

УДК 512.89(075)
ББК 51.1я73
В68

Электронный учебно-методический комплекс по дисциплине «Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии» подготовлен в рамках реализации Программы развития федерального государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ) на 2007–2010 гг.

Рецензенты:

Красноярский краевой фонд науки;
Экспертная комиссия СФУ по подготовке учебно-методических комплексов дисциплин

Волова, Т. Г.

В68 Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии [Электронный ресурс] : электрон. учеб. пособие / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов. – Электрон. дан. (6 Мб). – Красноярск : ИПК СФУ, 2009. – (Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии : УМКД № 1324–2008 / рук. творч. коллектива Т. Г. Волова). – 1 электрон. опт. диск (DVD). – Систем. требования : *Intel Pentium* (или аналогичный процессор других производителей) 1 ГГц ; 512 Мб оперативной памяти ; 50 Мб свободного дискового пространства ; привод *DVD* ; операционная система *Microsoft Windows XP SP 2 / Vista* (32 бит) ; *Adobe Reader 7.0* (или аналогичный продукт для чтения файлов формата *pdf*).

ISBN 978-5-7638-1665-5 (комплекса)

ISBN 978-5-7638-1771-3 (учебного пособия)

Номер гос. регистрации в ФГУП НТЦ «Информрегистр» 0320902484 (комплекса)

Настоящее издание является частью электронного учебно-методического комплекса по дисциплине «Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии», включающего учебную программу дисциплины, лабораторный практикум, методические указания по самостоятельной работе, контрольно-измерительные материалы «Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии. Банк тестовых заданий», наглядное пособие «Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии. Презентационные материалы».

В учебном пособии в соответствии с учебной программой дисциплины приведены современные данные в области биоматериалов медицинского назначения, используемых в реконструктивных медицинских технологиях, а также для конструирования искусственных органов. Представлен обширный библиографический список.

Предназначено для студентов направления подготовки бакалавров 020000.62 «Биология» укрупненной группы 020000 «Естественные науки».

© Сибирский федеральный университет, 2009

Рекомендовано к изданию Инновационно-методическим управлением СФУ

Редактор Т. М. Пыжик

Разработка и оформление электронного образовательного ресурса: Центр технологий электронного обучения Информационно-телекоммуникационного комплекса СФУ; лаборатория по разработке мультимедийных электронных образовательных ресурсов при КрЦНИТ

Содержимое ресурса охраняется законом об авторском праве. Несанкционированное копирование и использование данного продукта запрещается. Встречающиеся названия программного обеспечения, изделий, устройств или систем могут являться зарегистрированными товарными знаками тех или иных фирм.

Подп. к использованию 30.11.2009

Объем 6 Мб

Красноярск: СФУ, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

Оглавление

ПРЕДИСЛОВИЕ	6
ГЛАВА 1. ВВЕДЕНИЕ В ПРЕДМЕТ «МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ, КЛЕТОЧНОЙ И ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ»	7
1.1. Актуальные исследования в области полимерных материалов биомедицинского назначения	7
1.1.1. Новые реконструктивные технологии.....	8
1.2. Потребности реконструктивной медицины в функциональных материалах.....	12
1.2.1. Требования, предъявляемые к материалам биомедицинского назначения	15
1.2.2. Допуск новых биоматериалов и устройств к применению.....	19
1.3. Современное представление о клеточных технологиях	23
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ МЕДИКО- БИОЛОГИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ	26
2.1. Современные материалы для биомедицины	26
2.1.1. Металлы.....	26
2.1.2. Керамика	27
2.1.3. Композитные материалы.....	29
2.1.4. Полимеры, совместимые с живым организмом.....	37
2.2. Материалы медицинского назначения, используемые в реконструктивных медицинских технологиях	48
2.2.1. Материалы и эндопротезы для реконструкции элементов сердечно- сосудистой системы.....	48
2.2.2. Материалы для реконструкции мягких тканей и внутренних органов	61
2.2.3. Материалы для реконструкции костной ткани.....	75
2.3. Материалы, используемые для конструирования искусственных органов	86
2.3.1. Искусственная почка	87
2.3.2. Искусственные легкие.....	87
2.3.3. Протезы органов зрения.....	89
2.3.4. Реконструкция органа слуха.....	91
2.3.5. Искусственное сердце	93
2.3.6. Гибридная печень	96
2.3.7. Искусственная поджелудочная железа	99
2.3.8. Другие искусственные органы.....	102
2.4. Материалы для депонирования и контролируемой доставки лекарственных препаратов	103

2.4.1. Материалы и методы, применяемые для депонирования контролируемой доставкой лекарственных препаратов	104
2.4.2. Применение полигидроксиалканоатов в качестве матриц для конструирования систем контролируемой доставки лекарственных препаратов	109
ГЛАВА 3. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МАТЕРИАЛОВ	
БИМЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ.....	117
3.1. Система методов и тестов, применяемая в биомедицинском материаловедении.....	119
3.1.1. Физические и физико-химические методы исследования полимеров биомедицинского назначения	119
3.1.2. Биомедицинское тестирование биоматериалов.....	144
3.2. Методы переработки материалов для получения специализированных конструкций и изделий биомедицинского назначения.....	147
3.2.1. Получение гидрогелей.....	148
3.2.2. Переработка термопластичных полимеров	150
3.2.3. Переработка композитов керамики и полимеров	152
3.2.4. Переработка полимеров из растворов	154
ГЛАВА 4. ТКАНЕВАЯ РЕАКЦИЯ	
НА ИМПЛАНТАТЫ	156
4.1. Реакция организма на имплантацию материалов и процессы взаимодействия с ними.....	156
4.2. Кальцификация имплантатов.....	165
ГЛАВА 5. БИОРАЗРУШАЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ	
И МЕХАНИЗМЫ БИОДЕСТРУКЦИИ	
ИМПЛАНТАТОВ.....	171
5.1. Биоразрушаемые материалы медицинского назначения.....	172
5.1.1. Биоразрушаемые синтетические полимеры	172
5.2. Биодеструкция имплантируемых материалов и конструкций <i>in vivo</i>	178
ГЛАВА 6. БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ В КУЛЬТУРЕ.	
МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	
И ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ	185
6.1. История развития клеточных технологий.....	185
6.1.1. Источники клеток.....	187
6.2. Техника ведения клеточных культур	192
6.2.1. Питательные культуральные среды	193
6.3. Клеточные технологии и тканевая инженерия	196

6.3.1. Биоматериалы для клеточных матриксов.....	199
ГЛАВА 7. СПЕЦИФИКА ТЕХНОЛОГИИ ВЕДЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР	214
7.1. Принципы работы в клеточной лаборатории и основные асептические лабораторные методы	214
7.1.1. Методы стерилизации	215
7.1.2. Оборудование лаборатории для работы с клеточными культурами	216
7.1.3. Системы для культивирования клеток	217
7.1.4. Культивирование клеток человека	218
7.1.5. Культивирование клеток и тканей беспозвоночных.....	219
7.1.6. Культивирование клеток и тканей органов.....	220
7.2. Потенциал клеточных технологий	222
7.2.1. Клеточные технологии в реконструкции органов и тканей.....	227
7.2.2. Клеточные технологии в реконструкции мышечной ткани и кожи....	232
7.2.3. Клеточные технологии в лечении сердечно-сосудистой патологии.	235
ГЛАВА 8. НОВЕЙШИЕ КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ	238
8.1. Клонирование животных клеток и высших животных.....	238
8.1.1. Гибридная технология.....	238
8.1.2. Гибридизация животных клеток.....	239
8.1.3. Клонирование животных	240
8.2. Стволовые клетки. История вопроса и перспективы применения	241
8.2.1. История выделения и изучения стволовых клеток	242
8.2.2. Принципы проведения клеточной терапии с помощью стволовых клеток	244
8.2.3. Перспективы и этические проблемы применения стволовых клеток в реконструктивных технологиях.....	246
8.2.4. Процесс передачи новых биомедицинских материалов, устройств и технологий в клиническую практику	251
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	256
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	257
К главе 1	257
К главе 2	257
К главе 3	259
К главе 4	259
К главе 5	260
К главе 6	260
К главе 7	261
К главе 8	261

ПРЕДИСЛОВИЕ

Создание экологически чистых материалов с полезными свойствами остается одной из ключевых проблем современности. Актуальность и необходимость разработки новых биоматериалов обусловлена существующим высоким спросом на полимерные материалы для различных сфер деятельности и, прежде всего, биомедицины. Сегодня остро востребованы биосовместимые материалы для общей и сердечно-сосудистой хирургии, для изготовления протезов кровеносных сосудов, искусственных клапанов сердца, систем искусственного и вспомогательного кровообращения, для ортопедии и стоматологии, лекарственных форм нового поколения, сорбентов и т. д.

Разработка новых материалов медицинского назначения, предназначенных для контакта со средой живого организма, представляет собой задачу высокой сложности. Особо востребованы специализированные биосовместимые материалы для сформировавшегося в последние годы нового направления медицинского материаловедения – клеточной и тканевой инженерии, связанного с реконструктивной хирургией и разработкой биоискусственных органов. Эти исследования реализуются на стыке химии высокомолекулярных соединений, биотехнологии, биофизики, молекулярной и клеточной биологии и медицины и включают в себя комплекс взаимосвязанных фундаментальных задач: разработку новых материалов, методов модификации и их переработки в специализированные изделия биомедицинского назначения; изучение механизма взаимодействия биоматериалов с кровью и тканями; оценку физико-химических и медико-биологических свойств биоматериалов и изделий из них; экспериментально-клиническое исследование и применение новых материалов и изделий.

Учебное пособие «Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии» предназначено для подготовки магистров, обучающихся в Институте фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета в рамках учебной программы «Микробиология и биотехнология», его цель – дать знания о новейших направлениях биотехнологической науки и практики, интегрирующих потенциал биомедицинского материаловедения, клеточных культур и технологий, тканевого инжиниринга как наиболее перспективных технологиях реконструктивной биомедицины. Пособие предназначено для формирования у студентов знаний в сфере современных целей и задач биомедицинского материаловедения; в нем представлены новейшие данные о перспективных материалах биомедицинского назначения, способах их исследования и переработки в специализированные изделия; приведены результаты в области реконструктивной хирургии и конструирования биоискусственных органов.

Научный редактор доктор биологических наук,
профессор Т. Г. Волова



ГЛАВА 1. ВВЕДЕНИЕ В ПРЕДМЕТ «МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ, КЛЕТОЧНОЙ И ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ»

1.1. Актуальные исследования в области полимерных материалов биомедицинского назначения

В последние десятилетия повсеместно стали отчетливо проявляться тревожные тенденции старения населения, роста хронических заболеваний и инвалидизации людей трудоспособного возраста. На [рис. 1.1](#) показано как изменяется структура заболеваний и какие из них становятся лидирующими в настоящее время.



Рис. 1.1. Мировая динамика частоты заболеваний [1]

Затраты на лечение, реабилитацию и социальную поддержку такого контингента больных ложатся тяжелым бременем на государственный бюджет и поглощают значительную часть средств, ежегодно выделяемых на здравоохранение. Указанные обстоятельства настоятельно требуют освоения и внедрения в клиническую практику новых, более эффективных и доступных методов восстановительного лечения больных.

Значительные успехи, достигнутые в различных областях медицинского материаловедения, стимулировали разработку и применение ряда новых биоматериалов, различных изделий из них, систем и устройств биомедицинского назначения. С использованием новых биоматериалов к настоящему времени удалось достичь существенных успехов в области разработки конструирования экстракорпоральных устройств и имплантатов. Это позволяет улучшить и спасти жизнь миллионов людей.

Однако при многих тяжелых заболеваниях внутренних органов для спасения жизни пациента до сих пор продолжает оставаться один путь – трансплантация донорских органов. Число различных пересадок органов и тканей, проводимых в мире в год, достигло 40 тыс., и в ближайшие десятилетия будет составлять 50 % всех операций. В развитых странах 1 млн пациентов имеют возможность находиться на гемодиализе, 40 тыс. проводят трансплантацию почки, 12 тыс. больным пересаживают другие внутренние органы. В последние годы в мире ежедневно проводится около 6 тыс. операций с применением аппаратов искусственного кровообращения, используется более 250 млн различных имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии. При этом ежегодно проводится не менее 400 000 имплантаций клапанов сердца (ИКС), 1 500 искусственных желудочков сердца (ИЖС), 600 000 протезов кровеносных сосудов малого диаметра, около 3 млн манипуляций стентирования сосудов. Наибольший рост числа имплантаций в ближайшие годы (от 40 % и более) ожидается для ИЖС (в основном как промежуточный этап пересадки сердца). В России потребность в трансплантации почки составляет не менее 10 тыс. человек ежегодно, в то время как в год пересаживается только около 500 почек, из них 350 – в Москве. Пересадку сердца ожидает около 5000 человек, а эту операцию в РФ выполняют только в НИИ трансплантологии и искусственных органов Росздрава (от 10 до 20 в год) [2; 3]. Важно подчеркнуть, что пока практически не решена проблема пересадки органов детям.

1.1.1. Новые реконструктивные технологии

На сегодняшний день уровень науки и техники позволяет предложить несколько альтернативных путей восстановления или замены поврежденных или пораженных патологией тканей и органов:

- трансплантацию;*
- имплантацию;*
- тканевую инженерию.*

На [рис. 1.2](#) приведен пример эволюции реконструктивных технологий в ортопедии в течение прошедшего столетия.

Анализируя [рис. 1.2](#), рассмотрим основные понятия и терминологию, используемые в трех перечисленных выше подходах реконструктивной медицины – трансплантации, имплантации, тканевой инженерии.

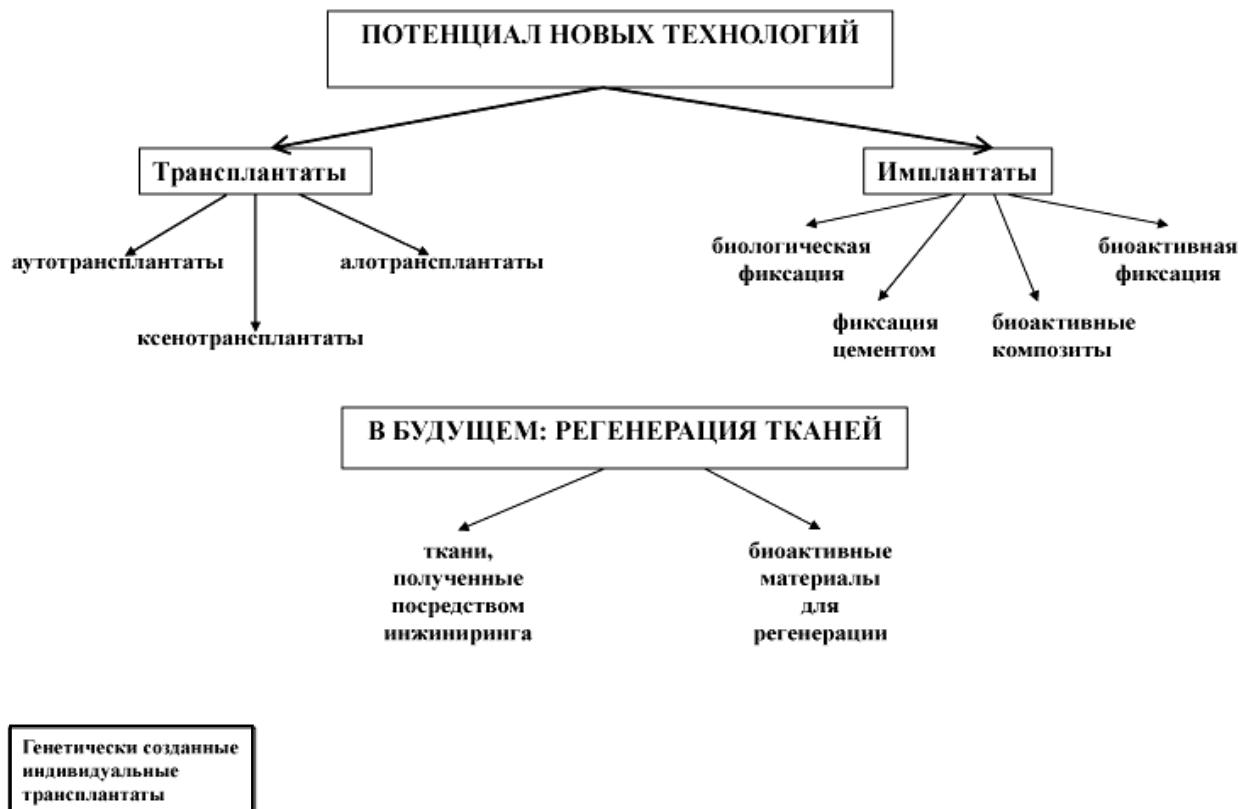


Рис. 1.2. Революционные изменения в лечении ортопедических дефектов на протяжении XX века [4]

Под весьма широким понятием «*медицинские изделия*» понимают инструменты, аппараты, вспомогательные устройства, имплантаты, реагенты, которые используют для лечения патологий или восстановления утраченных функций. *Имплантатом* (graft) принято считать медицинский объект (конструкцию или устройство), помещаемый хирургически (*имплантируемый*) в человеческое тело для восстановления или выполнения конкретной функции. В англоязычной литературе имплантат часто ассоциируют с понятием *эндопротез*, хотя возможна более узкая трактовка термина, при которой эндопротезом называют изделия, вводимые (имплантируемые) в организм с целью замены удаленного органа, его части или тканевого фрагмента. Встречается также употребление термина «*эксплантат*», который по смыслу является аналогом термина «*имплантат*». *Искусственные органы* – это медицинские устройства, используемые для временной или постоянной замены утраченной функции органа. *Биопротезы* – это протезы, состоящие из неживых (консервированных) тканей человека или животного. *Гибридный* или

биоискусственный орган – это искусственный орган, представляющий собой комбинацию из биоматериала и клеток (и/или тканей).

Объекты – *трансплантаты*, которые можно использовать для помещения в организм (*трансплантации*), могут быть представлены живыми тканями, клетками, органами. *Аутотрансплантация* – это пересадка биологического материала внутри одного человека. *Алотрансплантация* (или *гомотрансплантация*) – это пересадка клеток, органа или ткани от одного человека (*донора*) другому человеку (*реципиенту*). Пересадка биологического материала человеку от животных (другого биологического вида) – это *ксенотрансплантация*.

Каждый из потенциально возможных вариантов ([рис. 1.2](#)) имеет как позитивные, так и негативные моменты. Использование аутогенных трансплантатов (*аутотрансплантатов*) – биологического материала, взятого из организма пациента и предназначенного для имплантирования ему же, принято считать «золотым стандартом». Нельзя не отметить, однако, что количество «собственного» материала для пересадки ограничено и его получение связано с необходимостью хирургического вмешательства. Количество *алотрансплантатов* (или *гомотрансплантатов*), то есть биологического материала, взятого от другого человека, также лимитировано из-за ограниченной доступности, высокой стоимости и необходимости приема иммуносупрессоров в течение всей жизни пациента. *Ксенотрансплантаты* (биологический материал, взятый от других видов) требуют генетических или химических модификаций для исключения иммунного отторжения.

Трансплантация органов является эффективным и экономически целесообразным методом лечения тяжелых и угрожающих жизни заболеваний сердца, почек и других органов. Однако трансплантация органов не обеспечивает помощь всем нуждающимся в ней, главным образом, из-за дефицита трансплантатов. Согласно данным Объединенной сети обмена органами (United Network of Organ Sharing, UNOS), только в США более 87 000 человек занесены в лист ожидания совместимых донорских органов.

Органы и клетки животных (свиней, крупного рогатого скота и других млекопитающих) могут рассматриваться в качестве донорских органов и источников терапевтических клеток. Эта концепция получила название *ксенотрансплантации*. Главным препятствием на пути проведения ксенотрансплантаций является защитная реакция иммунной системы – гиперострое отторжение. Наиболее перспективным подходом к преодолению такого типа отторжения являются различные варианты генетической модификации. Один из вариантов – удаление, например свиного гена, кодирующего фермент, служащий основной причиной отторжения; другой возможный метод заключается в добавлении в геном клеток трансплантата человеческого генетического материала, маскирующего клетки свиней под человеческие. Особое внимание нужно уделять учету возможности передачи при ксенотрансплантации инфекционных заболеваний.

Таким образом, трансплантация органов не обеспечивает помощь всем нуждающимся в ней. Клиническое применение искусственных органов в на-

стоящее время ограничено только временным поддержанием функций жизненно важных органов и не обеспечивает многолетнего их функционирования. Использование имплантатов, протезов или искусственных органов для восстановления или замены частей организма практикуется гораздо чаще, чем использование трансплантатов, поскольку они более доступны и редко отторгаются иммунной системой организма. Однако следует помнить, что все имплантаты и искусственные органы изготовлены вне организма в технологическом процессе (или процессах). У них имеется ряд ограничений: отсутствует способность к самовосстановлению и к самоадаптации; их механические и биологические свойства представляют собой компромисс для заменяемых живых тканей и органов. Следовательно, пока никакие искусственные запасные части не стали полными аналогами живых частей тела, которые они заменяют. Поэтому успехи и удаchi их применения всегда относительны (как и в случае трансплантатов). Всегда существует риск того, что имплантат или трансплантат выйдут из строя и потребуют замены во время жизни реципиента. Поэтому решение проблемы повышения эффективности лечения и повышения качества жизни невозможно без внедрения в медицину новых революционных технологий.

Анализ работ в области трансплантологии и искусственных органов, появившихся к концу XX – началу XXI в., дает основание говорить о возникновении принципиально нового подхода к восстановлению функций поврежденных тканей и жизненно важных органов – *клеточной и тканевой инженерии*. Последние достижения в области молекулярной и клеточной биологии открыли широкие перспективы для создания принципиально новых и эффективных биомедицинских технологий, с помощью которых становится возможным решение многих проблем восстановления поврежденных тканей и органов и лечения ряда тяжелых заболеваний человека метаболического ряда (биоискусственные печень, почки, поджелудочная железа). Таким образом, третий вариант того, как можно обойти ограничения в использовании трансплантатов и имплантатов (см. [рис. 1.2](#)), – это возможности и потенциал тканевой инженерии тканей и органов. Цель таких технологий заключается в том, чтобы использовать собственные клетки пациента или иммунотолерантный «универсальный» источник клеток для выращивания тканей или органов с целью замены *in vitro* (*тканевая инженерия* или *инжиниринг тканей*) с последующей трансплантацией пациенту. В других вариантах клетки, полученные посредством инжиниринга тканей, могут быть имплантированы в организм пациента, где они будут стимулировать регенерацию поврежденных тканей и органов.

Однако для развития и совершенствования методов реконструктивной медицины на базе тканевой инженерии необходимо освоение новых материалов высокой функциональности и специфичности, включая конструирование систем, способных воспроизводить биологические функции живого организма.

1.2. Потребности реконструктивной медицины в функциональных материалах

Создание экологически чистых материалов с полезными свойствами является одной из ключевых проблем современности. Особую проблему представляет разработка новых материалов медицинского назначения, предназначенных для контакта со средой живого организма и необходимых для реконструктивной медицины. Еще более востребованы специализированные биосовместимые материалы для сформировавшегося в последние годы нового направления – клеточной и тканевой инженерии, связанного с разработкой биоискусственных органов.

