилциклогексикоксан и 3-изопрокси-1,1,1,7,7,7-

гексаметил-3,5,5,-трис (триметилсилокси)- тетра-силоксан, додекаметилциклогексилоксана, 3-изо-прокси-1,1,1,7,7,7-гексаметил-3,5,5,-трис (триметилсилокси)-тетрасилоксан. Данные соединения являются остатками растворителя, фосфатно-солевого буфера, а также побочными продуктами взаимодействия компонентов, используемых при пробоподготовке образцов.

Известно, что изменение скорости коронарного протока изолированного сердца крысы во времени при введении испытуемых аналитов может отражать угнетение функционирования миокарда в динамике. Поэтому нами была измерена скорость коронарного протока каждую минуту в течение 5 минут при введении образцов аналитов контрольной и опытных групп. Выявлено, что изменение скорости коронарного протока каждой исследуемой минуты между опытными группами (PBS2 – PBS6) и контролем (PBS0) на фоне введения аналитов находилось в недостоверном разбросе значений (рис. 2).

Как известно, увеличение выхода ферментов различной ультраструктурной локализации в коронарный проток указывает на повышение проницаемости мембран кардиомиоцитов [14]. Перфузия изолированных сердец PBS, в котором различное время инкубировали образцы трубчатых матриц на основе ПГБВ/ПКЛ, не повлияла на увеличение выхода ферментов (КФК-МВ, ЛДГ) в коронарный проток. Самая низкая ферментативная активность КФК-МВ отмечена в перфузате групп PBS2, PBS3 и PBS4 (рис. 3). Подъем ферментативной активности КФК-МВ групп PBS5 и PBS6 мог указать на минимальное накопление продуктов гидролитической деградации полимеров, которое

тем не менее достоверно не повлияло на проницаемость мембран кардиомиоцитов (рис. 3).

При изучении активности ЛДГ в перфузате после введения аналитов и контрольного раствора PBS выявлено, что при введении аналита опытных групп ферментативная активность ЛДГ в перфузате на 1, 2, 3 и 5-й минутах достоверно отличалась от таковой в контрольной группе. Так, активность ЛДГ в группах PBS3 – PBS6 на 1, 3, 5-й минутах практически равнялась 0, что привело к достоверному отличию от контрольной группы (рис. 4а, б, в, д). Недостоверный всплеск активности ЛДГ на 1-й минуте в группе PBS2 мог явиться адаптивной реакцией в ответ на присутствие в аналите остатков органического растворителя на ранних сроках проводимого эксперимента, что было доказано при проведении хроматографического исследования. А появление на 4-й минуте недостоверного повышения активности ЛДГ в группах PBS5 и PBS6 могло указывать на возможное (неулавливаемое) накопление минимального количества продуктов распада полимеров спустя 5 месяцев гидролитической деградации и далее (рис. 4г).

Отсутствие достоверного повышения ферментативной активности ЛДГ и даже ее достоверное снижение указали на сохранение целостности мембраны кардиомиоцитов и отсутствие кардиотоксического влияния продуктов деградации полимеров ПГБВ и ПКЛ, из которых были изготовлены трубчатые нетканые матрицы.

Заключение

Сердечно-сосудистые импланты постоянно контактируют с кровью и элементами сердечно-

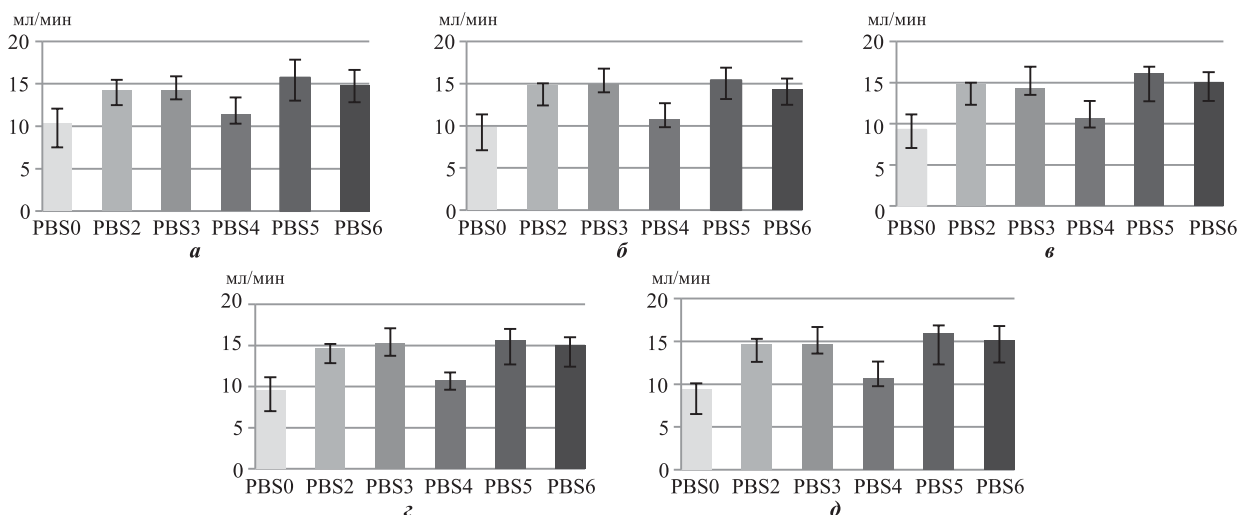


Рис. 2. Изменение скорости коронарного протока (СКП) на фоне введения аналитов опытных и контрольной групп: а – на 1-й минуте введения аналитов; б – на 2-й минуте; в – на 3-й минуте; г – на 4-й минуте; д – на 5-й минуте

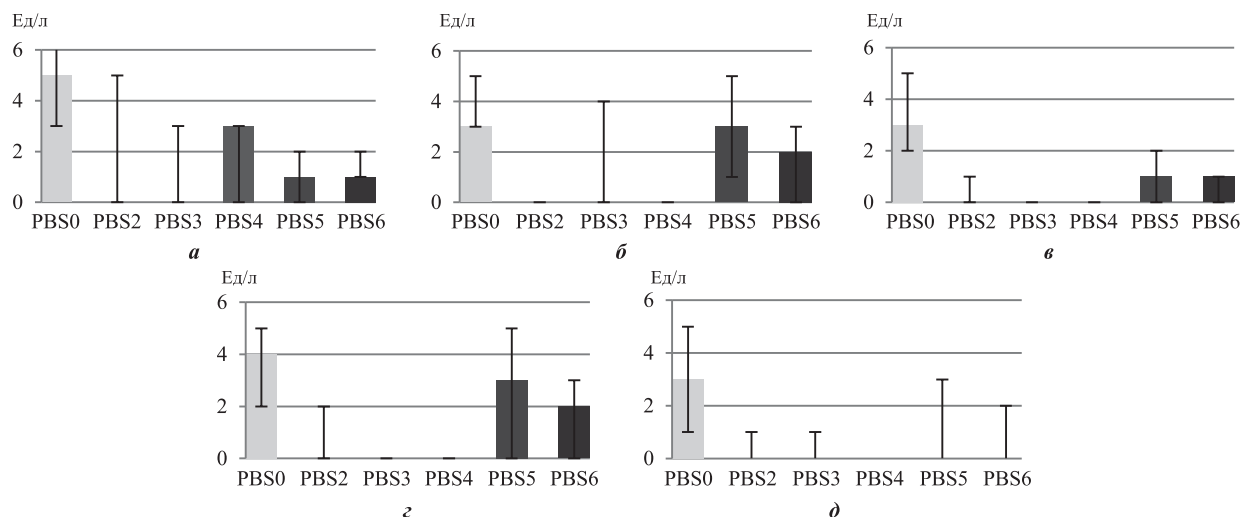


Рис. 3. Изменение ферментативной активности КФК-МВ на фоне введения аналитов опытных и контрольной групп: а – на 1-й минуте введения аналитов; б – на 2-й минуте; в – на 3-й минуте; г – на 4-й минуте; д – на 5-й минуте