Проблема использования новых материалов в различных областях медицины, помимо фундаментальных вопросов, связанных с изучением взаимодействия материала с тканями организма, представляет большой интерес для практической медицины. Исследования в области материалов медицинского назначения выступают одним из актуальных направлений, соответствующих задачам и уровню развития науки, технологий и техники РФ и перечню критических технологий Российской Федерации, в котором приоритетным направлением является «Технологии создания биосовместимых материалов». Эти исследования реализуются на стыке медицины, химии высокомолекулярных соединений, биотехнологии, биофизики, молекулярной и клеточной биологии и включают в себя следующие взаимосвязанные задачи:

- разработку новых материалов, методов их модификации и переработки их в специализированные изделия биомедицинского назначения;
- изучение механизма взаимодействия биоматериалов с кровью и тканями;
- оценку физико-химических и медико-биологических свойств биоматериалов и изделий из них;
- экспериментально-клиническое исследование и применение новых материалов и изделий.

Освоение новых биосовместимых материалов и создание специализированных биомедицинских изделий из них становится лидирующим направлением исследований и коммерциализации в настоящее время. Ежегодный бюджет медицинских центров в Европе, Японии и США, занимающихся проведением фундаментально-прикладных исследований в области тканевой и клеточной инженерии, составляет сотни миллионов долларов США.

Основной акцент исследователей сегодня фокусируется на поиске технологий для создания биоискусственных материалов и органов, представляющих собой систему из материалов искусственного или биологического происхождения, включающих функционирующие клетки органов и тканей, либо стимулирующие регенерацию соответствующих клеток в зоне имплантации. Особенно остра потребность в резорбируемых материалах, обладающих высокой биосовместимостью. Однако несмотря на значительные капиталовложения развитых стран в это направление, результаты многолетней

работы ученых пока не привели к созданию, в частности, искусственной поверхности, аналогичной по своим свойствам естественной биологической ткани. Несмотря на проводимые исследования, пока еще не удалось создать материал, полностью совместимый с живым организмом. В настоящее время остро востребованы биосовместимые материалы для общей и сердечно-сосудистой хирургии (протезов кровеносных сосудов, искусственных клапанов сердца, систем искусственного и вспомогательного кровообращения), ортопедии и стоматологии, разработки лекарственных препаратов нового поколения, сорбентов и т. д.

С развитием сердечно-сосудистой хирургии и трансплантологии становится актуален поиск материалов, пригодных для использования в условиях длительного контакта с кровью. При этом *гемосовместимость* является наиболее важным аспектом биологической совместимости биоматериалов. Требования, предъявляемые к биологическим свойствам материалов и изделий, которые предназначены для контакта с кровью, можно сформулировать следующим образом: гемосовместимые медицинские изделия не должны оказывать токсического, аллергического и воспалительного действия; активировать ферментные системы; оказывать отрицательное действие на белковые и форменные элементы крови, а также органы и ткани; вызывать антигенный и канцерогенный ответ и отклонения в системе метаболизма; провоцировать развитие инфекции и нарушать электролитический баланс; изменять свои медико-технические свойства в процессе нежелательной кальцификации и (или) биодеградации. Показателями отсутствия гемосовместимости медицинских материалов и изделий служит появление тромбов и тромбоэмболий, индуцированных их поверхностью. В связи с этим, как отмечает один из ведущих специалистов в области материаловедения, профессор В. И. Севастьянов, «...иногда термин «гемосовместимые» изделия (материалы, покрытия) заменяют на термин «тромборезистентные» («атромбогенные»), а вместо выражения «не гемосовместимые» изделия используют термин «тромбогенные», что не служит корректной заменой» [5].

Особую и существенную проблему представляет необходимость создания биоразрушающихся материалов и способных имитировать свойства биологических структур. Исследования таких материалов наиболее актуальны и востребованы в настоящее время. Это связано с революционными изменениями, происходящими в настоящее время в медицине в связи с появлением и развитием новейших работ в области трансплантологии и искусственных органов, базирующихся на принципиально новом подходе к восстановлению функций жизненно важных органов. Это использование технологий генной, клеточной и тканевой инженерии для разработки биоискусственных (гибридных) органов и тканей, клонирование органов и тканей из собственных стволовых клеток пациента *in vitro*. Назначение биоискусственных систем – полностью или частично, временно или постоянно заменить функции жизненно важных органов и тканей. Конечной целью является восстановление трехмерной структуры ткани в месте дефекта. Для направления организации, поддержания роста, пролиферации и дифференциации клеток в процессе ре-

конструкции поврежденной ткани необходимы так называемые матриксы (scaffolds – матрицы, носители, подложки, каркасы). Данное направление получило название «биоимитирование», а соответствующие материалы называют «саморегулируемыми» (self-monitoring), «умными» (smart) или «интеллигентными» (intelligent) [6]. Область применения таких материалов достаточно широка. Это трансдермальные или имплантируемые устройства с контролируемым и регулируемым выходом биологически активных веществ для лекарственной, клеточной и генной терапии; изделия с «памятью формы» для ортопедии и сердечно-сосудистой хирургии; биосенсоры; биodeградируемые изделия для реконструктивной хирургии; биотехнологические устройства для сепарации, очистки и идентификации биологических структур на молекулярном и клеточном уровнях и т. д.

Хирургия относится к тем медицинским наукам, которые испытывают наиболее острую потребность в разработке и внедрении в клиническую практику новых биосовместимых биоматериалов. Прежде всего эта потребность ощущается в реконструктивных технологиях, где в настоящее время активно исследуются не только материалы и изделия для сердечно-сосудистой системы, но различные хирургические элементы и эндопротезы, высокопрочный шовный материал, устройства и средства для абдоминальной хирургии, травматологии и ортопедии, челюстно-лицевой хирургии. Улучшение результатов хирургических вмешательств в абдоминальной хирургии, при пластике брюшной стенки, для предотвращения постоперационного спаечного процесса, анастомозирования и наложения швов на кишечнике, при реконструкции и протезировании желчевыводящих путей невозможно без внедрения новых материалов. Разработка новых материалов остро актуальна и востребована для реконструктивного остеогенеза. Серьезной проблемой современной восстановительной хирургии в травматологии и ортопедии, челюстно-лицевой хирургии и стоматологии является пластика дефектов костной ткани, образующихся при хирургическом лечении ряда заболеваний и повреждений кости. Результаты хирургического восстановления дефектов костной ткани в большей степени зависят от протекания процесса репаративного остеогенеза. Отдаленные сроки клинических исследований указывают на то, что репаративный остеогенез в посттравматических дефектах костной ткани проходит медленно – месяцы и годы, а в ряде случаев костные дефекты вообще не заполняются костной тканью. Учитывая высокий травматизм и большое количество ортопедических манипуляций, разработка новых эффективных методов и материалов для реконструкции дефектов костей, а также лекарственных средств для этого является одной из важнейших проблем травматологии и ортопедии, челюстно-лицевой хирургии и стоматологии. В настоящее время остро востребованными являются адекватные материалы для пластики больших костных дефектов, возникающих в результате хронических воспалений, после удаления кист, хондром, опухолей. Таким образом, все изложенное делает актуальным продолжение поиска и разработки новых эффективных остеопластических материалов для совершенствования методов устранения костных дефектов.

Не менее остра потребность в биodeградирующихся материалах в фармакологии. В настоящее время в практике лечения ряда системных, хронических и длительно текущих заболеваний наиболее перспективным и эффективным способом применения медикаментов признаны лекарственные формы длительного действия с контролируемым выходом препаратов. Это так называемые «drug delivery control». Такие формы особенно необходимы в трансплантологии при пересадке донорских и биоискусственных органов, для лечения хронических инфекций, в том числе возникающих в результате травм, послеоперационных осложнений в хирургической практике. Успех конструирования таких лекарственных систем невозможен без наличия адекватного материала, используемого в качестве матрикса для депонирования лекарства. Такие материалы должны быть абсолютно безвредными для организма, иметь определенные физико-механические свойства, обладать биоразрушаемостью без образования токсичных продуктов, не инактивировать лекарственные препараты и смешиваться с ними в различных фазовых состояниях.

Таким образом, поиск, изучение и внедрение в биомедицинскую практику новых материалов и изделий из них – актуальное и остро востребованное направление, успех развития которого будет способствовать прогрессу во многих областях медицины и в конечном счете улучшать качество лечения и жизни человека.

1.2.1. Требования, предъявляемые к материалам биомедицинского назначения

Материалы, предназначенные для контакта со средой живого организма и используемые для изготовления медицинских изделий и устройств, получили названия «*биоматериалы*». Перечень материалов, получение которых актуально для развития и совершенствования восстановительной хирургии и трансплантологии, включает разнообразные материалы и композиты с различными функциональными характеристиками и базовыми свойствами. В настоящее время предпринимаются усилия для классификации и создания базы данных по биоматериалам. При этом выделяют материалы для сердечно-сосудистой и тканевой хирургии, урологии, ортопедии и стоматологии, покрытия раневых поверхностей и создания систем доставки лекарственных веществ. Среди них материалы [5]:

- биологически совместимые с живым организмом (это материалы, которые при вживлении в организм, пребывая в нем длительное время не вызывают негативных реакций. В настоящее время успешно применяют силикон, тефлон, поликарбонаты, полигликолиды и полилактиды, полиэтилен, титан и др.);
- обладающие антитромбогенными свойствами (материалы, пригодные для длительного контакта с кровью и используемые для изготовления сосу-

дистых протезов, клапанов сердца, искусственного перикарда и легочных диафрагм);

- адсорбенты (материалы, используемые в конструкциях аппаратов искусственных органов (почки, легкого, сердца); применяемые в настоящее время, – активированный уголь, цирконий, ионообменные смолы и др.);

- вещества, переносящие кислород (это класс веществ типа фторированных углеводов, применяемых для растворения кислорода в высоких концентрациях, а также системы на основе капсульных покрытий эритроцитов крови животных и человека или химическое связывание высокомолекулярных веществ с гемом эритроцитов);

- диализно-диффузионные пленочные материалы (необходимы для получения диализных пленок, селективно выводящих из организма мочевины, креатинин и другие продукты обмена);

- волокнистые материалы (микропористые материалы с высокой эффективностью обмена веществ, применяемые в конструкциях искусственных органов, например, винилацетатные волокна (искусственная почка), силиконовые капилляры искусственных легких);

- материалы для микроинкапсулирования (необходимы для изготовления микрокапсул с диаметром порядка микрон для систем доставки лекарственных препаратов, переносчиков кислорода);

- упруго-эластичные материалы, стойкие к истиранию (материалы, предназначенные для создания искусственных костей и суставов, клапанов сердца. Эти материалы должны обладать комплексом механо-физических свойств, обеспечивающих их сохранность при длительном функционировании в условиях механических нагрузок);

- биоклеи для соединения живых тканей (необходимы для соединения фрагментов кишечника, кровеносных сосудов, желчных протоков и пр.; такие субстанции должны быть мгновенного действия, устойчивыми в условиях жидкой агрессивной среды организма, не продуцировать тепла и веществ токсической природы);

- композиционные материалы, в том числе для многоцветного использования (такие материалы могут быть созданы варьированием сочетаний полимеров единого гомологического ряда, а также синтетических материалов с металлами, биополимеров с синтетическими полимерами или металлами). Это позволяет получать материалы с принципиально новыми функциональными свойствами.

Внедрение искусственных материалов в медицине выдвинуло в число первоочередных и важнейших проблему *биологической совместимости*, так как материалы, применяемые в медицине, помимо требуемых функциональных характеристик, физико-химических и технологических свойств, должны быть полностью биосовместимыми с тканями и организмом в целом. Следует отметить, что понятие «*биосовместимость*» не имеет четкого толкования до настоящего времени. Биосовместимыми называют материалы, способные существовать совместно с живым организмом, не нанося ему вреда. По опре-

делению академика Н. А. Платэ, биосовместимыми являются «...полимеры, способные к метаболизму...». На конференции по биосовместимости, состоявшейся в 1994 г. в Великобритании, было предложено под биосовместимостью «понимать способность материала, изделия или устройства выполнять свои функции и не вызывать отрицательных реакций в организме «хозяина». «Биологическая совместимость», – как сформулировали японские исследователи Я. Сакураи и Т. Акаике (1981), – «понятие обширное, емкое. Материалы, обладающие этим свойством, образуют широкую гамму». Среди них, например, материалы со значительной механической прочностью для ортопедии и эластичные материалы для сосудистых протезов; шовные нити, которые достаточно быстро должны резорбироваться и усвоиться организмом и искусственные клапаны сердца, предназначенные для длительного функционирования; антитромбогенные материалы, а также материалы, способствующие быстрому свертыванию крови. В расширенном толковании биосовместимости следует подразумевать не только взаимное «сосуществование» двух субстанций (искусственной и естественной), но и то, что искусственный материал должен выполнять функции живой материи. При этом совершенно очевидно, что биосовместимость того или иного материала или имплантируемого элемента определяется не только его химической и надмолекулярной структурой, но и формой, топографией поверхности, спецификой взаимодействия с окружающими тканями. Таким образом, требования, предъявляемые к биоматериалам, разнообразны и многогранны, поэтому в каждом отдельном случае необходимо рассматривать конкретное содержание, вкладываемое в понятие биосовместимости применительно к целевому назначению каждого отдельного материала.

С развитием сердечно-сосудистой хирургии и трансплантологии остро актуален поиск материалов, пригодных для использования в условиях длительного контакта с кровью, то есть обладающих помимо общей биосовместимости также и гемосовместимостью. Научные исследования, ориентированные на решение вопроса био- и гемосовместимости материалов, были развернуты сравнительно недавно, в начале 1960-х годов в ходе разработок по созданию искусственного сердца. Широкий фронт работ в области новых биоматериалов был инициирован в США (National Institute of Health) и в России (Институт трансплантологии и искусственных органов МЗ СССР, Институт сердечно-сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева АМН СССР, Институт гематологии АМН СССР). В 1970–1980-е гг. основное внимание было сосредоточено на создании биосовместимых материалов с заданными физико-химическими и медико-техническими свойствами. Результатом этих исследований было появление широкого спектра новых биоматериалов и медицинских изделий.

Развитие медицинского материаловедения привело к формированию нового направления, задача которого состоит в изучении взаимодействия материалов с тканями живого организма и создании на этой основе специальных устройств, пригодных для удовлетворения широкого круга задач современной хирургии и трансплантологии. Одной из ключевых задач этого

направления является разработка и освоение новых материалов высокой функциональности и специфичности, включая конструирование материальных систем, способных воспроизводить биологические функции живого. Эти материалы способны изменять свои свойства в ответ на изменение параметров внешней среды (температуры, pH, осмотического давления).

Область применения саморегулируемых материалов широка и включает изделия с «памятью формы» для сердечно-сосудистой хирургии и ортопедии; биодеградируемые шовные нити, хирургические элементы, лекарственные средства; имплантируемые устройства для лекарственной и генной терапии с контролируемым и регулируемым выходом биологически активных веществ; биотехнологические системы распознавания, сепарации и очистки различных соединений на молекулярном и клеточном уровне.

Создание саморегулируемых биоматериалов базируется на химических и биотехнологических методах и включает различные подходы, среди которых наиболее перспективными признаны следующие:

- синтез материалов, способных изменять свои свойства в ответ на изменения внешней среды, а также содержащих биологически активные соединения;
- разработки гибридных материалов методами клеточной и тканевой инженерии);
- разработки материалов со специальными свойствами поверхности для непосредственного контакта с кровью и тканями организма человека;
- разработки материалов на основе обработанных и модифицированных биотканей человека и животных;
- разработки биодеградируемых материалов и композитов с контролируемым и регулируемым временем биодеградации, в т. ч. биополимеров, продуцируемых микроорганизмами.

Освоение новых материалов, обладающих помимо *биосовместимости* и *функциональности* также и *разрушаемостью in vivo*, представляет собой специализированную проблему, существенно более сложную по сравнению с трудностями, возникающими в ходе конструирования материалов и систем долговременного и постоянного функционирования *in vivo*. Эндопротезы временного действия, восполнив дефект органа или поврежденной ткани в живом организме и оказав при этом лечебный эффект, должны в строго заданные сроки подвергнуться биодеструкции с одновременным замещением тканевым регенерантом.

Основными факторами, сдерживающими в настоящее время широкое применение биодеструктивных полимерных материалов в медицине, являются в принципе небогатый ассортимент данных материалов, а также пока нерешенная проблема регулируемости и контролируемости процессов их деструкции в живом организме. Продуктами биодеструкции таких материалов могут быть естественные для живого организма вещества, включаемые в метаболизм клеток, например, моносахара, молочная, гликолевые и β-оксимасляная кислоты, либо вещества, не метаболизируемые клетками

и тканями. В последнем случае такие продукты не должны быть токсичными, а их концентрация при попадании в кровеносное русло не должна превышать установленный предельно допустимый уровень. В связи с этим применительно к биодеструктивным биоматериалам предложено различать два вида биосовместимости: «пассивную», сопровождающуюся выделением продуктов деструкции из организма без нанесения ему вреда, и «активную», при которой продукты деструкции вовлекаются в метаболические циклы клеток.

Области практического использования биодеструктивных материалов и изделий весьма широки, включая склеивание тканевых дефектов, герметизацию паренхиматозных органов с помощью полимерных пленок, покрытие ран и ожогов, изготовление хирургических шовных нитей и элементов для урологии, ортопедии, стоматологии, сосудистой и тканевой инженерии, а также пролонгацию лекарственных средств.

1.2.2. Допуск новых биоматериалов и устройств к применению

Особенности разработки и применения новых материалов медицинского назначения заключаются в обязательности соблюдения требований, выдвигаемых к высокому уровню их безвредности. Это привело к разработке специальных подходов и процедур, необходимых для получения разрешения на их применение в медицине.

В США и странах ЕС это направление деятельности закреплено законодательно. Классификация медицинских устройств и требования к масштабу и уровню их испытаний базируется на рисках, потенциально присущих каждому конкретному классу устройства. Под медицинским *устройством* приняты: приборы, аппараты, средства, машины, агрегаты, имплантаты, реактивы *in vitro* или другой аналогичный или подобный предмет, включая любой компонент или часть, который связан с диагностикой, уходом за больными, лечением или профилактикой заболевания или состояния, со структурой или функцией организма, с невозможностью достичь предполагаемую цель использованием посредством химических препаратов, с независимостью от усвоения системой обмена веществ.

В зависимости от класса медицинских устройств придаются различные уровни законодательных контрольных механизмов. В США регистрация медицинских устройств регулируется Администрацией по продуктам питания и препаратам (FDA); в Великобритании – Агентством по медицинским устройствам; в Японии – Министерством здравоохранения и социального обеспечения; в ЕС для изделий предусмотрена маркировка CE.

Определение медицинских устройств охватывает огромное количество изделий, начиная от реактивов, применяемых *in vitro* для диагностики, и кончая простыми приспособлениями, в частности, временными кожными повязками и очень сложными устройствами жизнеобеспечения, такими как кардиостимуляторы и клапаны сердца. Поэтому необходимо различать риски,

связанные с этими устройствами, в результате чего была создана система классификации медицинских устройств. FDA классифицирует медицинские устройства по риску для пациента, связанному с использованием этого устройства. Устройства класса 1 – это, как правило, устройства с низким уровнем риска, которые подвергают пациента незначительной опасности и неинвазивные, в частности, такие, как реактивы, применяемые *in vitro* для анализов в целях диагностики болезней или некоторых типов состояний. Устройства класса 2 представляют собой более высокий уровень риска для пациента и могут включать неинвазивные или инвазивные краткосрочные устройства типа катетеров, устанавливаемых всего лишь на короткое время, или некоторые электронные устройства, используемые для тестирования или анализа здоровья пациента. Оборудование для ЭКГ (электрокардиограммы) и рентгена – это устройства класса 2. Класс 3 – это устройства с высокой степенью риска, имплантируемые на продолжительный срок. В США существует два основных пути к получению законодательного статуса: получение разрешения после того как будет продемонстрировано, что устройство, предлагаемое к выводу на рынок, в значительной степени эквивалентно устройству, выведенному на рынок до принятия Поправки о медицинских устройствах 1976 г. (известное как разрешение 510 (k), или предпродажного разрешения, которое предполагает подачу и рассмотрение подробных данных, касающихся устройства, для подтверждения безопасности и работоспособности).

В Европе принята четырехуровневая система, основанная на степени риска, связанного с использованием устройства, времени, в течение которого устройство находится в контакте с организмом человека, и степени инвазивности устройства (Директива ЕС 93/42 «Медицинское устройство»). Медицинские устройства являются частью общей системы законодательства, регламентирующего требования к качеству и безопасности всех изделий, продаваемых в Европе. Изделия, соответствующие этим правилам, имеют марку «СЕ». Европейская комиссия выпускает директивы для координации системы во всем Европейском Союзе (ЕС). Директивы, относящиеся к медицинским устройствам, содержат классификацию и другие существенные требования, которые должны соблюдать производители и государства-члены. Специальные директивы определяют также технологические процессы, которые необходимо выполнять тем, кто связан с производством, продажей, использованием и регулированием, касающимся медицинских устройств. В ЕС устройства класса 2a, как правило, очень похожи на устройства класса 2 в соответствии с классификацией FDA в США. Однако ЕС создал класс 2b, в который входят имплантируемые устройства, включающие рассасывающиеся материалы и другие типы долгосрочных имплантатов. Устройства класса 3 связаны с высоким уровнем риска для пациента в случае их выхода из строя, которые представляют собой долгосрочные имплантируемые устройства, которые либо считаются жизнеобеспечивающими, либо в случае выхода из строя приведут к серьезной опасности для здоровья и благополучия пациента. К устройствам класса 3 относятся кардиостимуляторы, устрой-

ства полной замены бедра и колена, материалы костных трансплантатов, кардиологические устройства стимуляции и клапаны сердца.

В России до недавнего времени действовали нормативные документы, разработанные еще в СССР. Однако в 1999 г. на базе действующего Международного стандарта ИСО 10993-99 по оценке биологической безопасности медицинских материалов и изделий, принятой в настоящее время в США и странах ЕС, в России был введен ГОСТ Р ИСО 10 993.99 «Оценка биологического действия медицинских изделий». В 2007 г. издан Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ № 488 «Об утверждении Административного регламента Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития по исполнению государственной функции по выдаче разрешений на применение новых медицинских технологий». Неотъемлемой частью процесса выдачи разрешения на применение новой медицинской технологии является классификация в зависимости от степени потенциального риска применения в медицинских целях по трем классам:

класс 1 – медицинские технологии с низкой степенью риска, включающие в себя прочие медицинские технологии;

класс 2 – медицинские технологии со средней степенью риска, включающие в себя медицинские технологии, оказывающие прямое (хирургическое) воздействие на кожу, слизистые оболочки и естественные полости организма; терапевтические, физиотерапевтические и хирургические манипуляции в дерматокосметологии;

класс 3 – медицинские технологии с высокой степенью риска, включающие в себя медицинские технологии, оказывающие прямое (хирургическое) воздействие на органы и ткани организма (за исключением медицинских технологий, относящихся к классу 2); пластические реконструктивные операции; медицинские технологии, связанные с использованием клеточных технологий и генных манипуляций, трансплантации органов и тканей.

Выдача разрешений на применение новых медицинских технологий в РФ осуществляется Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития на основании результатов соответствующих исследований, испытаний и экспертиз, подтверждающих эффективность и безопасность медицинской технологии. При рассмотрении вопроса о выдаче разрешения на применение новой медицинской технологии, эффективность устанавливается как степень достижения медицинской технологией целей своего предназначенного использования; безопасность характеризуется соотношением риска причинения ущерба пациенту, персоналу, оборудованию или окружающей среде при правильном использовании медицинской технологии и значимости цели, ради которой она используется. Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения и социального развития осуществляет контроль за соблюдением действующих требований к порядку проведения клинических и биомедицинских исследований новой медицинской технологии и средств для ее реализации.

Для регистрации новых медицинских технологий медицинского назначения и устройств и изделий для их реализации предусматривается проведение цикла исследований, включающих: проведение санитарно-химических, токсиколого-гигиенических исследований, санитарно-гигиеническую оценку изделия; проведение приемочных технических испытаний изделия; проведение медицинских испытаний изделия.

На первом этапе с применением современных физико-химических методов (хроматография, масс-спектрометрия и т. д.) оценивают материал и вытяжки из него; с использованием тест-объектов (изолированные органы животных, культуры тканей и клеток и т. п.) определяют возможность проявления цито- и тканетоксического действия; на лабораторных животных проводят токсикологические исследования. Результаты этого этапа, включающие санитарно-химические, цитотоксические, токсикологические и патоморфологические исследования, позволяют провести отбор соответствующего материала. Эти исследования, как правило, проводятся специальными сертифицированными лабораториями и организациями.

На втором этапе проводят токсиколого-гигиенические испытания макетных образцов, являющихся прототипами промышленных изделий, при изготовлении которых учитываются такие технологические условия, как режимы переработки, условия стерилизации, условия хранения и т. п. На этом этапе используют те же методы, что и на первом этапе. При положительном прохождении данного этапа исследований изделия и материалы рекомендуются к клиническим испытаниям.

Клинические испытания, в свою очередь, состоят также из нескольких этапов (фаз). На первом этапе новое медицинское изделие и технологию его применения проверяют на 20–30 добровольцах с их информированного согласия в так называемых локальных исследованиях. Далее с разрешения надзирающих органов проводятся ограниченные клинические испытания с участием 300–500 добровольцев. В случае положительных результатов назначается расширенное клиническое исследование с участием не менее тысячи человек, которое проводится, как правило, в нескольких независимых клиниках. И только после получения достоверного доказательства положительных результатов подготавливается документация к регистрации изделия.

Администрация по продуктам питания и препаратам (FDA) была создана Актом Конгресса Соединенных Штатов в 1906 г. в результате принятия Акта о продуктах питания и препаратах. В течение ряда лет Конгресс США постоянно пересматривал и уточнял рамки действия и контроля за деятельностью FDA. В 1938 г. Конгресс принял «Акт о продуктах питания, препаратах и косметике», который определил и зафиксировал директивы того, что обязаны были делать производители косметики лекарств для предотвращения фальсификации своей продукции. Этот акт 1938 г. определил роль FDA как надзирающего органа, разрешающего продажу и сбыт препаратов и косметики и имеющего полномочия преследовать компании, нарушающие закон. В 1976 г. были приняты важные законы, известные как «Поправки, касающиеся медицинских устройств». В результате были выработаны четкие определения того, что представляют собой медицинские устройства, а также

установлены классификации и способы, с помощью которых производители медицинских устройств должны выводить свои изделия на рынок. В 1990 г. Конгресс пошел дальше в этом направлении и ввел в действие «Акт о безопасности медицинских устройств», который расширил контроль, осуществляемый FDA. Производители устройств высокого уровня риска класса 3 в настоящее время обязаны отслеживать устройство от начала производства до имплантирования. Таким образом, если что-то произойдет с устройством после имплантации, можно будет найти пациента с целью замены устройства. Эта поправка к законодательству о медицинских устройствах также переклассифицировала многие устройства, которые раньше были устройствами класса 3, в устройства класса 2.

В ряде стран Европы в 1997 г. были приняты «Директивы о медицинских устройствах». Таким образом, два крупнейших рынка медицинских устройств (в США и ЕС) работали при двух различных системах. Поэтому Конгресс США принял Акт 1997 г. о Модернизации FDA. Этим Актом нормы и правила FDA были приведены в соответствие с правилами ЕС и других стран. После создания ЕС в 1980-х гг. были выработаны единые правила для того, чтобы медицинские устройства могли продаваться и распространяться по одному набору правил. Соглашение было оформлено в виде «Директивы 93/42 ЕС о медицинских устройствах», предусматривающее соответствие этих устройств требованиям или маркировке CE медицинских устройств. Директива ЕС о медицинских устройствах создала механизм, определивший уведомляемые органы, то есть организации, отвечающие за выдачу марки соответствия, марки CE производителям медицинских устройств. В этой Директиве было установлено, что производители должны выполнять правила системы качества ISO 9001 и требования систем качества ISO DIS 13485 для медицинских устройств.

Марка «CE» – это маркировка соответствия ЕС, обеспечивающая соответствие изделия определенным основным требованиям. Требования для получения марки CE согласно «Директиве 93/42 о медицинских устройствах» включают 40 пунктов, которые охватывают все известные источники опасности для пациента; все пункты ранжируют на шесть основных категорий. Основные требования для получения марки CE: внутренний контроль технологии производства, проверка соответствия нормам ЕС, проверка соответствия типа, обеспечение качества производства, проверка изделия, обеспечение полного качества.

1.3. Современное представление о клеточных технологиях

Будущее медицины сегодня напрямую связывают с развитием клеточных технологий. Эта технология позволяет, не меняя поврежденный орган, «обновлять» его клеточный состав. Такое «обновление» структурно-функциональных элементов органа, сможет решать те же задачи, что и органная трансплантация. Вместе с тем эта технология намного расширяет воз-

возможности трансплантационного лечения, делая его доступным для широкого круга разных категорий пациентов. Основой для развития клеточных технологий являются стволовые клетки, способные в зависимости от микроокружения превращаться в клетки разных органов и тканей. Одна такая клетка может дать множество функционально активных потомков. В настоящее время в мире активно разрабатываются подходы к наращиванию стволовых клеток, а также интенсивно исследуются возможности их генетической модификации. Список болезней, при лечении которых клеточные технологии уже используются или их применение планируется в ближайшем будущем, быстро растет.

Обогащенным источником стволовых клеток являются фетальные ткани. Относительно высоко содержание этих клеток в пуповинной крови. Будучи трансплантированными, аллогенные стволовые клетки способны приживляться и дифференцироваться в зависимости от микроокружения. Эти клетки способны значительно повысить адаптивные возможности организма за счет усиления процессов физиологической и репаративной клеточной регенерации. При соблюдении определенных условий аллогенная клеточная трансплантация может не вызывать иммунных реакций, направленных на отторжение донорских клеток. Это подразумевает возможность применения трансплантационных клеточных технологий без использования иммуносупрессорной терапии. Представляется важной с медицинской точки зрения способность низкодифференцированных клеток тормозить, а в некоторых случаях реверсировать развитие грубоволокнистой соединительной ткани. Такое торможение создает важные дополнительные предпосылки для эффективного восполнения клеточных потерь организма новыми функционально-полноценными клетками. Трансплантация низкодифференцированных клеток незрелой кроветворной ткани во взрослый организм может способствовать восстановлению кровотока в ишемизированных органах и тканях. Этот эффект объясняется наличием в этой ткани незрелых предшественников эндотелиальных клеток, способных генерировать рост новых кроветворных сосудов. В неврологии трансплантационная клеточная технология была впервые применена при лечении болезни Паркинсона. Обнадеживающие результаты применения клеточной технологии получены при лечении болезни Хаггинтона. Значительный опыт в лечении травматических поражений головного и спинного мозга накоплен в Новосибирском центре иммунотерапии и клеточной трансплантации. Предметом исследования и клинического применения является также противоопухолевая активность низкодифференцированных кроветворных клеток. Важным компонентом такой активности является способность этих клеток прямо супрессировать опухолевый рост. Имеются данные об антиатеросклеротической активности низкодифференцированных клеток. Одно из проявлений этой активности – снижение сыровоточного уровня атерогенных липопротеинов. Результатом трансплантации

низкодифференцированных клеток, полученных из донорской незрелой кроветворной ткани, является значительное повышение регенераторных и адаптивных возможностей организма. Вызываемое этими клетками «обновление» организма, по-видимому, может препятствовать развитию процессов, ведущих к старению организма. Отсюда перспективность и целесообразность использования клеточных технологий в лечении целого ряда заболеваний, обусловленных старением организма.

В настоящее время большое внимание уделяется клеточным технологиям, основанным на трансплантации стволовых клеток, полученных от самого больного. Преимущества этих технологий заключаются в доступности подходящего неиммуногенного клеточного материала (приемлимый источник – костный мозг). Получены экспериментальные данные, указывающие на перспективность применения аутологичных костномозговых стволовых клеток в лечении тяжелых неврологических и сердечно-сосудистых расстройств. Таким образом, развитие и внедрение клеточных технологий призвано кардинально изменить ситуацию с лечением целого ряда заболеваний, практикуемая медикаментозная терапия которых малоэффективна.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

2.1. Современные материалы для биомедицины

Круг материалов, используемых в медицине, весьма широк и включает материалы природного и искусственного происхождения, среди которых – металлы, керамики, синтетические и естественные полимеры, различные композиты и др. Материалы, предназначенные для контакта со средой живого организма и используемые для изготовления медицинских изделий и устройств, получили название «биоматериалы». Несмотря на значительные успехи, достигнутые в биоматериаловедении к настоящему моменту, такие материалы все еще остро дефицитны, и пока не удалось создать субстанции, полностью совместимые с живым организмом.

Одно из основных требований, предъявляемых к материалам медицинского назначения, они должны быть биологически совместимыми с живым организмом. Это материалы, которые при вживлении в организм и пребывая в нем длительное время, не вызывают негативных реакций в нем.

2.1.1. Металлы

Металлические материалы, как правило, это сочетания металлических элементов (железа, титана, золота, алюминия), используются в силу высокой механической прочности в ортопедии, ортодонтии, во внутренних электрических устройствах и в искусственных органах. Выбор металлических материалов или сплавов для медицины проводят, исходя из следующих характеристик: 1) биосовместимость, 2) физические и механические свойства, 3) старение материала. Наибольшее распространение получили нержавеющие стали, титан и его сплавы, сплавы кобальта. Сравнительно недавно разработан материал из никеля и титана (нитинол), он обладает памятью формы и получил в настоящее время широкое применение для разработки различных устройств и имплантатов. благородные металлы (золото и платина) применяют в ограниченных масштабах для изготовления химически инертных протезов.

Металлы в силу высокой механической прочности являются предпочтительным материалом для ортопедии. Это связано, прежде всего, с тем, что металлы характеризуются высоким *пределом текучести* и *жесткости*. В ортопедической практике при хирургии крупных костных дефектов могут возникать высокие напряжения, поэтому имплантируемый материал должен выдерживать эти напряжения, не проявляя остаточной деформации или разлома. Напряжение измеряют как силу на единицу площади (в системе СИ – в паскалях, Па). Соотношение между деформацией и первоначальным размером образца материала есть *натяжение*. Если металлический материал

деформируется посредством приложения растягивающего напряжения, то в направлении приложенной силы возникает *удлинение*.

Натяжение – это соотношение увеличения длины и первоначальной длины образца. Градиент графика напряжения-натяжения называется модулем упругости (или модулем Юнга). Если действие приложенной силы, деформирующей материал, снимается, материал мгновенно возвращается к своим исходным размерам. Такое обратимое поведение называется *упругой деформацией*. В идеале используемый материал должен обладать модулем упругости, аналогичным модулю упругости кости. Как правило, если материал испытывает какой-либо вид циклической нагрузки, он выходит из строя при более низком напряжении, чем предел текучести при однократном цикле испытаний. Такое явление в материаловедении называется *усталостью*. Это существенно ограничивает области применения металлов. Следующее важное свойство металлов – это *устойчивость к локальной пластической деформации*, которое выражается в появлении на поверхности металлического изделия вмятин, царапин и т. п. Значение *твердости металла* используют также для оценки прочности материала на растяжение; твердость металла влияет также на его износостойкие свойства.

Новая эра применения металлов в медицине связана с открытием способности некоторых металлов «запоминать» предыдущую форму. Впервые это свойство было обнаружено в 1950-х гг. у сплава золота с кадмием; сплав деформировался при низкой температуре и возвращался в исходное состояние при нагревании до критической температуры. Широкое распространение в реконструктивной медицине получили сплавы никеля с титаном (*нитинол*). Эти сплавы, помимо обладания свойством памяти формы, также характеризуются *сверхупругостью*. Изделия различной формы и массы из этого сплава могут претерпевать большое количество деформаций, возвращаясь в свое исходное состояние. Механические свойства металлов с памятью формы позволяют применять для различных медицинских технологий.

Негативным для медицины свойством многих металлов является коррозия. Металлы склонны к коррозии (за исключением благородных металлов). Коррозия имплантированного металлического изделия под воздействием агрессивных биологических жидкостей может привести к выходу его из строя, а также накоплению в организме токсичных продуктов.

Требования, применяемые к металлам медицинского назначения, следующие: биосовместимость; обладание соответствующими физическими и механическими свойствами; длительный срок службы; отсутствие сильной коррозии.

2.1.2. Керамика

Главными характеристиками керамики являются биосовместимость, высокая твердость, изолирующие свойства теплоты и электричества, термо- и коррозиестойкость. Общим свойством керамических материалов является стойкость к воздействию высоких (свыше 500 °С) температур. Среди недос-

татков, ограничивающих применение керамики в медицине, ее хрупкость и ломкость.

Керамики состоят из неорганических и органических соединений. Традиционные керамики – фарфор, глины и цементы; современные керамические материалы – ферроэлектрики, неметаллические магнитные материалы, конструкционные окисные и неокисные материалы. Керамические материалы, используемые в медицине, называются биокерамикой. Среди биокерамик, нашедших клиническое применение (в основном для реконструкции дефектов костной ткани) – оксид алюминия, двуокись циркония, окись титана, трикальцийфосфат, гидроксиапатит, алюминаты кальция, биоактивное стекло и стеклокерамика. В зависимости от «поведения» в организме биокерамику подразделяют на биоинертную, биоактивную и растворяющуюся *in vivo* (резорбируемую).

Керамические материалы, как правило, представляют собой поликристаллические (зернистые) структуры или смеси двух и более кристаллических фаз. В различных типах керамик размер зерен может варьировать в широком диапазоне (1–1000 мкм). Пористость керамик может быть грубой, открытой и закрытой. Упругие свойства керамики определяют ее механическое поведение и тесно связаны с кристаллической структурой. Стеклокерамика представляет собой особый класс керамики и полукристаллические материалы с мелкими (менее 1 мкм) керамическими кристаллитами.

Константы упругости керамики также зависят от микроструктуры. Например, пористость влияет на константы упругости, которые уменьшаются с увеличением пор. Помимо процентного содержания пор в керамике, форма пор и их ориентация влияют на упругость.

Наиболее распространенными кристаллическими структурами керамики являются следующие:

простые кубические (например CsCl, CsBr, CsI);

плотные упакованные кубические, так называемая гранцентрированная кубическая структура, (например CaO, MgO, FeO, BaJ);

плотно упакованные гексагональные (например Al₂O₃, Fe₂O₃, Cr₂O₃).

Помимо структуры на физико-механические, то есть эксплуатационные, свойства керамик существенное влияние оказывает способ обработки.

Для клинического применения керамика должна иметь соответствующие биологические, физические и механические свойства. Трудно стабилизируемое свойство керамики – необходимость плотного и постоянного контакта с тканями в месте их дефекта. Если при контакте тканей и керамического имплантата возникают перемещения, то возможны разлом как собственно имплантата, так и костных структур. Более прочное крепление имплантата и обеспечение его связи с костью возможно с помощью специально сконструированных покрытий из пористых структур, изготовленных из гидроксиапатита, биоактивного стекла (типа разрешенного в клинике специализированного силикатного стекла «Bioglass®»), апатито-волластонитовой керамики, которые являются биоактивными. Биокерамика, которая является биоактивной и резорбируемой, – это пример биоматериала третьего поколения,

пригодного для использования в новейших биомедицинских технологиях (клеточной и тканевой инженерии). Для этих целей биокерамика изготавливается с необходимым количеством и размером пор.

Разработка биорезорбируемых керамических материалов – весьма сложная проблема, так как требует реализацию такого подхода к конструированию материала, при котором скорости его резорбции в организме должны соответствовать скорости образования новых тканей. Как известно, скорости роста ткани у разных пациентов с различными видами травм чрезвычайно варьируют. Это обстоятельство, а также низкие прочностные характеристики керамик весьма ограничивают области применения в медицине. Обычно керамики применяют для изготовления имплантатов в сочетании с более механически прочными металлическими материалами, в результате получают более прочные конструкции с усиленными механическими свойствами и упругими константами, соответствующими характеристикам костной ткани.

Стремительное развитие науки и техники, наблюдаемое в последние годы, приводит к все более широкому внедрению в медицине различных соединений, включая высокомолекулярные как синтетического, так и природного происхождения. Разнообразие материалов и особенно полимеров, варьирование в широких пределах их стереоконфигурации и молекулярной массы, возможность получения композитов в разнообразных сочетаниях с различными веществами, – все это является основой для получения широчайшего спектра новых материалов с новыми ценными свойствами. Создание композитов – это перспективная область материаловедения, которая позволяет на базе сочетания уже известных и выпускаемых материалов более эффективно и быстро придать им принципиально новые свойства по сравнению с трудоемким и длительным путем создания новых материалов.

2.1.3. Композитные материалы

Композиты – это многокомпонентные материалы, состоящие из полимерной, металлической, углеродной, керамической или другой основы (матрицы), армированной наполнителями из волокон, нитевидных кристаллов, тонкодисперсных частиц и др. Композитные материалы – это смесь двух фаз или более, связанных вместе так, что передача напряжения происходит по их границе. Поскольку напряжение не передается в пустоты, пористая керамика, металл или пластмасса обычно не считаются композитом, даже если материал содержит две фазы – твердую и пустоты. Если пористая структура инфильтруется тканью, она все-таки может вести себя как композитный материал, но только если стык ткани и материала является достаточно прочным для передачи напряжений. Композитные материалы создают для того, чтобы обеспечивать сочетание свойств, которые не могут быть достигнуты с помощью материала, имеющего одну фазу.

Композиционные материалы состоят, как правило, из пластичной осно-

вы (*матрицы*), армированной *наполнителями*, обладающими высокой прочностью, жесткостью и т. д. Сочетание разнородных веществ приводит к созданию нового материала, свойства которого количественно и качественно отличаются от свойств каждого из его составляющих. Варьируя состав матрицы и наполнителя, их соотношение, ориентацию наполнителя, получают широкий спектр материалов с требуемым набором свойств. Многие композиты превосходят традиционные материалы и сплавы по своим механическим свойствам, но в то же время они легче. Использование композитов обычно позволяет уменьшить массу конструкции при сохранении или улучшении ее механических характеристик

Путем подбора состава и свойств наполнителя и матрицы (связующего), их соотношения, ориентации наполнителя можно получить материалы с требуемым сочетанием эксплуатационных и технологических свойств. Использование в одном материале нескольких матриц (*полиматричные композиционные материалы*) или наполнителей различной природы (*гибридные композиционные материалы*) значительно расширяет возможности регулирования свойств композиционных материалов. Армирующие наполнители воспринимают основную долю нагрузки композиционных материалов. По структуре наполнителя композиционные материалы подразделяют на волокнистые (армированы волокнами и нитевидными кристаллами), слоистые (армированы пленками, пластинками, слоистыми наполнителями), дисперсноармированные, или дисперсноупрочненные (с наполнителем в виде тонкодисперсных частиц). Матрица в композиционных материалах обеспечивает монолитность материала, передачу и распределение напряжения в наполнителе, определяет тепло-, влаго-, огне- и химическую стойкость. По природе матричного материала различают полимерные, металлические, углеродные, керамические и другие композиты. Наиболее широкое применение получили композиционные материалы, армированные высокопрочными и высококомодульными непрерывными волокнами.

Композиты, в которых матрицей служит полимерный материал, являются одним из самых многочисленных и разнообразных видов материалов. Их применение в различных областях дает значительный экономический эффект. Известны полимерные композиционные материалы на основе *терморезистивных* (эпоксидных, полиэфирных, феноло-формальдегидных, полиимидных и др.) и *термопластичных связующих*, армированных различными добавками. *Углепластики* получают при наполнении полимерной основы углеродными материалами; *стеклопластики* – стеклянными, *органопластики* – органическими материалами, *боропластики* – соединениями бора и т. п. В последние годы активно развивается направление получения композиционных материалов на основе углерода, армированного углеродными волокнами, это *углерод-углеродные материалы*. Композиционные материалы на основе керамики, армированной углеродными, карбидкремниевыми и другими волокнами, а также металлы с керамическими покрытиями активно применяют в стоматологии и ортопедии. К настоящему времени с использованием углеродных, стеклянных, арамидных и борных волокон созданы ком-

позиции с ударной прочностью и ударным модулем упругости, в 2–5 раз большими, чем у обычных конструкционных материалов и сплавов. Волокнистые композиционные материалы превосходят металлы и сплавы по усталостной прочности, термостойкости, виброустойчивости, шумопоглощению, ударной вязкости и другим свойствам.

Композиты, в которых матрицей служит полимерный материал, являются одним из самых многочисленных и разнообразных видов материалов, применяемых в медицине. Известный пример такого композита – это стекловолокно, в котором стеклянные волокна придают жесткость полимерному компоненту (смоле), создавая таким образом легкий, прочный, упругий композит. Эта концепция была использована при создании эпоксидно-керамического биокомпозита «Серозиум®», который был разработан в США в целях имитации упругих свойств кости. Имплантаты, изготовленные из этого композита, однако, вышли из строя из-за биоразрушения полимера и связи между полимером и керамикой. Пример печального применения «Серозиума®» свидетельствует о необходимости учета того, чтобы медицинский имплантат выполнял одновременно функциональные требования и требования к совместимости. Большинство коммерческих композитных материалов пока, как правило, не могут выполнить этот критерий. В [табл. 2.1](#) представлены несколько составов и примеров механических свойств ряда коммерческих композитов, которые, к сожалению, не отвечают всем необходимым требованиям. В то же время естественная кость, которая служит композитом коллагена и гидроксиапатита (ГАП), является идеальным композитом. Фибриллы коллагена, имеющего низкий модуль упругости, ориентированы в кости таким образом, что их прочные первичные связи параллельны приложенным напряжениям. Высокий модуль упругости минерала кости ГАП обеспечивает жесткость, а прямая химическая связь между двумя фазами обеспечивает необходимую передачу напряжений.