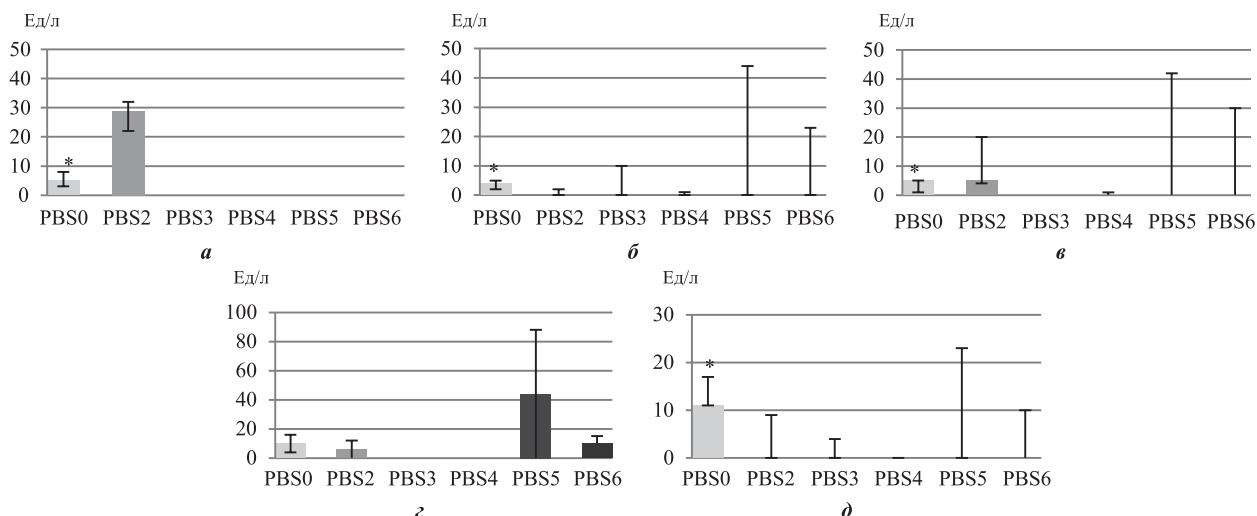


Рис. 4. Изменение ферментативной активности ЛДГ на фоне введения аналитов опытных и контрольной групп: а – на 1-й минуте введения аналитов; б – на 2-й минуте; в – на 3-й минуте; г – на 4-й минуте; д – на 5-й минуте

сосудистой системы. Поэтому материалы, на основе которых изготавливаются данные изделия, должны быть биосовместимы, гемосовместимы и не должны обладать кардиотоксичностью. Биосовместимые биорезорбируемые полимеры полигидроксibuтират/валерат и поликапролактон, использованные в наших разработках в качестве основного материала для изготовления трубчатого каркаса, через шесть месяцев гидролитической деградации не имели достоверных признаков распада до мономеров, а аналит, полученный в процессе 6-месячной инкубации трубчатых матриц в фосфатно-солевом буфере, не вызывал кардиотоксического эффекта в экспериментах на модели изолированного сердца. Полученные результаты подтверждают

возможность использования полигидроксibuтирата/валерата и поликапролактона в качестве основы для изготовления сосудистых имплантов малого диаметра.

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 14-25-00050) в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Алехин А. П., Болейко Г. М., Гудкова С. А., Маркеев А. М., Сигарев А. А., Токнова В. Ф. и др. Синтез биосовместимых поверхностей методами нанотехнологии. Российские нанотехнологии. 2010; 5 (9–10): 128–136.

Alekhin A. P., Boleiko G. M., Gudkova S. A., Markeev A. M., Sigarev A. A., Toknova V. F. et al. Synthesis of biocompatible surfaces by nanotechnology methods. *Nanotechnologies in Russia*. 2010; 5 (9–10): 128–136. [In Russ].