Таблица 2.1

Характеристики выпускаемых коммерческих композитных материалов [1]

Состав композита		Объемная доля волокон или нитей	Плотность, фунты/кв. дюйм	Прочность на разрыв, фунты/кв. дюйм	Модуль упругости Юнга, фунты/кв. дюйм
матрица	волокно или нить				
Эпоксидная смола	Стекло S	0,60	0,072	290×10^3	$7,4 \times 10^6$
Эпоксидная смола	O	0,40	0,055	103×10^3	22×10^6
Эпоксидная смола	Al_2O_3	0,44	0,063	72×10^3	24×10^6

Вполне успешные биокомпозиты, которые соответствуют природным компонентам кости, разработаны из ГАП и коллагена (45 % объема в них составляет гидроксиапатит и 55 % объема – коллаген). Далее природный ГАП был заменен синтетическим ГАП в виде микроскопических частиц ГАП,

а коллаген – полиэтиленом (ПЭ). Полученный в результате материал был разработан в качестве аналога кости, а не в качестве несущего нагрузку ортопедического устройства и был назван «НАРЕХ®». Выпускается спектр композитов на основе микрочастиц ГАП и высокоплотного полиэтилена с объемными долями ГАП в пределах от 0,1 до 0,6, имеющих модуль Юнга от 1 до 8 ГПа, а натяжение до выхода из строя от > 90 до 3 % в зависимости от объемной доли ГАП.

Механические испытания этих композитов показали, что верхний предел содержания ГАП составляет объемную долю 0,4. Полученная в результате трещиностойчивость материала сравнима с трещиностойчивостью кортикального слоя кости. Однако биологические испытания композита *in vivo* показали, что при объемной доле ГАП менее 0,2 материал становился биологически инертным. В середине 1990-х гг. были проведены первые клинические испытания композитов ГАП с полиэтиленом; далее материал был лицензирован коммерческим производителем в качестве суррогата кости, при этом главными сферами применения были приняты хирургия уха, носа и горла. Управление США по регулированию продуктов питания и медикаментов впоследствии утвердило материал, разрешив продажу британской технологии в США, а также ему была присвоена Марка Европейского совета. Композиту «ГАП/ПЭ» было дано торговое название «НАРЕХ1М», после чего последовало клиническое использование материала во всем мире.

Для оценки функциональных свойств композитных материалов предложен индекс для сравнения с качеством натуральной кости. Этот индекс основывается на том, что следующие свойства имеют большое значение при оценке искусственных материалов, заменяющих кость: модуль упругости; прочность; трещиностойчивость; биоактивность. При помощи четырех переменных имеется возможность создать индекс качества (Iq) эффективности материала в сравнении с натуральной костью: Индекс качества (Iq) = (трещиностойчивость \times показатель биоактивности x прочность на растяжение) / модуль Юнга.

Разработанный композитный материал «Bioglass®», как было установлено при испытаниях, способен эффективно заменять губчатую кость. Полученный позднее композит полисульфона и «Bioglass®» имеет улучшенные свойства, максимально приближенные к свойствам кортикального слоя кости. Этот материал также имеет высокую биоактивность. Для усиления ортопедических устройств, предназначенных для изготовления протезов бедренных стволков, коленных протезов, пластины для фиксации переломов, была предпринята попытка создания серии композитов инертных стекловолокон с углеродными волокнами.

Результаты многолетних клинических применений свидетельствуют об успешности применения металлических изделий для реконструкции поврежденных бедренных костей. Для этих целей были разработаны более легкие и биосовместимые композитные эндопротезы на основе полисульфона, армированного углеродным волокном. Конструкция имеет сердцевину однонаправленного углерода/полисульфона с двунаправленными многожильными

внешними слоями. Наблюдения за животными, которым были имплантированы устройства из этого композитного материала, показали отсутствие неблагоприятных реакций со стороны организма и каких-либо осложнений в месте реконструкции дефекта.

Проводились исследования по протезированию изделиями из композитных материалов бедренных суставов. В связи с обнаруженными негативными последствиями использования полиэтилена для изготовления эндопротезов вертлужной впадины (разрушение кортикального слоя кости организма-хозяина вследствие разрушения полимера), материал дополнительно был усилен углеродными волокнами. Испытаны эндопротезы вертлужных впадин из пластмассы, армированной углеродным волокном, путем их взаимодействия с головками бедра из окисла алюминия в имитаторе бедра при нагрузках 2500 Н с частотой сокращения сустава 0,857 Гц. Было сделано заключение о том, что эндопротез пригоден для имплантации, однако другие экспериментальные данные показали, что при поломке эндопротеза углерод выходит в ткани организма-хозяина. Это может вызвать кистоз, воспаление тканей и другие токсические реакции. В связи с тем, что полиэтилен ультравысокого молекулярного веса, используемый для протезирования коленных суставов большеберцовых костей у молодых людей на длительные сроки, как оказалось, в процессе эксплуатации подвержен перемещениям, применили армирование устройства углеродным волокном; после этого механическая износостойкость повысилась в два раза. Однако также имели место воспаление тканей в месте имплантации из-за присутствия углеродных волокон во взаимодействующих поверхностях. Таким образом, композитные материалы потенциально могут использоваться в подвергаемых нагрузкам ортопедических случаях применения, но очень немногие из них прошли клинические испытания и разрешены к применению.

Широкое развитие получило направление создания композиционных материалов металлов и керамик. Первым примером был композит «биокерамика-никелид титана». В таких композитах одна составляющая (например, никелид титана) обладает сверхэластичностью и памятью формы, а другая сохраняет свойства биокерамики. В качестве керамической составляющей используют фарфор (традиционный для ортопедической стоматологии), однако это весьма хрупкий материал. Высокая хрупкость фарфора обусловлена тем, что на границах различных фаз и зерен возникают контактные напряжения, значительно превосходящие уровень средних приложенных напряжений. Известно, что упругое восстановление объема пористых прессовок из порошка сверхупругого никелида титана связано с разрывом межчастичных контактов и определяется прочностью брикета, которая зависит от пористости и величины сил контактного сцепления. Ослабление этих сил путем добавления к порошку никелида титана других компонентов (частиц мелкодисперсных вольфрама или карбида кремния) значительно повышает упругий эффект, так как прочные одноименные контакты титан-никель заменяются разноименными. В композиционном материале «фарфор – никелид титана» компоненты слабо взаимодействуют и после спекания контакты между кера-

мической и металлической составляющей ослаблены. При нагружении они разрываются в первую очередь, и упругое восстановление объема растет. В результате деформация является обратимой, и композит проявляет свойства, подобные сверхэластичности. Биосовместимость композиционного материала «стоматологический фарфор – никелид титана» доказана в экспериментах. Более успешным оказалось направление использования напылений на металлические конструкции керамических материалов (прежде всего, кальций-фосфатных). Такие изделия и эндопротезы широко применяются в реконструктивной стоматологии, ортопедии и травматологии.

Большие надежды возлагают сегодня на композитные материалы, в которых в качестве связующей (полимерной) основы используются биоразрушаемые полимеры. Два основных используемых полимера – полигликолевая кислота и полимолочная кислота и их сополимеры исследуются для получения биосовместимых, имеющих высокое сродство с тканями, композитных материалов конструкционного назначения. Привлекательность этих биорезорбируемых полимеров заключается в том, что они имеют зависящие от времени и состава композита механические свойства и скорость распада (резорбции) *in vivo*.

В ходе конструирования композитов установлено, что добавление произвольно ориентированного нарезанного углеродного волокна улучшает механические свойства ПГК и ПМК, однако достигнутые значения прочности все еще остаются недостаточными для применения в качестве эндопротезов, несущих нагрузки; при этом обнаружено, что может иметь место расслоение материала и быстрая потеря прочности. Описан резорбируемый имплантат из полилактида, усиленного с помощью стекловолокон фосфата кальция. Однако при испытании композита вследствие быстрого распада материала протез вышел из строя до того, как перелом кости успел зажить. В качестве резорбируемого аналога кости разработан композит «Полиактив[®]» с использованием сегментированного сополимера поли (полиэтиленоксид терефталата) и полибутилентерефталата, который показал при испытаниях на модельных дефектах у животных большую степень врастания кости по сравнению с незаполненными дефектными участками. При этом зафиксировано, что «Полиактив[®]» не стимулирует врастание кости таким же образом, как биоактивная керамика. Имеющиеся примеры получения композитов биоразрушаемых полилактидов с керамиками пока не дали обнадеживающих результатов, поскольку эти материалы пока не позволили создать протезы необходимой прочности. Так, добавление трикальцийфосфата к полилактиду дало в результате композит с прочностью на изгиб, равной 52 ± 3 МПа, модулем Юнга, равным 5 ± 1 ГПа, и сопротивлением излому 52 ± 3 МПа, то есть материал имел примерно половину требуемых свойств кортикального слоя кости и не обладал костной проводимостью. Таким образом, разработанные конструкции с использованием в качестве связующей основы полилактида или полигликолида, армированные углеродным волокном, по механическим характеристикам не пригодны в качестве протезов для случаев с использованием нагрузок, но подходят для создания небольших устройств фиксации

переломов, не находящихся под нагрузкой, например, заменителей сустава пальца или зубных имплантатов и пр.

Интерес к этой области создания биорезорбируемых композитов очень велик. Можно отметить очевидные и отличительные преимущества этих типов материалов: 1) по мере деградации полимера происходит меньшее экранирование напряжений, 2) имплантат, разрушаясь, замещается новыми тканями, поэтому необходимость во второй операции отсутствует, в отличие от использования металлических пластин в фиксации перелома.

Большие перспективы связывают с разрушаемыми разнообразными, термопластичными и механически прочными полимерами семейства ПГА. В настоящее время достаточно широко исследуется возможность получения композитных материалов на базе полигидроксибутирата и его сополимеров с гидроксивалератом с использованием широкой гаммы различных материалов, включая полиэтиленоксид, поливиниловый спирт, полилактид, винилацетат, полиизопрен, полиэтиленгликоль, поликапролактон и др.

С целью поиска стабилизирующих факторов для ПГА изучен характер поведения тройных полимерных смесей, получаемых из полигидроксибутирата, полиэтиленоксида и полиэпихлоргидрина. Все три компонента полностью взаимно растворимы с композиционно зависимой температурой перехода в стеклообразное состояние; а изменение температуры кристаллизации данной смеси лежит в широком диапазоне, от -2 до -53 °С. Получена и изучена система «полигидроксибутират-поливинилфенол» и установлено, что эти компоненты термодинамически смешиваемы и представляют из себя однородную систему. Получены смеси двух полукристаллических полимеров – сополимера гидроксibuтирата с гидроксивалератом и поливинилида. Для улучшения механических свойств полигидроксибутирата его смешивали с поли(цис-1, 4-изопреном) с добавлением третьего компонента (поливинилацетата); увеличением доли полиизопрена и поливинилацетата в трехкомпонентной системе температура стеклования домена ПГБ возрастала, а двух других – нет. Прочностные свойства тройной смеси были выше, чем у двойной. Исследована совместимость полигидроксибутирата с полилактидом; в качестве пластифицирующих агентов были использованы полиэтиленгликоль и поливинилацетат, однако применение пластификаторов существенно не влияло на механические свойства ПГБ/ПМК. На процесс смешиваемости этих двух полимеров влияла величина молекулярного веса компонентов и их соотношение. Композит на основе деградируемых ПГА и не деградируемого синтетического полигидроксиэтилметакрилата имеет лучшие механические свойства (модуль упругости и абсолютная прочность возрастали на порядок). Полученные с использованием атомно-переносной полимеризации олигомеры в виде карбоксикислот с ненасыщенными (типа кротоната) концевыми группами из высокомолекулярных образцов ПГБ сополимеризовали с метилметакрилатом, что позволило создать перспективный по свойствам композит. На базе сконструированных композитов ПГА с различными материалами разрабатываются изделия в виде двух- и трехмерных матриксов. Например, пленки, сформованные при 170 °С из композита полигидроксибутирата с

широко применяемыми в медицине биоразрушающимися сегментированными полиуретанами характеризуются хорошей совместимостью с растущими клетками и весьма прочны.

Большой интерес в настоящее время вызывает возможность использования ПГА для получения прочных, биodeградируемых и биоактивных керамик для реконструкции дефектов костной ткани. Механически прочные ПГА, медленно деградирующие в биологических средах, обладающие термопластичностью и пьезоэлектрическим эффектом, могут оказаться более, чем ПМК и ПГК, пригодными для получения остеозамещающих композитов с керамиками. Показано, что ПГА, главным образом, полигидроксibuтират и сополимеры гидроксibuтирата с гидроксивалератом, образуют биосовместимые композиты с различными типами гидроксиапатитов; при этом установлено, что ПГА, усиленные частицами ГАП, имеют преимущества перед чистыми полимерами в качестве заменителя костной ткани, так как добавление гидроксиапатита улучшает остеоинтегративные свойства полимера и улучшает взаимодействие с тканями. Физико-механические характеристики данных композитов близки костным тканям конечностей и могут быть использованы для изготовления сложных костных протезов, включая моделирование губчато-кортикальных конструкций. Гибридные конструкции из ПГА с гидроксиапатитом, дополнительно нагруженные лекарственными препаратами, имеют перспективы для лечения длительно текущих костных инфекций, например, хронических остеомиелитов и так называемых имплантат ассоциированных остеомиелитов. Известны примеры получения композитов ПГА с волластонитом (силикатом кальция, CaSiO_3). Волластонит относится к «биоактивным» керамикам и с недавних пор в силу своих механофизических свойств и биodeградируемости исследуется в связи с перспективами применения в медицине для восстановления дефектов повреждений костей. Волластонит механически прочен, однако характеризуется высокой хрупкостью и низкой эластичностью. В связи с этим для улучшения свойств керамики волластонит смешивают с полимерами. Полученный гибридный композит ПГА/волластонит биоактивен, на его поверхности через 14 суток формируется слой гидроксиапатита. Добавление керамик в ПГА укрепляет полимер и придает ему свойство гидрофильности. Механически прочные композитные матрицы из ПГА и керамик, обладающие высокой пористостью и гидрофильностью, имеют перспективы для выращивания остеогенных клеток применительно к задачам репаративного остеогенеза.

Еще одним направлением улучшения технологических свойств полимеров является химическая модификация. Например, ПГБ при кислотном метанолизе гидролизуется с образованием низкомолекулярных полимерных цепей ($DP = 26$). Эти дериваты, а также получаемые при гидролизе олигомеры можно использовать для получения высокомолекулярных блок-сополимеров. Гидроксильные группы полимерных цепей реагируют с AlEt_3 с образованием макроиницилирующих участков 3-ПГБ-О- AlEt_2 . Данные фрагменты могут быть использованы для завершения кольцевой полимеризации ϵ -капролактона и лактидных мономеров и получения диблок-сополимеров

с различной длиной цепей: ПГБ-поликапролактона, ПГБ-D,L-полилактида и ПГБ- L-полилактида. Поли[RS]-3-гидроксibuтират, синтезированный в реакции полимеризации β -капролактоном в присутствии 1,4-бутандиола и имеющий вторичные терминальные гидроксигруппы в середине цепи, пригоден для получения нескольких типов блок-сополимеров с L-лактидом; в зависимости от степени полимеризации блоков температурные характеристики блок-сополимеров ПГБ с ПМК существенно варьируют, а при изменении соотношения компонентов можно успешно контролировать механические свойства материала. Имеются сведения о применимости сополимера ПГБ/ПГВ в композиции с различными диолами для получения высокомолекулярных микрофазно сегрегированных блок-сополиэфиров типа ПГБ/ПГВ-уретаны; модуль упругости этих блок-сополимеров может составлять от 40 МПа до 1,3 ГПа в зависимости от доли фракции кристаллизованного ПГБ в блок-сополимере, тогда как не кристаллизованные типы сегментов практически не влияют на величину модуля. Возможно улучшение механических свойств данного материала, так как разрывная прочность возрастает, а удлинение при разрыве уменьшается с увеличением в блок-сополимере доли ПГБ/ПГВ-диола. Данные блок-сополимеры рассматриваются в качестве подлежащих стерилизации биоматериалов, пригодных для получения биодеградируемых имплантатов. Время эксплуатации таких имплантатов в зависимости от доли отделяемых «мягких сегментов» может исчисляться от нескольких дней до нескольких лет. Установлено, что случайное расщепление аморфной части данных блок-сополимеров может приводить к образованию мелких с низкой молекулярной массой фрагментов полигидроксibuтирата, которые фагоцитируются макрофагами. Изучены смеси атактического, синтезированного химически поли[(R,S)-3-гидроксibuтирата], с изотактическим ПГБ, синтезированным биологически, и установлено, что добавление атактического полимера к биологическому ПГБ существенно влияет на кристаллизационное поведение, свойства и проницаемость получаемых мембран.

Направление, ориентированное на использование биоразрушаемых полимеров для создания композитных материалов, получает широкое развитие в настоящее время.

2.1.4. Полимеры, совместимые с живым организмом

Развитие науки и техники приводит к все более широкому внедрению в медицине высокомолекулярных полимерных соединений синтетического, а также природного происхождения. Разнообразие полимеров, варьирование в широких пределах их стереоконфигурации и молекулярной массы, возможность получения композитов в разнообразных сочетаниях с различными веществами, – все это является основой для получения широчайшего спектра новых материалов с новыми ценными свойствами.

На первых этапах применения роль полимеров в медицине сводилась к улучшению характеристик используемых изделий (например, емкости из

стекла были заменены эластичными и небьющимися сосудами из полиолефинов, широкое развитие получил класс нетканых материалов). Далее полимерные материалы стали весьма успешно использовать в различных областях медицины, и в настоящее время из них получают широчайший круг предметов и устройств медицинского назначения. Это портативное оборудование лечебно-процедурного использования, клиническое оборудование и инструменты, предметы санитарии и гигиены, оборудование медицинской аналитики, искусственные органы (почки, кровеносные сосуды, клапаны, водители ритма, аппараты «сердце-легкие», а также стоматологические материалы и др).

Термин «*полимер*» состоит из: «поли» – много и «мер» – единица. Таким образом, полимер – это молекула, состоящая из множества единиц. По отношению к воздействию температуры полимеры подразделяются на два типа: *термоотверждаемые* и *термопластичные*. Термопластичные полимеры могут быть использованы для получения имплантатов различной конфигурации из расплавов путем формования, прессования, экструзии. Термопласты не имеют межмолекулярных связей и, как правило, состоят из линейных полимерных цепей. Термоотверждаемые полимеры полимеризуются, приняв свою окончательную форму, и не могут быть переформованы с целью изменения формы в результате нагрева. Как правило, полимерные цепи в этом типе полимеров имеют ковалентные межмолекулярные связи.

В зависимости от способа получения полимеры классифицируются как: *аддитивные полимеры* (полимеры, полученные ступенчатой полимеризацией) и *конденсационные полимеры*. Аддитивные полимеры (полиэтилен, полиметилметакрилат) синтезируются в реакции присоединения свободного радикала из ненасыщенных мономеров, содержащих двойные углеродно-углеродные связи. Конденсационные полимеры образуются путем совместной реакции двух полимеров, в результате которой выделяется вещество с небольшим молекулярным весом, например вода. Примерами конденсационных полимеров являются полиамиды. Некоторые конденсационные полимеры могут подвергаться гидролизу в организме и разрушаться.

Важнейшими характеристиками полимеров служат величина *молекулярной массы* и *степень полимеризуемости*. Реакции полимеризации приводят к распределению отрезков цепи в полимере и к распределению молярной массы (M_v). Предполагается, что распределение M_v может быть разбито на количество цепей в смеси, каждая из которых имеет определенную длину. Свойства полимеров в значительной мере зависят от величины молярной массы. Значение средней молекулярной массы полимера определяется методами, с помощью которых ведется подсчет молекул, например:

$$M_n = \Sigma (N_i \cdot M_i / N), \quad (2.1)$$

где N_i – количество молекул массы I ; N — общее количество молекул; M_i – масса молекул длины I .

Вес средней молярной массы полимера находят следующим образом:

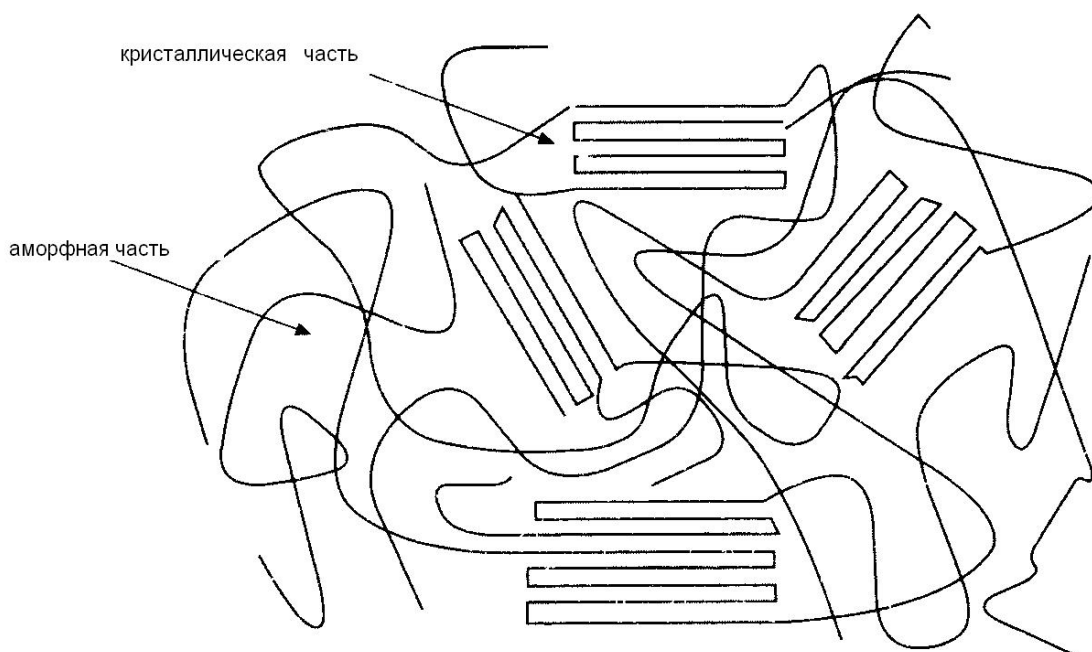


Рис. 2.1. Схема структуры полукристаллического полимера

Кристаллические полимеры значительно отличаются от других материалов тем, что они не могут быть получены на 100 % кристаллическими. Они не имеют строго определенной точки плавления ($T_{пл}$) и плавятся в некотором диапазоне температур. Кристалличность влияет на многие свойства полимеров. С увеличением кристалличности снижается проницаемость полимера для диффузии жидкостей, так как диффузия малых молекул часто может происходить только через аморфные части. Модуль Юнга и предел текучести, как правило, увеличиваются при увеличении степени кристалличности, а ползучесть и относительное удлинение при разрыве уменьшаются. Прочность, трещиностойчивость и жесткость могут увеличиваться или уменьшаться вместе с кристалличностью. Кристалличность уменьшает вязкоэластичную реакцию и делает полимеры нелинейными вязкоэластичными материалами.

Степень кристалличности полимеров зависит от молярной массы и присутствия переплетений в цепи. Кристаллизация включает расплетение и ориентацию цепи. Более высокие молярные массы, как правило, ограничивают диффузию и сокращают степень кристалличности. Ориентирование полимерных цепей, имеющее место при процессах переработки полимеров, способствует кристаллизации. Определение степени кристаллизации (или кристалличности полимера) проводят различными методами – с использованием рентгеновской дифракции, дифференциальной сканирующей калориметрии или измерений плотности.

Конфигурация полимеров определяется химической структурой. *Конформация полимера* относится к его трехмерной структуре, и требуется только вращение связей для того, чтобы преобразовать одну конформацию в другую. Виниловые полимеры типа $CHX = CHX$ и $CH_2 = CXY$ образуют

синдиотактические, атактические и изотактические формы. Полимеры типа $\text{CH}_2 = \text{CHX}$ являются стереорегулярными и не обладают никакой регулярностью молекулярной структуры. Для мономолекулярного звена молекулы линейного термопластичного полукристаллического полимера гидроксимасляной кислоты (полигидроксibuтирата, ПГБ) методом ЯМР при измерении протонного спектра ^1H (500 МГц) в дейтерохлороформе при комнатной температуре выявлены три возможные изомерные конформации. На [рис. 2.2](#) представлены соответствующие ньюменовские проекции конформеров. Полученные спектры ЯМР показали, что ПГБ представляет собой изотактический полиэфир с регулярными, одинаково ориентированными («head-to-tail» – «голова – к хвосту») последовательными единицами D-(-)-3 гидроксимасляной кислоты. Основные внутримолекулярные конформации мономолекулярного звена связаны с поворотами фрагментов вокруг связей $\text{H}_3\text{CH}_\text{X}\text{C}-\text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B}$. Анализ протонных спектров ЯМР свидетельствует о том, что в этом полимере доминируют конформации типа 1 и 2 и практически отсутствуют конформации типа 3.

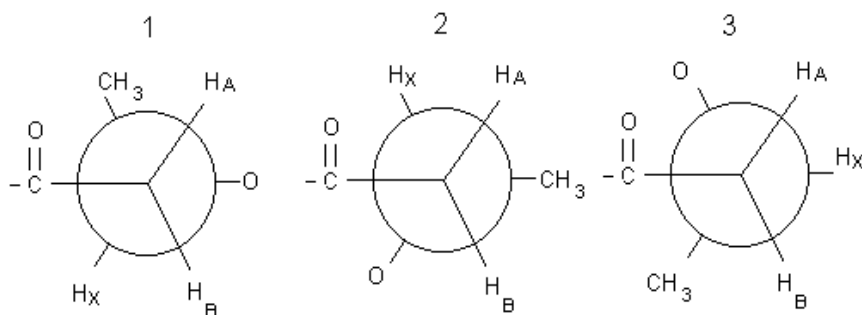


Рис. 2.2. Три возможные изомерные конформации (1 – транс, 2 – гош, 3 – противоположная гош) ПГБ [3]

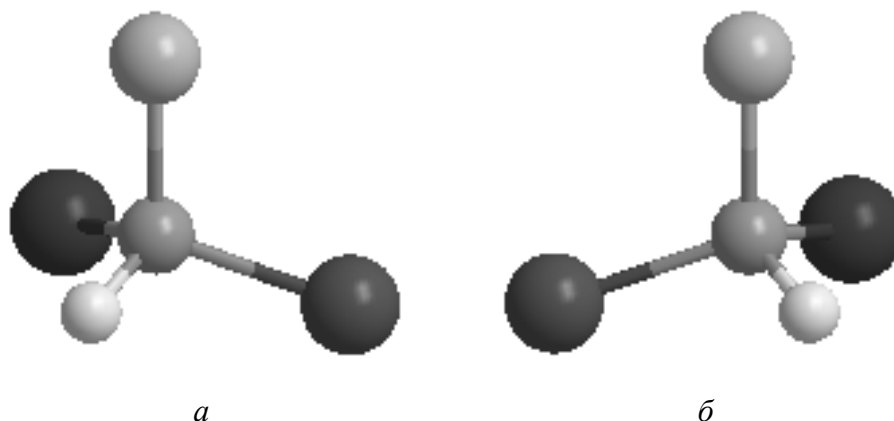


Рис. 2.3. Схема хирального центра: а – левая форма; б – правая форма

Свойства полимеров определяются типом *хирального центра*. Хиральным центром называют атом углерода с четырьмя прикрепленными различ-

ными группами. Существуют левые (L) и правые (D) формы хирального центра (рис. 2.3). Хиральные центры, как правило, приводят к оптической активности полимеров. Молекула полимера может поворачивать поляризованный свет плоскости. Наличие хиральных центров в структуре полимеров влияет на процесс полимеризации, который может реализовываться несколькими способами:

- 1) левосторонний и правосторонний хиральные центры могут связываться произвольно, или атактически;
- 2) хиральные центры могут соединяться чередующимся образом, что называется синдиотактически;
- 3) хиральные центры могут связываться друг с другом с помощью одной схемы, или изотактически.

При полимеризации без использования специальных катализаторов, служащих для ориентации присоединения мономеров к растущей цепи, как правило, преобладает атактическая форма. В случаях, когда при полимеризации свободного радикала присоединение мономеров к концу растущей цепи не является полностью произвольным, это приводит к образованию гетеротактических цепей. Если хиральный центр находится в главной цепи, группы, образующие полимерную цепь с той и с другой стороны хирального центра, являются практически идентичными. Образующие при этом полимеры проявляют оптическую активность.

Для переработки термопластичных полимеров в специализированные изделия большое влияние на процесс оказывают температурные характеристики. Температура, при которой полимерный материал из стеклообразного состояния переходит в резиноподобное, является температурой стеклования (T_g). Температура стеклования совпадает с сегментным перемещением полимерных цепей и 4–5-кратным уменьшением модуля. Процессы диффузии в полимере увеличиваются на несколько порядков при прохождении T_g . Весьма важны также значения температуры плавления ($T_{пл}$) и термической дегградации ($T_{дегр}$) полимеров. Если у полимера существует значительный разрыв (порядка 80–100 °С) между значениями этих величин, можно применять методы переработки из расплава.

Полимеры по механическим свойствам существенно различаются между собой; среди них – упругие твердые вещества, резиноподобные эластомеры, вязкие жидкости. В отличие от металлов и керамики, механические свойства полимеров (абсолютная прочность, модуль Юнга, степень кристалличности) изменяются во времени. Это поведение известно под названием «вязкоупругость».

Потребности новых технологий реконструктивной медицины способствуют расширению спектра полимеров, используемых для конструирования различных имплантатов и эндопротезов. Многие полимеры биомедицинского назначения относятся к химической отрасли синтетических пластмасс и выпускаются в огромных количествах. Среди полимеров, используемых в медицине, – синтетические и природные материалы, биоинертные (не разрушаемые в биологических средах) и разрушаемые

(биорезорбируемые) полимеры; высококристаллические термопласты и резиноподобные эластомеры. В [табл. 2.2](#) представлены наиболее широко используемые в медицине полимеры.

Безусловно, масштабы производства полимеров медицинского назначения на порядки скромнее. При этом следует подчеркнуть, что требования к полимерам медицинского назначения совершенно иные, чем к полимерам общетехнического назначения. Полимеры для медицины должны быть высокой «медицинской» степени чистоты, что исключает присутствие в них даже следовых количеств остатков субстратов, катализаторов и технологических добавок. Среди полимеров, используемых в медицине, синтетические и природные материалы, биоинертные (не разрушаемые в биологических средах) и разрушаемые (биорезорбируемые) полимеры; высококристаллические термопласты и резиноподобные эластомеры.

Таблица 2.2

Широко используемые полимеры и примеры их применения

Полиметилметакрилат	Твердые контактные линзы, внутриглазные линзы, костные цементы, основа зубных протезов
Полиэтилен с ультравысоким молекулярным весом	Несущие поверхности в искусственных суставах
Полиэтилентерефталат	Искусственные артерии
Полиуретан	Катетеры
Полигидроксилэтилметакрилат	Мягкие контактные линзы, перевязочный материал, матрицы для депонирования лекарственных препаратов
Полипропилен	Шовный материал, клапаны сердца, суставы пальцев
Силикон	Имплантаты молочной железы, лицевые устройства
Полигликолид, полилактид	Биоразрушаемый шовный материал

Биостабильные синтетические полимеры. Полимеры этого типа не гидролизуются в жидких средах, не разрушаются под воздействием ферментов крови и тканей, под воздействием клеток и предназначены для изготовления имплантатов и устройств длительного функционирования; среди них – полиэтилен, полипропилен, полиэтилентерефталат, нейлон, политетрафторэтилен, полиметилметакрилаты и др.

Полиэтилен (ПЭ, английская аббревиатура – PE) имеет следующую химическую структуру $[-CH_2-CH_2]_n$ и выпускается, в том числе для медицины в трех модификациях: низкой плотности, высокой плотности и ультравысокого молекулярного веса. Полиэтилен является гидрофобным и биоинертным материалом; имеет низкий предел текучести, что ограничивает сферы применения. С увеличением кристалличности и молекулярного веса ПЭ предел текучести увеличивается. Полиэтилен низкой плотности (или полиэтилен высокого давления) (ПЭВД, английская аббревиатура – LDPE (более низкая степень кристалличности) – распространенный и доступный материал, обладающий высокой биологической инертностью, молекулярной массы 50–200 Да. Ранее рассматривался как доступный материал для эндопротезирования

ния в челюстно-лицевой хирургии, в настоящее время применяется сравнительно редко. Полиэтилен высокой плотности (ГТЭВТТ, английская аббревиатура – HDPE) имеет более высокую степень кристалличности; применим для создания отдельных типов имплантатов. Наиболее известны и распространены изделия из пористого ГТЭВП (с размером пор от 35 до 210 мкм), которые выпускает в США фирма Porex Surgical, Inc. под маркой «MEDPOR®». Этот тип ПЭ используется для изготовления глазных имплантатов. Полиэтилены низкой и высокой плотности легко поддаются формованию. Полиэтилен ультравысокого молекулярного веса (ПЭУВММ, английская аббревиатура – UHMWPE) имеет молекулярную массу свыше 10^6 Да; не поддается формованию и для получения изделий предварительно подвергается спеканию, далее пек обрабатывают механически до получения необходимой формы. ПЭУВММ – частично кристаллический полимер со степенью кристалличности 45–60 %. Отдельные кристаллиты в этом типе ПЭ начинают плавиться при 85 °С; основная масса материала плавится при 125–145 °С. Высокая молекулярная масса полиэтилена этого типа придает ему высокие механические свойства, по многим показателям превосходящие механические свойства полиэтилена низкого давления; его прочность при растяжении составляет 30–44 МПа, твердость до 4-МПа, у полиэтилена низкой плотности эти значения ниже в 2,0–2,5 раза; износостойкость ПЭУВММ достигает 18 мин/мм³, у ПЭВД – только 2,8 мин/мм³. Полиэтилен ультравысокой молекулярной массы выпускается в России и многими зарубежными фирмами под различными марками («Hostalen GUR», «Hercules H», «RCH-WOO», «Hifax-1900», «Spectra 900», «Hylamer M» и др.). На основе ПЭУВММ получают композиционные материалы с улучшенными механическими свойствами. Такие материалы используют в качестве эндопротезов и их компонентов, которые требуют длительного функционирования в организме и высокой прочности. Композиты на основе ПЭУВММ находят применение, главным образом, для изготовления деталей эндопротезов суставов, а также эндопротезов некоторых костей или их частей, накладок для скрепления отломов костей. Этот тип ПЭ применяется только в ортопедии в качестве несущей поверхности и вертлужного компонента при полной замене бедра. Однако частицы ПЭУВММ микронных размеров, возникающие в результате износа вертлужных впадин, токсичны и вызывают некроз кости и остеолитические поражения, являющиеся основным фактором асептического разрушения бедренных суставов.

Полиамиды – (нейлоны) – это полимеры, содержащие связь -CONH-. Основные типы, применяемые в медицине (марки «Нейлон 6», «Нейлон 6,6» и «Нейлон 6,12»). В торговой марке цифрами обозначено количество атомов углерода, разделяющее амидные связи. Как волокна, так и отливки из полиамидов являются частично кристаллическими, в которых амидная связь может образовывать водородные связи с молекулами воды в аморфных областях, приводя к значительному водопоглощению. Водопоглощение приводит, в свою очередь, к пластификации и к заметному изменению механических свойств материала. С начала развития имплантационных методов клас-

сические полиамиды (в первую очередь, поли-ε-капроамид и полигексаметиленадипамид) рассматривали как материалы, пригодные для изготовления волокон, пленок, сеток медицинского назначения. Низшие алифатические полиамиды способны к биодеструкции, а изделия из них – к биодеградации.

Полиметилметакрилат (ПММА) – это биоинертный, твердый, жесткий, стеклообразный, однако хрупкий полимер с температурой стеклования около 100 °С; образуется в результате радикальной полимеризации мономера – метилового эфира метакриловой кислоты. ПММА называют органическим стеклом; это бесцветный прозрачный полимер, при температуре свыше 110 °С размягчается и переходит в вязкотекучее состояние; легко перерабатывается в различные изделия формированием и литьем под давлением. ПММА – один из наиболее термостойких полимеров: он начинает разлагаться только при температуре свыше 330 °С; обладает высокой прочностью. Используется в качестве внутриглазных линз и твердых контактных линз. Формы отверждения *in situ* (известные как холодное отверждение) используются в качестве костных цементов в хирургии при замене суставов. Для этого в ходе операции мономер (метилметакрилат) готовится в виде пасты и используется в качестве утрамбовочного материала между элементами металлических элементов протезов (например, бедренным протезом) и полостью трубчатой кости. Паста затвердевает по мере полимеризации метилметакрилата и превращения его в полимер, при этом происходит объемная усадка примерно на 20 %. Для уменьшения усадки фторполимеризированный порошок полиметилметакрилата смешивают с мономером; это снижает усадку до 3 %, которая компенсируется после полимеризации мономера в результате поглощения воды и сопутствующего расширения. Данный материал не является идеальным в качестве костного цемента. Процесс полимеризации метакрилата сопровождается сильным нагревом (свыше 90 °С), что может привести к термическому некрозу кости во время полной замены бедра.

Полипропилен (ПП, английская аббревиатура – PP) – высококристаллический гомополимер, хрупкий при низких температурах; плохо проводит тепло, в тонких пленках практически прозрачен; термопласт с температурой плавления порядка 180 °С. Для полипропилена характерны высокая ударная вязкость, стойкость к многократным изгибам, хорошая износостойкость, последняя повышается с ростом молекулярной массы. Выпускается в виде изотактического, атактического и синдиотактического полимеров, в виде сшитого и вспененного полимера, а еще как блок сополимер с полипропиленом. Полипропилен легко окисляется на воздухе, особенно при температуре выше 100 °С; термоокислительная деструкция протекает автокаталитически (самостоятельно), максимальная температура эксплуатации изделий из полипропилена 120–140 °С. Применяется в хирургии в качестве шовного материала, для изготовления оплетки седла искусственных клапанов сердца, и как связующее для материалов, предназначенных для создания деталей костных эндопротезов, а также в эндопротезировании мелких суставов верхних конечностей. Полипропилен подвержен окислительной деструкции. Несмотря на то, что скорость этого процесса низка, образуемые продукты оказывают

негативное воздействие на окружающие ткани, поэтому вокруг изделий из полипропилена образуется фиброзная капсула.

*Поли-*n*-ксилилен* (ППК, зарубежный аналог – Parylene) получают пиролизом *n*-ксилола при 950 °С. производят хлор- и дихлор- производные (Parylene-C, Parylene-D). Наиболее перспективным является внедряемая ныне в США и Японии технология 4-фторполи-*n*-ксилилена (Parylene AF-4). Материал с уникальными свойствами, обеспечивающими стойкие, высокопрочные, водостойкие и биоинертные покрытия металлов, полимеров, тканей и пр. Поли-*n*-ксилиленовые покрытия наносятся из газовой фазы при низком давлении (10–60 Па) на любые охлажденные до температуры ниже 25 °С поверхности. Париленовые покрытия используют для защиты и герметизации медицинской техники и медицинских изделий. По комплексу защитных свойств покрытия из ППК толщиной 20 мкм эквивалентны лаковому слою толщиной 100–200 мкм. В качестве покрытия для различных имплантатов из металлов рекомендуется поли-*n*-ксилилен, отличающийся высокой биосовместимостью, выпускаемый под маркой «Parylene N» (ParaTech Coating, Inc.; Vitek Res.Coip, США). Этот полимер получают пиролизом его димера. ППК – высокопрочный полимер, имеющий прочность при разрыве около 50 МПа, модуль упругости 2400 МПа, твердость по Роквеллу – R85.

Политетрафторэтилен (ПЭТФ, английская аббревиатура – PTFE) имеет химическую структуру $[-CF_2-CF_2]_n$. Это биоинертный, высококристаллический полимер, имеет высокую точку плавления в 330 °С; труден для обработки и придания формы. Способ переработки этого полимера заключается в предварительном спекании частиц и последующей механической обработке до необходимой формы. Коммерческий материал Gortex™ представляет собой волокнистую листовую форму полимера, имеющую широкие сферы применения в качестве мембранного материала. Имеет относительно слабые механические свойства с низким пределом текучести, что ограничивает его использование.

Полисилоксаны (силиконы) широко используются для медицинских целей и имеют многолетнюю успешную репутацию. Типы материалов включают эластомеры, гели, смазочные вещества, пены и клеи. Полисилоксаны являются химически очень стабильными и неактивными. Они имеют низкое влагопоглощение, хорошие характеристики электроизоляции. Полисилоксаны предназначены для долгосрочного использования, когда необходим эластомер и когда имеется потребность в биодолговечности и биосовместимости. Почти все полисилоксаны основаны на полиметилсилоксане. В структуре полимера отсутствуют какие-либо полярные группы. Это приводит к получению сильно гидрофобного полимера с плохими смачивающими характеристиками. Полиметилсилоксан редко используется без модификации. *Полисилоксановые эластомеры* состоят из сшиваемого модифицированного полисилаксина высокой молярной массы (более $3,5 \times 10^5$ Да), армирующего наполнителя и каталитической системы для инициации сшивания. Эти материалы текут легко только под давлением и производятся посредством технологий, в частности таких, как прямое (компрессионное) формование, литье-

вое прессование, каландрование и экструзия. Марки с низким молекулярным весом (менее 10^5 Да) могут изготавливаться путем формования погружением в раствор и реактивным формованием в пресс-формы. Системы вулканизации/сшивания могут включать перекись бензоила, платиновые катализаторы и системы отверждения во влажной среде при комнатной температуре. *Полисилоксановые гели* аналогичны эластомерам, но не содержат наполнителя и, как правило, в основе своей имеют очень легко сшитый полиметилсилоксан низкой молярной массы. Они используются в имплантатах молочной железы. *Полисилоксановые клеи* представлены двумя типами и включают клеи, которые затвердевают и сшиваются при соприкосновении с водой (например, медицинский клей «Silastic®» типа А), который содержит ацетоксилиганд, реагирующий с водой и образующий связи (сшивки) кремний – кислород – кремний и уксусная кислота, и клеи, склеивающее действие которых основано на свойственной им «клейкости» (например, марки «Dow Corning⁵⁵ 355»). Этот тип клея содержится в растворителе фторированного углеводорода и может применяться для прикрепления материалов к коже металлов, стекла, ткани.

Существуют и другие синтетические полимеры, применяемые или имеющие перспективы для биомедицины. Круг этих материалов расширяется и можно ожидать появление нового спектра полимеров с улучшенными биомедицинскими и технологическими свойствами, предназначенными для конструирования эндопротезов длительного функционирования.

Полиуретаны (ПУ) – полимеры, содержащие уретановую группу. Известно большое разнообразие уретановых полимеров с самыми различными физическими и биологическими свойствами.

Благодаря многочисленным возможностям, существующим для R и R' , имеющиеся полиуретаны характеризуются широким разнообразием. R – это, как правило, олигомерный (молярная масса 200–500) простой полиэфир или сложный полиэфир с концевыми гидроксильными группами. Синтезируются полиуретаны в ходе двухэтапного процесса, состоящего из стадии приготовления фторполимера с низкой молярной массой, за которой следует удлинение цепи полимера и/или сшивание. Обычные фторполимеры имеют в своей основе 2,4-толуол диизоцианат или 4,4'-дифенилметан диизоцианат. Простые полиэфиры-уретаны содержат в своей основе политетраметиленоксид (ПТМО), полипропиленоксид (ППО) и полиэтиленоксид (ПЭО). Сложные полиэфиры-уретаны, как правило, содержат поликапролактоны. В полиуретановых полимерах также могут присутствовать группы мочевины -NH-CO-NH- и группы уретана -NH-CO-O-. Полиуретаны являются одной из основных групп полимерных материалов, используемых при изготовлении различных имплантатов, а также многих других изделий. Большинство полиуретанов медицинского применения представляют собой двухфазные блок-сополимеры (также называемые полиуретанами с различной жесткостью сегментов в макромолекуле). В начальные периоды медицинского применения этих полимеров имели место острые реакции, так как использовали коммерческие, неочищенные образцы полимеров. Негативные реакции, как было

выяснено позднее, связаны с гидролизом в среде живого организма сложного эфира сложных полиэфиров-уретанов. На смену этим сложным ПУ пришли простые полиэферы-уретаны с различной жесткостью сегментов в макромолекуле, являющихся более предпочтительными благодаря своей большей стабильности и неподверженности гидролизу. Среди коммерческих примеров наиболее известные зарубежные марки Biomer[®], Pellethane[®] и Tecoflex[®]. Отечественные сегментированные полиуретаны типа «Гемотан», получаемые на основе политетраметиленоксида, этилендиамина и ароматического дифенилметан-4,4'-диизоцианата, разработаны во ВНИИ медицинских полимеров (Москва). Простые полиэферы-уретаны обладают хорошей гемосовместимостью и являются одним из предпочтительных типов полимеров для изделий, контактирующих с кровью.

Как правило, стоимость синтетических материалов ниже полимеров природного происхождения, из них легко формировать трехмерные структуры, не возникает также трудностей с сырьем и производством полимеров с воспроизводимыми и контролируемыми свойствами, такими как прочность, скорость деградации, микроструктура. Однако большим недостатком синтетических материалов являются их иногда непредсказуемое взаимодействие с клетками и компонентами иммунной системы пациента, а также неконтролируемое время биодеградации в среде организма. Главные причины осложнений при использовании синтетических биодеградируемых материалов – возможные проявления негативных реакций (воспалительная и аллергическая реакции) организма на продукты деструкции и проявление канцерогенности.

2.2. Материалы медицинского назначения, используемые в реконструктивных медицинских технологиях

Весьма широкой областью применения биоматериалов в настоящее время стала реконструктивная хирургия, которая позволяет производить реконструкцию дефектов различных тканей и органов и улучшить качество жизни пациентам без применения трансплантатов и биосинтетических органов.

2.2.1. Материалы и эндопротезы для реконструкции элементов сердечно-сосудистой системы

Сердечно-сосудистая система (система кровообращения) обеспечивает все жизненно важные функции организма. Главные компоненты сердечно-сосудистой системы: кровь, кровеносные сосуды и сердце; их согласованное функционирование обеспечивает доставку тканям кислорода и всех необходимых питательных веществ, удаление продуктов обмена, контроль всех многочисленных функций через эндокринную систему и терморегуляцию.