2. Волова Т. Г., Севастьянов В. И., Шишацкая Е. И. Полиоксиканоаты – биоразрушаемые полимеры для медицины. Красноярск; 2006.

Volova T. G., Sevastyanov V. I., Shishatskaya E. I. *Polioksikalcanoaty – biorazrushaemye polimery dly ameditsiny*. Krasnoyarsk; 2006. [In Russ].

3. Bugunaid M. S., Seifalian A. M., Salacinski H. J., Murray D., Hamilton G., Walker M. G. Tissue engineering of blood vessels. *Brit. J. Surg.* 2006; 93: 282–290.

4. Zhang W. J. Tissue engineering of blood vessel. *Cell. Mol. Med.* 2007; 11(5): 945–957.

5. Pankajakshan D., Agrawal D. K. Scaffolds in tissue engineering of blood vessels. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2010; 88(9): 855–873.

6. Naito Y., Shinoka T., Duncan D. Vascular tissue engineering: towards the next generation vascular grafts. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011; 63(4): 312–323.

7. Luo S., Netravali A. N. Characterisation of henequen fibers and the henequen fiber/poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) interface. *J. Adhesion Sci. Technol.* 2001; 15(4): 423–437.

8. Deng Y., Lin X. S., Zheng Z., Deng J. G., Chen J. C., Ma H. et al. Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) promoted production of extracellular matrix of articular cartilage chondrocytes in vitro. *Biomaterials*. 2003; 24: 4273–4281.

9. Lowery J. L., Datta N., Rutledge G. C. Effect of fiber diameter, pore size and seeding method on growth of human

dermal fibroblasts in electrospun poly(ε-caprolactone) fibrous mats. *Biomaterials*. 2010; 31: 491–504.

10. Nottelet B., Pektok E., Mandracchia D., Tille J., Walpoth B., Gurny R. et al. Factorial design optimization and in vivo feasibility of poly(ε-caprolactone)-micro- and nano-fiber-based small diameter vascular grafts. *J. of Biomedical Materials Research*. 2008; 89: 865–875.

11. Pektok E. Degradation and healing characteristics of small-diameter poly(ε-caprolactone) vascular grafts in the rat systemic arterial circulation. *Circulation*. 2008; 118 (24): 2563–2570.

12. Soletti L., Hong Y., Guan J., Stankus J. J., El-Kurdi M. S., Wagneret W. R. et al. A bilayered elastomeric scaffold for tissue engineering of small diameter vascular grafts. *Acta Biomater.* 2010; 6: 110–122.

13. Севастьянова В. В., Васюков Г. Ю., Борисов В. В., Бурого А. Ю., Формокидова Ю. Н., Головкин А. С. Стимуляция ангиогенеза матрицами из поликапролактона, содержащими VEGF. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2013; 4: 28–34.

Sevast'yanova V. V., Vasyukov G. Yu., Borisov V. V., Burago A. Yu., Formokidova Yu. N., Golovkin A. S. Stimulyatsiya angiogeneza matritsami iz polikaprolaktona, soderzhashchimi VEGF. *Kompleksnyye problemy serdechno-sosudistyykh zabolevaniy*. 2013; 4: 28–34. [In Russ].

14. Долгих В. Т. Повреждение и защита сердца при острой смертельной кровопотере. Омск; 2002.

Dolgikh V. T. *Povrezhdenie i zaschita serdtsa pri ostroy smertelnoy krovopotere*. Omsk; 2002. [In Russ].

Статья поступила 25.03.2015

Для корреспонденции:

Антонова Лариса Валерьевна

Адрес: 650002, г. Кемерово,

Сосновый бульвар, д. 6

Тел. 8 (3842) 64-42-38

E-mail: antolv@kemcardio.ru

For correspondence:

Antonova Larisa

Address: 6, Sosnoviy blvd., Kemerovo,

650002, Russian Federation

Tel. +7 (3842) 64-42-38

E-mail: antolv@kemcardio.ru