Заболевание или отказ любой из составляющих частей сердечно-сосудистой системы может иметь катастрофические последствия, включая необратимые изменения в органах и тканях, нарушение функции мозга, остановку сердца и смерть. Несмотря на развитие терапевтических и хирургических методов лечения сердечных патологий и наблюдаемое в последние годы снижение показателей заболеваемости и смертности, заболевания сердечно-сосудистой системы по-прежнему занимают первое место, и на них приходится свыше 40 % всех случаев смерти. Наиболее распространенная патология сердечно-сосудистой системы – это коронарная болезнь сердца.

В связи с тем, что ведущей патологией являются заболевания сердечно-сосудистой системы, самую большую группу материалов медицинского назначения представляют собой материалы для сердечно-сосудистой хирургии. Области их применения достаточно широки – это производство емкостей для хранения крови, игл и шприцев, внутрисосудистых катетеров, протезов кровеносных сосудов, искусственных клапанов сердца, систем искусственного и вспомогательного кровообращения. К гемосовместимым материалам, из которых изготавливают протезы кровеносных сосудов, предъявляются наиболее жесткие требования. Гемосовместимость сосудистых протезов зависит от природы используемого материала и технологии изготовления изделий, а также ряда факторов: конструкции и диаметра протеза; условий гемодинамики в области имплантации протеза; физико-механических свойств и др.

Не случайно поэтому наиболее развитым направлением в реконструктивной медицине с применением новых биоматериалов и устройств является кардиохирургия. Сегодня материалы для сердечно-сосудистой хирургии (табл. 2.3) представляют самую большую группу применяемых материалов медицинского назначения.

Таблица 2.3

Биомедицинские материалы для сердечно-сосудистой хирургии
и область их применения [4]

Наименование материала	Применение
1	2
<i>Синтетические биостабильные полимеры:</i>	
Акрилаты	Конструкционные материалы для экстракорпоральных устройств
Эпоксисоединения	Клапаны сердца и элементы искусственного сердца
Фторуглероды	Протезы кровеносных сосудов, покрытия катетеров
Полиамиды	Шовные нити
Поликарбонаты	Конструкционные материалы для экстракорпоральных устройств
Полиимиды	Клапаны сердца и элементы искусственного сердца
Полисульфоны	Клапаны сердца и элементы искусственного сердца
Полиуретаны	Катетеры, искусственное сердце

1	2
<p><i>Биодеградируемые полимеры:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Полиангидриды Поликапролактаны Сополимеры лактидов и гликолидов Полигидроксиалканоаты 	<ul style="list-style-type: none"> Контролируемое высвобождение препаратов Контролируемое высвобождение препаратов Контролируемое высвобождение, шовные нити Контролируемое высвобождение препаратов
<p><i>Материалы из биотканей:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Бычья артерия и вены Бычий перикард Пупочная вена человека Клапаны свиньи 	<ul style="list-style-type: none"> Протезы кровеносных сосудов Заменитель перикарда, клапаны сердца Протезы кровеносных сосудов Клапаны сердца
<p><i>Материалы из природных полимеров:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Сшитый альбумин Ацетат и гидрат целлюлозы Хитозаны Коллаген, эластин, гиалуроновая кислота, желатин 	<ul style="list-style-type: none"> Покрытия для сосудистых протезов, контрастный агент для ультразвуковой диагностики Мембраны для гемодиализа Покрытия, контролируемые высвобождение Покрытия
<p><i>Металлы и сплавы:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Сплавы хромированного кобальта Сплавы хромированного никеля Сплавы с памятью формы Нержавеющая сталь Тантал Сплавы тантала и титана Сплавы титана и никеля Керамика, неорганика, кремнеземы Монокристалл окиси алюминия (сапфир) 	<ul style="list-style-type: none"> Проволочные проводники, электроды Электрокардиостимуляторы, седла клапанов, зонтушки для тромбов, коннекторы для искусственного сердца, каркасы для биоклапанов и кровеносных сосудов. Стенты Клапаны сердца
<p><i>Углеродистые материалы:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Пиролитический углерод (низкотемпературный и ультра низкотемпературный изотропный) 	<ul style="list-style-type: none"> Клапаны сердца, покрытия

Из представленных в [табл. 2.3.](#) данных видно, что области применения материалов достаточно широки – это многосерийное производство мешков для хранения крови, игл и шприцев, внутрисосудистых катетеров, создание высокотехнологичных и требующих наукоемких исследований имплантируемых изделий малых серий (протезов кровеносных сосудов, искусственных клапанов сердца, систем искусственного и вспомогательного кровообращения и т. п.). Наиболее распространенные стратегии по борьбе с критическими проблемами сердечно-сосудистой системы и заболеваниями сердца заключаются в применении искусственных клапанов сердца (ИКС) и искусственных кровеносных сосудов (ИС), проведении операций по шунтированию (сосудистые трансплантаты) и в установке устройств стимуляции сердца, в частности насосов и кардиостимуляторов.

Материалы для протезов кровеносных сосудов. Искусственные протезы

зы кровеносных сосудов, применяемые в кардиохирургии, весьма разнообразны; среди них: *ксенопротезы* на основе кровеносных сосудов крупного рогатого скота, *аллопротезы* из бедренных вен пациента; протезы из природных и синтетических материалов, *биodeградируемые* протезы из биорезорбируемых полимеров, протезы из композитных материалов, *гибридные* протезы из синтетических материалов с биологическими покрытиями (фибрином или коллагеном) или засеянные клетками (*тканеинженерные* протезы сосудов).

Главное требование, предъявляемое к материалам и эндопротезам сосудов, заключается в том, что они должны обладать высокой гемосовместимостью [5]. Гемосовместимость сосудистых протезов зависит от многих факторов, а именно:

- типа и свойств используемого материала;
- техники изготовления, формы и размера эндопротеза;
- физико-механических свойств, эластичности;
- свойств поверхности;
- места имплантации;
- условий гемодинамики в области имплантации протеза;
- состояния пациента и процесса заживления травмированных тканей после операции;
- свертываемости крови пациента, тактики антитромбогенной терапии;
- возможности развития инфекции и послеоперационных осложнений.

Имплантирование сосудистых эндопротезов запускает каскад ответных биохимических, клеточных и гистохимических реакций организма, которые включают: образование на внутренней и внешней поверхностях протеза отложений белков и форменных элементов крови; воспалительные реакции сосудистой стенки и формирование соединительно-тканной капсулы; прорастание новых тканей через материал эндопротеза.

Эндопротезы сосудов не должны быть громоздкими, вызывать выраженного тромбообразования; не должны иметь швов и других неровностей на поверхности. Эндопротезы сосудов должны быть эластичными, способными изгибаться под острым углом, не перекручиваясь при этом и сохраняя механическую прочность и целостность. Материал эндопротеза и его конструкция не должны усложнять хирургическую технику операции, они должны легко поддаваться технике хирургического шитья и стыковаться с нативными сосудами и другими элементами сердечно-сосудистой системы.

Особо востребованы эндопротезы сосудов малого диаметра, используемые при аорто-коронарном шунтировании ишемизированных коронарных сосудов и для протезирования малых артерий (вен) при заболеваниях периферической сосудистой системы. Примерно у 20 из 1 000 человек в возрасте более 65 лет ежегодно выявляют то или иное заболевание кровеносных сосудов. Ежегодная мировая потребность в протезах малого диаметра только для аортокоронарного шунтирования составляет около 450 000 шт., это примерно

69,5 % от всех протезов кровеносных сосудов [4].

Конструкционно эндопротезы сосудов представляют собой эластичные трубки различного диаметра и длины. Внутренний диаметр эндопротезов составляет от 3 до 10–12 мм; толщина стенок – 0,2–0,4 мм. Наиболее сложная задача – создание сосудистых протезов малого диаметра. Это связано с тем, что такие протезы весьма сложно соединять с нативными сосудами, и они более подвержены закупорке вследствие тромбообразования. Среди применяемых и разрабатываемых протезов сосудов – плотные, пористые, вязаные, плетеные и тканые. Наиболее распространены вязаные конструкции, характеризующиеся высокой эластичностью и гибкостью. Более эластичными являются сравнительно недавно разработанные гофрированные конструкции.

Наблюдаемый сегодня прогресс в области сосудистого эндопротезирования связан с безусловными успехами медицинского материаловедения. Наличие адекватного по свойствам материала – главный залог успеха при создании сосудистых эндопротезов.

Первыми материалами, которые пытались использовать для конструирования искусственных протезов сосудов, были металлы. Эти попытки относятся к концу XIX в. Далее круг материалов расширился, и для изготовления протезов стали использовать алюминий, серебро, стекло с парафиновым покрытием, полиметилметакрилат. С середины 1950-х гг. шире стали привлекать полимерные материалы; полиэтилен, поливиниловый спирт, полиакрилонитрил и др. Однако разработанные с использованием этих материалов сосудистые эндопротезы не обладали необходимой прочностью. Наиболее успешной разработкой того периода признаны разработанные в США эндопротезы сосудов в виде вязаных трубок, изготовленных из полиэтилентерифталата марки «Dakron». Эти протезы получили довольно широкое распространение и стали серийно выпускаться многими фирмами. Успешная конструкция отечественного эндопротеза была разработана в Производственном объединении «Север» (рис. 2.4), которая представляла собой высокоэластичный протез гофрированной формы.

Применение пористых и вспененных полимерных материалов позволило изготавливать сплошные (не гофрированные) пористые эндопротезы, например, из вспененного полиуретана, армированные для повышения прочности в местах изгибов наружными кольцами или сеткой (рис. 2.4, б). В последние 15–20 лет наибольшее распространение в клинической практике получили сосудистые протезы на основе полиэтилентерифталата (ПЭТФ). Это наиболее химически стабильный и биологически инертный полимерный материал, поэтому имплантация протезов из него сопровождается минимальной реакцией окружающих тканей. При этом собственно материал длительное время под воздействием биологических сред *in vivo* не изменяет свои медико-биологические и физико-химические свойства.

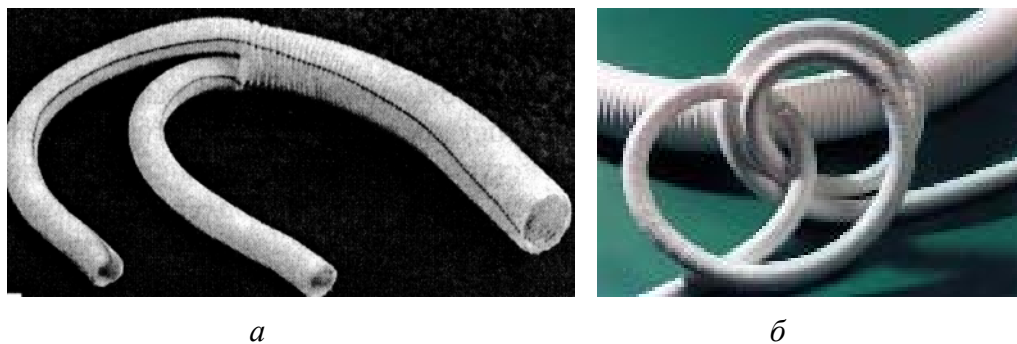


Рис. 2.4. Протезы кровеносных сосудов из политетрафторэтилена
[данные www.100best.ru]

Нельзя не отметить, что не усиленные армированием протезы сосудов из ПЭТФ в силу недостаточной эластичности и/или механической прочности могут вызывать негативные последствия в виде возможности развития аневризмы в аортальной позиции. Следует отметить также, что ПЭТФ используют в основном для изготовления эндопротезов артериальной группы, то есть больших размеров. Протезы из ПЭТФ с улучшенными свойствами (повышенной тромборезистентностью) были созданы на ПТПО «Север», когда (помимо лавсановой нити при плетении полотна) использовали сополимер тетрафторэтилена и винилиденфторида (марка материала «Фторлан»), а также применили лавсан и полипропилен. Позднее для этих целей были использованы другие полимеры, например, сегментированные полиуретаны. Эффективные протезы легочной артерии были созданы из материала «Витур» совместными усилиями сотрудников Научного центра сердечно-сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева и СКТБ им. П. О. Сухого. Наиболее известные зарубежные сосудистые эндопротезы из пористого ПЭТФ – марки «Gore-Tex®», серийно выпускаемые фирмой «W.L. Gore & Associates, Inc» (США). Выпускается линейка моделей протезов «Gore-Tex®» – бифуркационного и трубчатого типа, армированных наружными кольцами, конусовидных и др. Сравнительно недавно для создания сосудистых эндопротезов стали применять биоразрушаемые полимеры, обладающие высокой гемосовместимостью. По мере разрушения материала имплантированного эндопротеза конструкция постепенно замещается вновь образованной тканью; это снижает травмируемость элементов крови и реакцию сосудистой стенки. Такие «прорастающие» живой тканью протезы имеют свойство удлиняться со временем, что очень важно при имплантировании протезов детям. В качестве материала для изготовления биоразрушаемых (временных) эндопротезов используют наряду с ПЭТФ полилактид, полигликолид, фибрин. К перспективным биоразрушаемым полимерам, обладающих высокой общей био- и гемосовместимостью, относятся полиэфиры гидроксислужановых кислот, полигидроксислужануаты (ПГА). С целью улучшения функциональных свойств применяемых сосудистых протезов, получаемых из синтетических материалов, предпринята попытка с положительным результатом использования для покрытия поверхности изделия полимера гидроксислужанной

кислоты (ПГБ). Модифицированные сосудистые протезы были имплантированы собакам и исследованы на сроке 2 и 10 недель. Сравнительно недавно исследован в качестве пропитывающего покрытия синтетических протезов другой тип ПГА – эластичный сополимер гидроксигексаноата и гидроксиктаноата (ПГГ/ПГО). В эксперименте на крысах проведено на сроке от 2 до 180 суток сравнение эффективности сосудов, модифицированных покрытием из ПГГ/ПГО, белком и флюорополимером. Внутри сосудов, покрытых ПГГ/ПГО, не было отмечено инфильтрации ткани, ответ тканей на имплантацию таких протезов был очень мягким. Деградация полимера происходила очень медленно; за 6 месяцев эксперимента молекулярная масса полимера снизилась всего на 30 %. Эти разработки пока носят поисковый характер и в основном находятся в стадии доклинических исследований на животных, но их результаты обнадеживают.

Одной из сложных проблем в протезировании сосудов остается отсутствие функционально надежных сосудистых протезов малого диаметра (менее 5,0 мм). Применение сосудов малого диаметра осложняется трудностями прикрепления их к нативным (живым) сосудам и повышенной тромбогенностью в результате низкой скорости кровотока в них. Для конструирования протезов малого диаметра исследуются различные типы материалов (модифицированные сегментированные полиуретаны, поликарбонатуретаны, полиэтиленоксид, полимеры с силиконовыми покрытиями). Наиболее перспективными представляются подходы с использованием микропористых сегментированных полиуретанов, а также гемосовместимых с повышенной тромборезистентностью и антимикробным покрытием и новое направление, ориентированное на создание гибридных протезов с использованием методов клеточной и тканевой инженерии. Химикам в Германии принадлежит изобретение, которое способно оказать существенное влияние на развитие сосудистой хирургии. Они синтезировали полимер, молекулы которого способны восстанавливать прежнюю форму после деформации. Смесь полимерных материалов содержит светочувствительные молекулы, которые способны удерживать форму под воздействием облучения ультрафиолетом определенной длины волны. В качестве эксперимента, доказывающего возможность использования этого изобретения в медицине, в суженный сосуд был введен прямой отрезок пластмассы. Под воздействием облучения при помощи волоконной оптики нить свернулась в спираль, что предотвратило спадание сосудистых стенок.

Материалы для протезов клапанов сердца. Не менее остра проблема создания функциональных и надежных клапанов сердца. Нарушения функций клапанов сердца являются одной из существенных причин смерти кардиохирургических больных. Например, в США по этой причине в год умирает около 10 000 человек. Ежегодно число операций по протезированию клапанов сердца увеличивается на 2 %. Среди обязательных требований, предъявляемых к конструкциям биоискусственных клапанов сердца, являются следующие: эндотелизация контактирующей с кровью поверхности, способность к синтезу экстраклеточного матрикса, стабильность формы

(геометрии) с потенциальной возможностью роста в организме пациента, отсутствие нежелательных иммунологических и других воспалительных процессов, стойкость к кальцификации и избыточному росту тканей (клеток), стабильность механических свойств, большая эффективная площадь входного отверстия клапана и плотность закрытия створок, стойкость к инфекциям и химическая инертность, отсутствие гемолиза, простота техники имплантации.

Эндопротезирование клапанов сердца, начатое в 1960-е гг., широко применяется в клинической практике. Нарушения функций клапанов сердца являются одной из причин смерти кардиохирургических больных. Ежегодно выполняются десятки тысяч операций по протезированию клапанов сердца в результате врожденных и приобретенных пороков. Существует два основных типа протезов клапана – механические и биологические искусственные клапаны сердца (ИКС). Клапаны аорты обычно заменяют механическими или биологическими протезами; в случае же поражения митрального клапана кардиохирурги предпочитают восстановить естественный клапан, нежели имплантировать протез.

Для того чтобы протез ИКС работал эффективно, он должен отвечать следующим требованиям:

размер клапана при полном его открытии должен обеспечивать нормальный кровоток и не препятствовать ему; геометрия клапана должна обеспечивать оптимальную гемодинамику;

движущиеся элементы клапана должны обеспечивать полное его открытие при минимальной потере давления, полное герметичное закрытие, не производя шума;

материал и элементы клапана не должны вызывать коагуляции белков крови, гемолиза, тромбообразования;

клапаны должны быть механически прочными и функционировать длительное время (в среднем в течение года клапаны открываются и закрываются до $3,7 \times 10^7$ раз в год);

клапаны не должны подвергаться инфицированию;

простота конструкции ИКС должна облегчать имплантацию.

Механические клапаны стали применять в клинической практике с середины 1950-х гг. С тех пор их конструкции непрерывно совершенствуются; в настоящее время их насчитывается свыше 100. Жесткие элементы клапанов изготавливают из нержавеющей стали, сплавов молибдена; для корпусов и створок используют пиролитический углерод и полиэфируретаны.

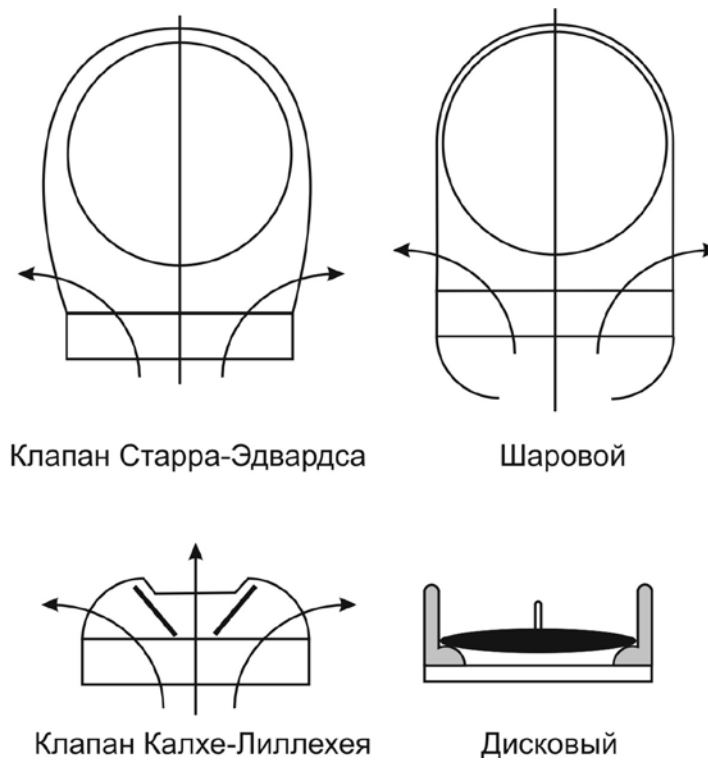


Рис. 2.5. Принцип конструирования искусственных клапанов сердца

Первые модели искусственных клапанов сердца представляли наиболее простые шариковые конструкции (рис. 2.5). В закрытом положении это была сфера, которую изготавливали из металла или синтетического пластика; во время открытия клапана сфера фиксировалась на металлическом кольце посредством металлической клетки. В последующей конструкции ИКС с движущимся диском просвет клапана открывается и закрывается плоским диском, который двигается в ограничителях. Двустворчатые ИКС, которые стали использовать в середине 1980-х гг., оборудованы плоскими полудиска-ми, вращающимися на шарнирах. В этом типе ИКС кровь подвержена наименьшему травмированию [9].

В современных моделях запирающий элемент (диск) выполнен из силиконового каучука, усиленного титановым кольцом, а также из полиформальдегида полиэтилена сверхвысокой молекулярной массы. Для снижения осложнений, имеющих место при имплантировании механических ИКС (тромбообразований и эмболизации), необходимо совершенствование используемых при их изготовлении материалов. Обнадеживающие результаты получены при испытании ИКС с гибкими лепестковыми запирающими элементами, изготовленными из сегментированных полиуретанов. Эндопротезы этого типа выдерживают до 800 млн циклов открывания-закрывания и характеризуются низкой склонностью к кальцификации. Для снижения риска развития инфекции в конце 1990-х гг. поверхности ИКС покрывали серебром, однако впоследствии было выявлено, что это может приводить к неполному замыканию клапана.

Биологические клапаны используют в течение последних 25–30 лет. Это могут быть аутогенные трансплантаты, когда легочные клапаны пациента используют для замены ему же клапана аорты; при этом менее значимый легочной клапан заменяют механическим ИКС. Ксенотрансплантаты клапанов сердца изготавливают из тканей домашних животных (свиньи и КРС), которые для снижения иммунологических реакций фиксируют материалами типа глутарового альдегида. Ксенотрансплантаты биологических клапанов могут быть представлены целыми клапанными системами или содержать только одинарные створки клапанов животных, которые фиксируют к металлическому кольцу. Клапаны могут быть сформированы из тканей свиного перикарда. Биологические клапаны, безусловно, имеют более близкую человеку анатомию по сравнению с механическими ИКС, однако ксенотрансплантатная ткань может подвергаться кальцификации и более подвержена механическим повреждениям, поэтому срок их службы существенно короче, нежели механических протезов.

Стенты. Одним из самых часто выполняемых вмешательств в сердечно-сосудистой хирургии в настоящее время является внутрисосудистое стентирование артерий. Доказано благоприятное влияние стентирования на снижение числа острых осложнений при проведении чрескатетерной баллонной ангиопластики, таких как тромбоз, диссекция интимы. Выявлено, что стентирование является единственным методом профилактики отдаленного рестенозирования. Внутрисосудистое стентирование артерий при атеросклерозе в настоящее время является одним из самых часто выполняемых вмешательств в сердечно-сосудистой хирургии [10]. В странах ЕС и США объем ежегодного стентирования достигает 0,3–0,4 % от общей численности населения; например, в 2002 г. там было произведено свыше 2 млн операций стентирования. Эти протезы изготавливаются в основном из металлов (нержавеющей стали, сплавов никеля и титана) и представляют собой сетчатые конструкции (рис. 2.6).

В России стентирование производится только в 35 клиниках, при этом общее количество производимых операций невелико, чуть более 10 000 в год, и сдерживается, главным образом, высокой стоимостью импортных эндопротезов, так как в России отсутствует массовое производство внутрисосудистых стентов. Количество операций стентирования в России неуклонно возрастает с каждым годом, но используются для этого в основном дорогостоящие стенты зарубежного производства. Первый отечественный внутрисосудистый нитиноловый стент «Алекс» разработан в результате творческого сотрудничества группы исследователей и клиницистов; стент прошел полный комплекс испытаний; освоен выпуск изделия (производитель фирма «Комед», г. Москва) и начато клиническое применение.

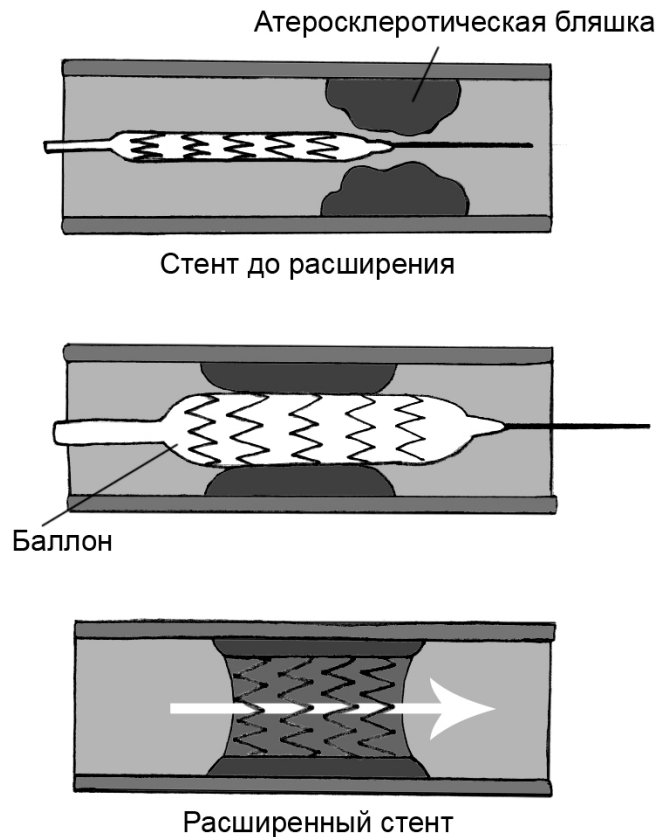


Рис. 2.6. Внешний вид саморасширяющегося стента

Сотрудниками ФГУП «НИИЭФА им. Д. В. Ефремова» в настоящее время отрабатываются технологии получения стентов из нержавеющей стали, в том числе с нанесением алмазоуглеродных и полимерных покрытий.

При всей значимости данной медицинской технологии лечения патологии сердечно-сосудистой системы, основным недостатком эндопротезирования является развитие рестенозов – повторных сужений, представляющих собой биологический ответ сосудистой стенки на имплантацию инородного тела. При установлении коронарных стентов различных типов в сроках до 6 месяцев рестеноз в них выявляют у 10–58 % больных. Связано это с тем, что имплантация металлического стента в сосудистое русло запускает каскад сложных гистопатологических процессов, являющихся ответной реакцией организма на внедрение инородного тела, их исход зависит от структуры, физико-химических свойств и степени химической чистоты материала, от формы, свойств поверхности собственно имплантата, а также от техники стентирования. Снижение тромбогенности стентов остается главной проблемой тактики ведения больных в послеоперационном периоде. Возможны различные подходы для повышения биосовместимости эндопротезов, – это модификация свойств поверхности собственно металлического имплантата, применение биосовместимых покрытий («coated stents»), разработка стентов из биорезорбируемых полимерных материалов («biodegradable stents»), в том числе нагруженных антипролиферативными препаратами («drug-eluting stents»). Ключевым звеном развития этого направления является поиск опти-

мального материала, обладающего, помимо идеальной био- и гемосовместимости, определенными физико-механическими свойствами, а также способностью биорезорбироваться *in vivo* без образования токсичных продуктов и без негативных реакций со стороны стенки сосуда в процессе эксплуатации. Повышение биосовместимости стентов и поиск материалов для этого невозможны без развития биоматериаловедения.

Среди предлагаемых и разрабатываемых покрытий для повышения биосовместимости стентов – импрегнация гепарина на поверхность стента («Jomed», Швеция); алмазоподобное углеродное покрытие («BioDiamond», Германия); золото («InFlow Dynamics», Германия; «Medinol», США); фосфохолиновое покрытие («Biocompatibles», Великобритания); силиконкарбидное («Biotronic», Германия). Исследуются также в качестве покрытий стентов биоразрушаемые полимерные материалы: полигликолид и полилактид, полиуретаны и др. Однако полученные результаты исследований пока не дали однозначного ответа о возможности решения проблемы рестенозов, и в настоящее время не определен состав покрытия, который был бы полностью нейтрален для стенки сосуда. Поэтому поиск идеального покрытия продолжается. В последние годы развивается направление, связанное с введением в состав покрытий стентов биологических агентов, которые подавляют гиперплазию неоинтимы; среди них – дексаметазон, рапамицин, паклитаксель, сиролimus и др. Обнадеживающие результаты получены при использовании для повышения биосовместимости внутрисосудистых стентов полимерных покрытий из ПГА. Сконструированы и исследованы две экспериментальные модели эндопротезов: стент с полимерным покрытием и стент с полимерным покрытием, нагруженным цитостатическим препаратом. Техника нанесения полимерного покрытия отработана на периферических сосудистых стентах, изготовленных из нитинола (производитель ООО «Комед», Москва). Показана стойкость и однородность покрытия, способного выдерживать механические воздействия при зарядке в доставляющее устройство и имплантации в сосудистое русло. С использованием контрастной артериографии и стандартной гистологической техники в экспериментах на животных изучен характер ответа сосудистой стенки на имплантацию экспериментальных стентов с полимерным покрытием в сравнение с нитиноловым. Показана высокая эффективность покрытия сосудистых эндопротезов полигидроксibuтиратом (ПГБ) и сополимерами гидроксibuтирата с гидроксивалератом (ПГБ/ПГВ), в особенности при включении в его состав антипролиферативного препарата с целью уменьшения реакции сосудистой стенки и предупреждения осложнений, имеющих место при использовании непокрытых металлических стентов.

Третье направление предполагает постепенное полное замещение имплантированного биорезорбируемого стента нормальной сосудистой тканью. Однако опыт этого направления, открывающего перспективы радикального решения проблемы, пока невелик. Известны единичные примеры применения стентов, изготовленных из полностью разрушаемых материалов (полилактидов, полиуретанов, силикона).

Полимерные пломбировочные составы находят применение для заполнения *аневризм* (раздуваний) стенок сосудов. Так, композиции эфиров α -цианокриловой кислоты, отверждающие в присутствии влаги, при введении в дефектное место блокируют его. Известны единичные примеры применения полимерных материалов, в частности полигидроксибутирата, в качестве эмболов (пробок) для закупорки сосудов, подлежащих выводу из кровотока.

При операциях на открытом сердце при хирургическом повреждении перикарда возникает необходимость в применении *искусственного эндопротеза* («заплатки»), в противном случае имеют место осложнения в виде спаечного процесса. Фирма «W.L. Gore & Associates» выпускает для сердечно-сосудистой хирургии заплаты из вспененного политетрафторэтилена различного размера: 3×3 , $3,8 \times 2,5$ и 3×6 см \times см толщиной 0,4 и 0,6 мм. Заплата характеризуется высокой эластичностью, легко фиксируется к тканям и функционирует длительное время *in vivo*.

Известны положительные примеры использования ПГА в кардиохирургии в качестве *противоспаечного барьера*, необходимого при операциях на открытом сердце. Нетканые лоскуты, изготовленные из полигидроксибутирата, исследованы для ликвидации дефектов межпредсердной перегородки в эксперименте на телятах; отмечено образование сформированных эндотелиальных слоев со стороны правого и левого предсердий с субэндотелиальным слоем коллагена и гладкомышечными клетками. Полимерные лоскуты постепенно деградировали в течение 12 месяцев наблюдения с участием полинуклеарных фагоцитирующих макрофагов. По мере биодеградации лоскута формировалась ткань, сходная с таковой у нативной межпредсердной перегородки, достаточно прочная для предотвращения развития шунта между предсердиями.

В отделении торакальной и сердечно-сосудистой хирургии госпиталя Медицинского университета г. Ланда (Швеция) для снижения послеоперационных осложнений, имеющих место после операций на открытом сердце, были имплантированы лоскуты из ПГБ в качестве временного перикарда. Животных (овцы) наблюдали в течение 2,5 лет. Электронно-микроскопические исследования тканей показали, что на перикардальной поверхности регенерированной ткани со стороны сердца сформировался мезотелеподобный слой, который полностью покрывал подлежащий слой коллагена. Морфология поверхности была сходной с нативным перикардом. Биодеградируемые нетканые лоскуты из ПГБ также были имплантированы в правый ventрикулярный тракт и легочную артерию овцам (в контрольной группе животным имплантированы лоскуты из дакрона). Животных наблюдали в течение 3–12 месяцев после операции. Регенерированный сосуд на основе ПГБ имел сходные структурные и биохимические показатели с нативными тканями.

Описан пример положительного применения лоскутов из ПГБ в клинических условиях. В отделении грудной и сердечно-сосудистой хирургии университетского госпиталя г. Упсалы (Швеция) были использованы экспери-

ментальные образцы биоразрушаемых перикардов из ПГБ. Одной группе пациентов, подвергшихся операциям на открытом сердце, были имплантированы полимерные перикарды; контрольной группе имплантации не проводили. Спустя полгода и два года исследовано состояние больных и получено достоверно низкое возникновение осложнений в виде спаечного процесса между лоскутом ПГБ и поверхностью сердца. Площадь модельного перикарда постепенно замещалась вновь образованными тканями по мере его деструкции. У больных, которым не имплантировали полимерный перикард, были отмечены множественные осложнения в виде спаечного процесса.

Полимерные и другие биосовместимые материалы широко используются также в конструкциях, электростимулирующих деятельность сердца, в различных типах насосов и устройств, имитирующих функцию левого желудочка сердца и др. Дальнейший прогресс в области создания био- и гемосовместимых полимерных материалов в сочетании с новейшими технологиями тканевой инженерии создадут большие возможности для конструирования функциональных имплантатов и протезов для сердечно-сосудистой системы.

2.2.2. Материалы для реконструкции мягких тканей и внутренних органов

Реконструирование дефектов мягких тканей возможно несколькими путями. Можно использовать заранее сформированные требуемого размера и формы биостабильные имплантаты, которые помещают в место дефекта на длительные сроки функционирования. Второй подход связан с использованием отверждаемых композиций, которые, будучи введенными в место дефекта в виде раствора (геля) мономера, подвергаются полимеризации и приобретают необходимую форму. Если при этом применяют биоразрушаемые материалы, постепенно (по мере их разрушения) дефект будет заполняться новообразованными тканями. И наконец, возможно применение заранее сформированных конструкций из биорезорбируемых материалов, предназначенных для постепенного заполнения новыми тканями. Такие конструкции можно дополнительно нагружать лекарственными препаратами и стимулирующими тканегенез факторами, включая пролиферирующие клетки.

Улучшение результатов хирургических вмешательств в абдоминальной хирургии, при пластике брюшной стенки, для предотвращения постоперационного спаечного процесса, анастомозирования и наложения швов на кишечнике, при реконструкции и протезировании желчевыводящих путей и многое другое невозможно без внедрения новых материалов. Не менее важной областью протезирования мягких тканей является необходимость заполнения образуемых постоперационных полостей мягких тканей и органов безопасными и функциональными материалами.

Грыжесечение, которое является наиболее частой хирургической операцией и составляет до 10–15 % от общего числа вмешательств, нуждается

в функциональных эндопротезах нового поколения. Ежегодно в мире выполняется более 20 млн операций грыжесечения. Так, только в США ежегодно проводят 700 000 грыжесечений с частотой рецидивов 10–15 %. Для профилактики образования послеоперационных спаек в настоящее время разрабатываются так называемые *барьерные методы*. Материалы, используемые для изготовления таких эндопротезов, должны предотвращать образование сращения с внутренними органами, обладать устойчивостью к инфекции, быть прочными и выдерживать длительное натяжение без глубокого рубцевания и инкапсулирования. Однако применение синтетических барьерных эндопротезов, как показала клиническая практика, сопровождается нежелательными осложнениями (серомы, инфильтраты, миграция и отторжение имплантатов, сращение близлежащих органов и пр.). Для повышения биосовместимости эндопротезов разрабатываются так называемые облегченные сетки (протезы с пониженным содержанием полипропилена), протезы из гиалуроновой кислоты, сетки с биосовместимыми покрытиями (титаном, β -глюконом, коллагеном). Таким образом, поиск биосовместимого и функционального материала для покрытия барьерных мембран и эндопротезов является актуальной задачей реконструктивной хирургии.

Материалы, используемые для изготовления таких эндопротезов, должны не только предотвращать образование сращения с внутренними органами, но и обладать устойчивостью к инфекции, быть прочными и выдерживать длительное натяжение без глубокого рубцевания и инкапсулирования. Первые модели сетчатых эндопротезов изготавливали из полиэтилена, полипропилена и полиэтилентерефталата. «Барьер» должен быть эффективным в присутствии крови, экссудата, безопасен и инертен, то есть не быть очагом воспаления, инфекции, фиброза, не должен инкапсулироваться, должен полностью растворяться, быть удобным и легким в применении, по возможности не требовать крепления с помощью швов. К настоящему моменту испытано огромное количество различных материалов. Однако не дали обнадеживающих результатов широко изучаемые растворы декстрана, поэтому его применение в настоящее время весьма ограничено. Выпускаемые антиспаечные барьеры из политетрафлуорэтилена, например, «Preclude» (фирмы «Gore-Tex Surgical Membrane», «W. L. Gore & Associates, Flagstaff, AZ», США), также имеют недостатки в связи с гидрофобностью, что приводит к недостаточному прилипанию к тканям. Кроме того, материал не подвержен биодеградации, поэтому такой «барьер» должен фиксироваться нитями и остается как инородное тело в брюшной полости навсегда, что, естественно, повышает риск спайкообразования и инфекции в отдаленном послеоперационном периоде. Распространено применение в качестве барьера гиалуроновой кислоты (ГК) и композитов с ней; так, при объединении ГК с фосфатным буферным раствором создан барьер «Sepracoat», который предотвращает повреждение серозы, воспаление и формирование спаек в животных моделях. С применением целлюлозы разработан коммерческий препарат «Interceed» (Ethicon Inc., Somerville, NJ, США), представляющий собой мембрану, которая полностью рассасывается в течение 28 дней. В настоящее время широкое

применение препарата ограничено уменьшением эффективности в присутствии крови или избытка перитонеальной жидкости. Карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) и ее производные, например Na-КМЦ, включена в Государственный реестр лекарственных средств России и в фармакопию США и Европы; имплантаты на ее основе в композиции с рядом веществ широко применяются в пластической хирургии (препарат «NEW-FILL®» представляет собой смесь КМЦ и полилактидной кислоты). Созданы мембраны на базе соединения КМЦ с гиалуроновой кислотой, например, биорассасывающаяся мембрана «Seprafilm» (Genzym Corporation, США), которая используется в виде пленки и покрывает травмированные поверхности. Мембрана превращается в гель в течение 24–48 часов, но остается на месте размещения до седьмых суток. Полностью рассасывается к 28 дню, не требует фиксации швами, эффективна в присутствии крови, ее применение значительно уменьшает степень и серьезность послеоперационных спаек; этот «барьер» получил одобрение на использование в клинике в европейских странах и в Северной Америке. Однако это изделие, как было установлено, может провоцировать внутрибрюшные абсцессы, а в условиях перитонита эндопротез «Seprafilm» не уменьшает спайкообразование в брюшной полости, хотя и не тормозит заживление межкишечных анастомозов. Сравнительно недавно появились сообщения о новой мембране Oxiplex (FzioMed, Inc., San Luis Obispo, США), которая состоит из карбоксиметилцеллюлозы и оксида полиэтилена. В экспериментах на животных показано, что эндопротез снижает послеоперационное спайкообразование в условиях перитонита. Эффективность противоспаечных барьерных средств, разработанных, главным образом, за рубежом, не подвергается сомнению, однако у этих средств существует один серьезный недостаток – высокая стоимость; препараты производства западных компаний реализуются по цене свыше 1000 у. е. в расчете на одну операцию.

Первый российский противоспаечный барьер создан на основе карбоксиметилцеллюлозы «Линтекс-Мезогель» (фирма «Линтекс», Санкт-Петербург); он рекомендован в виде геля к широкому применению. Стоимость этого препарата не превышает 100 у. е. из расчета на одну операцию, а эффективность не уступает западным аналогам. В настоящее время «Линтекс-Мезогель» используется в ряде клиник. Результаты клинического применения подтвердили безопасность и высокую эффективность использования этого противоспаечного геля.

Сетчатые эндопротезы, выпускаемые серийно, разработаны из синтетических материалов, в основном полипропилена. Это эндопротезы типа «Cousin», «Vupro», «Ultrapro» (США). Однако после того как был выявлен большой процент осложнений (нагноение, свищеобразование, болевой синдром в раннем и отдаленном послеоперационном периоде, дискомфорт в результате чувства инородного тела) при использовании полипропиленовых сеток, направление исследований сместилось в сторону разработки так называемых «облегченных» полимерных эндопротезов, применяемых для пластики брюшной стенки. Сегодня известно много вариантов неудачных попыток создания подобных эндопротезов. Так, сетка марки «Timesh» (производства

фирмы «GFE Medzintechnik GmbH», Германия), изготовленная из полипропиленовых мононитей с титановым покрытием диаметром 0,07 мм, имела низкую разрывную нагрузку (3,7 Н/см) вдоль петельного ряда, поэтому была снята с производства. Снижение материалоемкости при создании сетчатых эндопротезов попытались решать двумя способами: облегчение химически однородных (в основном, полипропиленовых сеток) за счет уменьшения диаметра не рассасывающихся мононитей и за счет введение в состав протеза волокон из синтетических полимеров. Облегчение полипропиленовых сеток, достигаемое в результате специальной технологии производства, обеспечивает, с одной стороны, использование минимума полимерного материала, а с другой – оптимальные манипуляционные свойства и прочность. Основные марки таких эндопротезов – «Optilene Mesh LP» (фирма «Braun», Германия), «Biomesh light» («Cousin», США), «Эсфил легкий» («Линтекс», Россия). Следует отметить, что пока еще нет данных о длительных сроках применения этой группы эндопротезов. Однако очевидно, что облегченные хирургические сетки однородной структуры с точки зрения как непосредственных, так и отдаленных результатов вряд ли способны преподнести большое количество нежелательных осложнений. В [табл. 2.5](#) представлены характеристики облегченных хирургических сеток последнего поколения, наиболее распространенных в Европе и СНГ.

Поверхностная плотность выпускаемых сетчатых эндопротезов варьирует в достаточно узком диапазоне: от 28 до 36 г/м², что пока не позволяет выявить лидера по данному показателю. Особенно если учесть, что поверхностная плотность «обычных» полипропиленовых герниопротезов составляет в среднем порядка 85–95 г/м². Однако производство композитных эндопротезов значительно сложнее, а стоимость их в несколько раз выше, чем однородных «легких» сеток из полипропиленовых мононитей.

Таблица 2.4

Хирургические сетчатые протезы [12]

Состав эндопротеза	Композитный	Композитный	Однородный	Однородный
Исходное сырье	Полипропиленовые и полигекапроновые мононити	Полипропиленовые и полилактидные мононити	Полипропиленовые мононити	Полипропиленовые мононити
Свойства:				
Поверхностная плотность полипропиленовой составляющей	28 г/м ²	29 г/м ²	36 г/м ²	30–34 г/м ²
Толщина	500 мкм	800 мкм	нет данных	380 мкм

В 2007 г. предприятие «Линтекс» (Санкт-Петербург, Россия) разработало еще один «легкий» эндопротез нового поколения – «Унифлекс легкий», выполненный из поливинилиденфторидных мононитей. По биологической инертности и гибкости он существенно превосходит полипропиленовые эндопротезы. Экспериментальные и клинические испытания показали, что

применение данного эндопротеза сопровождается формированием тонкой соединительнотканной капсулы при минимальном количестве имплантат-ассоциированных осложнений.

Второй подход связан с введением в структуру сетки синтетических рассасываемых материалов (полилактидов, поликапрона, полигликолидов). Это эндопротезы «Vipro», «Vipro II», «Ultrapro» (фирма «Ethicon»), «Biomesh SR», «4D Dome» (фирма «Cousin»). Однако применение этих изделий в ходе высвобождения продуктов распада синтетических полимеров вызывает повышенную воспалительную реакцию и формирование выраженного фиброза, что, по мнению производителей, способствует повышению прочности изделия в результате формирования «протезной фасции» в отдаленном послеоперационном периоде. Завершение гидролиза рассасывающегося компонента (составляющего более половины объема сетчатого эндопротеза – в зависимости от вида) происходит в течение 90–120 суток. После этого начинается процесс постепенной дезорганизации сформированной в избыточном количестве (в ответ на воспаление) незрелой соединительной ткани, и в конечном счете соединительнотканные волокна, способные нести механическую функцию, окружают только оставшиеся полипропиленовые мононити (формирование «рубцовой сетки»). Когда зона имплантации не испытывает более или менее выраженных нагрузок, прочности «рубцовой сетки» может быть вполне достаточно. В противном случае – сравнительно низкая прочность «протезной фасции» может стать причиной рецидива. Это подтверждено недавним сравнительным клиническим исследованием, показавшим достаточно высокий процент рецидивов при использовании композитной сетки «Vipro» (17 %) по сравнению со стандартными сетками (7 %) при хирургическом лечении послеоперационных вентральных грыж. Полагают, что применение рассасывающегося компонента является в значительной степени неадекватной мерой, так как при этом страдают два важных свойства сетки: биологическая инертность (в том числе – предсказуемость реакции тканей) и прочность с течением времени.

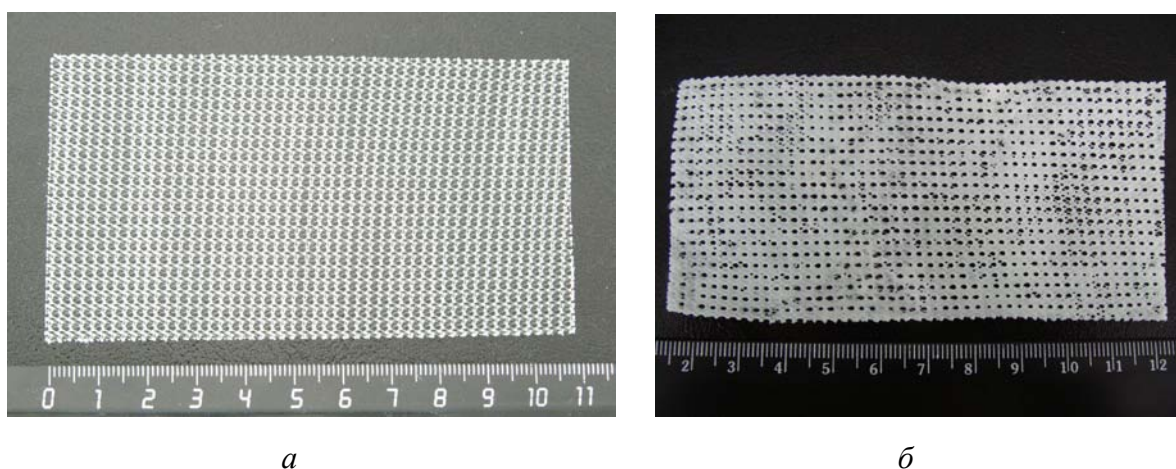


Рис. 2.7. Фото исходного полипропиленового эндопротеза (а) и экспериментального эндопротеза, модифицированного полимерным покрытием из ПГБ (б) (натуральные размеры) (фото Т. Г. Воловой)

Еще один подход связан с нанесением на сетчатые эндопротезы из синтетических полимеров биосовместимых покрытий из резорбируемых полимеров ([рис. 2.7](#)).

Такие эндопротезы находятся в стадии разработки и исследования. Применяемые для этих целей биорезорбируемые полимеры – полилактид, полигликолид, полигидроксиалканоаты.

Реконструкция желчевыводящих путей – один из разделов хирургии, остро нуждающийся в функциональных эндопротезах, изготовленных из высокопрочных и биосовместимых материалов. По данным IV Международного конгресса гастроэнтерологов, холецистохоледохолитиаз по распространенности уступает лишь атеросклерозу и служит поводом для ежегодного проведения до 2,5 млн плановых и экстренных оперативных вмешательств на желчных путях. Потребность в операциях, направленных на восстановление желчеоттока, возрастает вследствие увеличения числа больных злокачественными новообразованиями, желчнокаменной болезнью, воспалительными заболеваниями печени и желчевыводящих путей. Заболевания желчевыводящей системы занимают ведущее место в структуре хирургической патологии брюшной полости. Одной из актуальных проблем медицины до настоящего времени остается лечение больных с механической желтухой. Благодаря успехам современной хирургии за последние 10 лет удалось значительно улучшить результаты хирургического лечения, уменьшить число осложнений и летальность. Этому способствовало внедрение в клиническую практику дренирующих инструментальных вмешательств, направленных на купирование синдрома холемии и связанных с ним поражений жизнеобеспечивающих органов и систем организма. В последние годы в связи с успехами в области синтеза полимеров, поиски оптимального материала для конструирования *эндобилиарных стентов*, хирургического шовного материала, барьерных мембран и сетчатых протезов активизировались. Но, к сожалению, на сегодняшний день не существует идеального материала для изготовления изделий, полностью соответствующих современным требованиям билиарной хирургии. Наиболее используемыми синтетическими материалами для изготовления эндобилиарных стентов являются тефлон, полиуретан, полиэтилен, перкуфлекс. Клиническое использование синтетических стентов выявило ряд недостатков, основные: быстрая обтурация в течение 3–6 месяцев, их частая миграция, повышенная травматичность чреспеченочного вмешательства. Более широко применяемые расширяющиеся металлические стенты также выявили ряд ограничений (проращение сетчатых стентов опухолевыми тканями, сопровождающиеся развитием рецидива механической желтухи, невозможность хирургического удаления стента после проращения и закупорки, явления некроза слизистой желчных протоков). Известен первый пример конструирования и успешного применения в экспериментах на животных полностью резорбируемых эндопротезов желчевыводящих путей, изготовленные из ПГБ ([рис. 2.8](#)).

С использованием образцов ПГА медицинской степени чистоты в Институте биофизики СО РАН разработано семейство экспериментальных

моделей прототипов стентов различного диаметра, от 3 до 4 мм, длиной от 20 до 25 мм. Положительные результаты стентирования желчных протоков, полученные в серии экспериментов на животных, послужили основанием для постановки локальных исследований в условиях клиники.



Рис. 2.8. Прототипы полностью резорбируемых эндопротезов из полигидроксibuтирата (фото Т. Г. Воловой)

В хирургической практике в больших количествах расходуется *шовный материал*. В основном шовный материал изготавливается из природных или синтетических полимерных материалов (металлические нити используются в ограниченных масштабах). Шовный материал должен обладать необходимой механической прочностью и надежно удерживать края сшиваемых ран и фрагментов, биологической безопасностью, легкостью в работе (нить должна легко завязываться в узле, не скользить в руке хирурга, стерилизоваться доступными методами). В последние годы значительное внимание уделяется поиску материала для создания биodeградируемых хирургических нитей. Биodeградируемый шовный хирургический материал должен надежно удерживать операционные швы и иметь достаточную эластичность, постепенно резорбироваться со скоростью, адекватной кинетике восстановления тканей. При этом продукты деструкции материала должны легко элиминироваться из зоны имплантации, быть абсолютно безвредными для организма и не вызывать негативных реакций как со стороны окружающих тканей, так и организма в целом. Остро востребованным является хирургический шовный материал для наложения анастомозов и кишечных швов. Особенно высоки требования к шовному материалу, используемому для наложения швов в хирургии толстой кишки, что связано с непрочностью ее стенки, наличием

в просвете кишки агрессивной микрофлоры и активных ферментов. Самым распространенным методом соединения кишечных петель является лигатурный способ, а самым распространенным анастомозом – двухрядный. Внедрение в клиническую практику синтетических шовных материалов способствовало распространению однорядного ручного шва, что положительно сказывается на технологии наложения швов и постоперационном процессе. Поиск биосовместимых полимерных покрытий для синтетического шовного материала и разработка полностью резорбируемых полимерных нитей активно разрабатывается в настоящее время. Используемые хирургические шовные материалы изготавливают из природных и синтетических полимеров. Не деградируемый шовный материал из синтетических полимеров типа полипропилена (марки «Prolene», «Sirgilene», «Deklene»), полиамидов («Sirgulin», «Dermalon», «Nylon 66», «Полиамид 6»), галогенсодержащих полимеров («Gore-Tex», «FUMALEN[®]») используют для формирования глубоко расположенного хирургического шва. Такой материал пожизненно остается в организме, покрываясь фиброзной капсулой. Если такой материал применяют для наружных швов, после срастания тканей нить удаляют.

В последнее время особое внимание уделяется разработке и использованию разрушаемого шовного материала. По мере заживления тканей материал такой нити постепенно замещается новообразованной тканью, что способствует повышению прочности шва. Самым «старым» биodeградируемым шовным материалом является кетгут, упоминание о котором в научной литературе относят к 1885 г. Кетгут получают из стенок кишок овцы. В Германии выпускают крученые нити различной толщины под марками «CATGUT PLAIN», smi-AG, а также кетгут, армированный металлом («Cutgut 0,41101»). Кетгут быстро (10–15 суток) биodeградирует в месте имплантации и вызывает достаточно сильную воспалительную реакцию. На смену кетгуту пришли более прочные многофиламентные (крученые) и длительно функционирующие хирургические нити из резорбируемых синтетических сложных полиэфиров гликолевой кислоты («Dexon»), сополимеров гликолевой и молочной кислот («Vicryl») (однако потеря прочности этих нитей на 80 % происходит в течение 21 суток). Эти нити до недавнего времени считались идеальными, но выяснилось, что их нельзя применять в областях, где шовный материал должен длительное время сохранять прочность. Эти нити также недостаточно эластичны, что приводит к излишней травме (то есть эти нити сохраняют «фитильные» свойства и могут вызывать развитие «пилящего эффекта» в тканях). Недавно разработанные монофиламентные новые шовные нити из сополимеров гликолевой кислоты и триметилкарбоната («Maxon») и полидиоксана имеют больший срок функционирования (за месяц происходит потеря прочности на 30–50 %), но их использование требует применения узла сложной конфигурации. К общим недостаткам рассасываемых шовных нитей из синтетических материалов можно отнести также их возможное непредсказуемое поведение при взаимодействии с клетками и компонентами иммунной системы пациента. Главные причины осложнений при использовании синтетических биodeградируемых материалов из полилактидов и полигликолидов –

за кислению тканей, возможные воспалительная и аллергическая реакции организма на продукты деструкции таких полимеров. Поэтому поиск оптимального биоматериала для изготовления биосовместимых, механически прочных и биорезорбируемых шовных материалов – актуальная задача медицинского материаловедения.

В табл. 2.5 представлены широко применяемые в хирургии шовные материалы, разработанные с использованием синтетических полимеров, а также сроки их функционирования *in vivo*.

Таблица 2.5

Характеристик шовных нитей на основе синтетических полимеров

Торговая марка	Состав	Сохранение 50 % прочности, сут	Время полного разрушения, сут
DEXON®	Полигликолевая кислота	15	56–70
Vicryl®	Сополимер молочной и гликолевой кислот, покрыт сурфактантом	15	56–70
Biosyn®	Сополимер полигликолевой кислоты с триметиленкарбонат-диоксаном	18	90–110
Monosyn®	Трехкомпонитный сополимер гликолид – триметиленкарбонат – капролактон	14	60–90

Активные исследования ПГА, проводимые в настоящее время, рассматривают их в качестве наиболее перспективного материала для получения шовного материала. В Институте биофизики СО РАН из полигидроксиалканоев получены и исследованы экспериментальные образцы шовного материала в виде прочных монофиламентных шовных нитей, не гидролизующихся в водных средах и пригодных для стерилизации общепринятыми методами. Прочные шовные нити (абсолютная разрывная нагрузка свыше 9,0 Н, прочность при разрыве – до 300 МПа; относительное разрывное удлинение 30 %, модуль упругости, 3,75 ГПа; прочность нитей в узле, оцениваемая по отношению к разрывной прочности – 60–70 %) были получены экструзией высококонцентрированных растворов и расплавов ПГА, их биодegradация *in vivo* происходит с низкими скоростями при постепенном уменьшении массы в основном с поверхности, без образования грубых дефектов и резкой потери прочности. Потеря прочности нитей через 90 суток после имплантации составила не более 30–40 % от исходных значений. В экспериментах на животных показана пригодность нитей для ушивания мышечно-фасциальных разрезов без образования рубцов, а также наложения кишечных однорядных швов и анастомозов.

Хирургические клеи и композиции. В хирургии мягких тканей часто прибегают к процедуре их склеивания и сшивания краев ран, заменяя шовные материалы. Это пока мало разработанное направление применения полимерных материалов в медицине особо востребовано при операциях на внутренних органах (печени, почках, легких). Хирургические клеи должны

быстро образовывать эластичное клеевое соединение в условиях высокой влажности, характерной для тканей внутренних органов; должны быть эластичными; не разогреться при отверждении; быть пригодными для длительного функционирования и не выделять при деструкции токсичных соединений.

Наиболее известны хирургические клеи на основе изоцианатов, полиуретанов, полимочевины. Первыми стали применять клеи на основе полицианокрилатов; эти клеи выпускаются и в настоящее время. В России это «Циакрин СО-4», в США – «Istman-910». Срок хранения из-за разрушения этих клеев ограничен (6–9 месяцев). Положительные примеры применения полиуретановых клеев описаны в практике нейрохирургии, урологии, для склеивания мышечных тканей, при резекции желудка. Разработаны более совершенные марки клеев на основе полицианокрилатов в композиции с капролактоном и полимерами монокарбоновых кислот (полилактиды/полигликолиды), рекомендованные для укрепления аневризм и эмболизации протоков церебральной жидкости.

Известны фибриновые клеи, основу которых составляют белковые системы. Эти достаточно трудно приготавливаемые клеи характеризуются хорошими адгезионными соединениями краев тканей внутренних органов. Применяются также составы на основе желатина, укрепленного сшивающими агентами типа формальдегида и глутарового альдегида. Разработки в этом направлении проводятся весьма активно, главным образом они ориентированы на поиск безопасных и высокопрочных материалов и композиций.

Для заполнения постоперационных полостей, заполнения и укрепления аневризм, свищей и пломбирочных путей во внутренних органах (типа протоков печени или поджелудочной железы) применяют композиции, которые вводятся инъекционно (так называемые *инъектируемые композиции*). Такие жидкие композиции, полученные из кремнийорганических композиций, низкомолекулярных полисилоксанов, вводятся с помощью шприца с последующим структурированием. Это выпускаемые в России композиции марок «Эластосил МИ», «Эмбосил», «Панкреасил». В зависимости от вязкости, плотности сшивки и времени отверждения в организме композиции вводят подкожно (например, силиконовый «Эластосил МИ» с процессом отверждения 20–24 ч), внутриорганизменно («Панкреасил», который в зависимости от соотношения компонентов отверждается при введении в поджелудочную железу при панкреатите от 5 до 60 минут). Для ускорения процедуры эмболизации применяют препарат «Эмбосил», состав которого аналогичен препарату «Панкреасил», но содержит также инертные шарики из фторопласта.

Подкожные полимерные композиции находят применение для исправления дефектов мягких тканей лица в косметологии и после удаления опухолей. Это гидрогели на основе гиалуроновой кислоты, препараты на основе коллагена, а также дисперсные коллоидные системы, содержащие, например, частицы полилактида, распределенные в геле поливинилпирролидона, или взвесь частиц полиметилметакрилата в гиалуроновой кислоте. Эти препараты весьма успешно применяют для коррелирующей пластики мягких тканей.

Для постоперационного заполнения полостей в мягких тканях применяют *полимерные отверждаемые композиции* или заранее сформированные эндопротезы. Внутренние эндопротезы могут представлять собой пористые объемные имплантаты или мешки, заполненные биоинертными и безвредными гелями или жидкостями.

Широкое распространение получили *протезы молочной железы*, которые применяют в косметических целях, а также после онкологических операций. Это овальные или округлые элементы в виде эластичного мешка с мягким наполнителем (растворы солей, масла, гели на основе силиконов, полиакриламидный гель). Современный отечественный наполнитель протезов – это полиакриламидный гель марки «Формакирил», выпускаемый фирмой «Гель косметик технолоджи» (г. Москва). Для изготовления оболочки протезов молочной железы используют метилвинилсилоксановый каучук, отечественные марки «СКТН-М» и «СКТН-МЕД». Такие эндопротезы используются сотнями тысяч ежегодно, и вопрос, который решают материаловеды и биотехнологи, – это повышение биосовместимости с целью снижения риска неблагоприятных осложнений. Это вызвано тем, что при эксплуатации наиболее распространенных протезов с жидким наполнением полимерными материалами может происходить разрыв оболочки внешнего мешка и попадание большого количества материала в ткани. В качестве альтернативы полимерным наполнителям эндопротезов можно использовать солевые растворы. Такие эндопротезы широко применяют в США, наиболее известные марки «Spectrum®» «BIO-CTLL®». В конце 1990-х гг. протезы, заполненные соевым маслом, стали выпускать в США и Англии, однако позднее был поставлен вопрос о прекращении использования таких эндопротезов из-за токсичности соевого масла.

Заранее приготовленные эндопротезы на основе кремнийорганических материалов применяют для коррекции мягких тканей лица и хрящей. Это, как правило, вспененные или перфорированные объемные имплантаты, свойства поверхности которых позволяют извлекать имплантаты в любое время, не травмируя ткани. Для изготовления таких протезов применяют различные марки силиконовых каучуков, например, марки «СКТВ-1-МЕД», более прочные композиции на основе хлорированного полиэтилена. В качестве протезов хряща носовых перегородок или ушной раковины начинают использовать конструкции, полученные из полимеров и сополимеров монокарбоновых кислот (ПМК, ПГК). Таким образом, поиск оптимального материала для изготовления имплантатов для протезирования мягких тканей продолжается.

Эндопротезирование сухожилий и мышц представляет собой весьма новую и сложную задачу. Более проработанным является конструирование эндопротезов связок. В качестве эндопротезов связок и сухожилий можно использовать ксенотрансплантаты и конструкции из синтетических и природных материалов. Возможно применение эндопротезов, изготовленных только из синтетических материалов, а также комбинирование их с одновременно вводимыми трансплантатами на основе натуральных связок. Это повышает прочность последних. В качестве синтетических материалов с этой

целью используют полиэтилентерефталат, из которого выпускают плетеные изделия, способные выдерживать нагрузку при длительной эксплуатации. Перфорации внутри таких протезов обеспечивают прорастание материала новообразованными тканями, что фиксирует их местоположение и исключает миграцию. Известные эндопротезы связок на основе полиэтилентерефталата, выпускаемые в США фирмой «Phoenix BioMedical Corp.» – «GORE-TEX». Композиции на основе полимеров молочной и гликолевой кислот и углеродных волокон для протезирования поврежденных связок охарактеризованы положительно в экспериментах на приматах. Поиск новых материалов для эндопротезов этого типа ориентирован на разработку биосовместимых и высокопрочных композитов. Полипропиленовые эластичные и пористые шнуры, усиленные углеродными волокнами, используют для крепежа и армирования ксенотрансплантатов связок. На основе коллагеновых волокон конструируют модели связок, способные к биодеградации. Известны композиции порошкового углерода с полисульфоном и политетрафторэтиленом в качестве связующей субстанции. Для ускорения вживления эндопротезов связок применяют новые технологии, – перед имплантацией в конструкцию вводят биологически активные вещества (факторы роста) или функционирующие клетки. Известны примеры конструирования прототипов эндопротезов связок из сетчатого коллагена, засеянного фибробластами.

Эндопротезирование поврежденной мышечной ткани представляет собой более сложную задачу и носит в настоящее время поисковый характер. На первых порах для этих целей был использован высокопрочный и эластичный композит на основе этилендиметакрилата и сополимера 2-гидроксиэтилметакрилата, наполненного полиэтилентерефталатом. Однако разработанные из этой сложной композиции эндопротезы не обладали способностью имитировать мышечные сокращения. В настоящее время имитировать функциональные свойства мышечной ткани пытаются с использованием полимерных гелей, способных обратимо изменять свой объем под воздействием внешней силы, pH или электрического импульса. Примером полимерных систем, обладающих сократительными свойствами при электрохимическом воздействии, являются гели с ионными группами. Из таких гелей показана принципиальная возможность получения ионогенных мембран, дополнительно усиленных инертными металлами. Так, пористые гели на основе смесей поливинилового спирта с полиэлектролитами типа композиции полиакриловой кислоты с гидрохлоридом полиамина, полученные многократным замораживанием-размораживанием, способны изменять размер под воздействием электрического импульса.

Нарушение целостности кожного покрова чревато сильными осложнениями и сопровождается болевыми ощущениями. Кожа выступает в качестве барьера и защищает от внешних воздействий, токсикантов и инфекционной микрофлоры организм, а также участвует в выведении продуктов обмена из организма. Кожа состоит из эпидермиса (или внешнего слоя), который постоянно регенерирует, дермы (собственно кожи) и слоя подкожной клетчатки. Дерма не регенерирует, а обеспечивает механическую поддержку для

эпидермиса.

Наибольшая потребность в *искусственной коже* возникает после ожогов. Ожоги первой степени разрушают эпидермис. Ожоги второй степени разрушают оба слоя, но оставляют эпидермис вокруг волосяных мешочков, допуская определенную регенерацию в виде шрамов. Ожоги третьей степени разрушают всю кожу, обнажая жир и мышцы. Сильно обожженная кожа должна быть немедленно удалена, прежде чем на ней начнут размножаться бактерии.

Предпочтительным покрытием для ожогов является аутотрансплантаты. Однако у пациента может оказаться недостаточно кожи для трансплантации. Кожа животных или кожа трупов не пригодны для пересадки, так как быстро отторгается организмом хозяина. Альтернативой является использование искусственных кожных повязок и накладок.

Искусственные покрытия кожи активно разрабатываются в настоящее время с применением для этого различных методологий и материалов. В зависимости от степени поражения кожи и фазы ее восстановления (фаза воспаления, фаза регенерации, фаза образования новой эпителиальной кожи) требования, предъявляемые к заменителям кожи, различаются. Защитный материал (искусственная кожа) на первой стадии должна обеспечивать очищение раны; на второй – создавать условия для роста новой соединительной ткани; на третьей – создавать условия для роста и миграции клеток эпителия и формирования нового эпидермиса.

Для разработки искусственной кожи используются различные природные и синтетические материалы в виде гелей, текстильных и нетканых материалов, пленок, порошков, волокон, пористых покрытий и др. Традиционные перевязочные текстильные материалы, используемые, как правило, при оказании первой помощи, сегодня вытесняются более совершенными материалами и системами, обладающими очищающими, сорбционными и гемостатическими свойствами. Сорбционные материалы на основе полимеров выпускаются в виде волокнистых изделий, губок и порошков. Последние на поверхности раны при смачивании образуют пленочное покрытие. Из природных полимеров для получения сорбционных кожных покрытий используют коллагеновые композиции в виде губок, например, система «Дигиспон», на основе коллагена и сшитого поливинилового спирта, содержащая антисептик. Применяются также гелевые системы на основе агарозы. Материалы, разработанные в России («Альгипор» и «Альгимаф»), являются пористыми губчатыми системами, нагруженные фурациллином. Из синтетических полимеров разработаны сорбционные кожные материалы, в том числе на основе поливинилового спирта, поливинилпироллидона, сшитого полиэтиленгликоля, блоксополимеров оксида этилена и пропилена (препарат «Pluronic F-127»).

В состав дренирующих полимерных покрытий вводят биологически активные соединения, стимулирующие процесс очищения и заживления кожных ран. Это протеолитические ферменты и низкомолекулярные лекарственные препараты. Ранозаживляющим действием обладают белково-

полисахаридные покрытия, например, система на основе комплексов альгината натрия и коллагена («Альгикол») и хитозана и коллагена («Колахит»). Хорошим ранозаживляющим эффектом обладают вспененные композиции на основе альгиновой кислоты и желатина, нагруженные антибиотиками.

Для закрытия дефектов кожи применяют заранее приготовленные пленочные покрытия, которые наносят на поврежденные участки кожи на стадии эпителизации при отсутствии сильного увлажнения раны. Возможен другой подход, при котором на поверхность раны наносят материал в виде порошка, из которого формируется пленка, или используют полимерный спрей; в процессе испарения нетоксичного растворителя также формируется пленочное покрытие. Это пленкообразующая система «Лифузоль», полученная на основе полибутилметакрилата с добавками облепихового масла. Пленочные покрытия из поливинилового спирта хорошо адгезируют к ране, они не проницаемы для микрофлоры; а пленка из полигликолевой кислоты не плотно покрывает рану и быстро деградирует, аналогичные последствия обнаружены при использовании силиконовых пленок. Неплохие результаты получены при использовании отечественного пленочного покрытия «Карбоксил-П» («Вниимедполимер», Москва). Таким образом, успех этого направления зависит от адекватности свойств используемого материала.

Сравнительно недавно стали разрабатывать функциональные раневые покрытия, состоящие из нескольких слоев. Например, верхнего гидрофобного, не проницаемого для микроорганизмов, но проницаемого для кислорода и паров воды. Последующие (один или несколько) гидрофильные слои, обеспечивающие сорбцию жидкости и контакт с раневой поверхностью. Покрытие «Op-Site®», выпускаемое фирмой «Acme United Corp.» представляет собой прозрачную кислородопроницаемую полиуретановую пленку, эффективную при ожогах первой степени. Изделие «Biobrane®» (фирма «Woodroof Inc.») – это силиконовая резина-нейлон, покрытая экстрактом коллагена, может использоваться для более серьезных ожогов. Кожные покрытия этого типа могут использоваться в течение двух месяцев, после чего требуется постоянное покрытие для уменьшения величины шрамов. Проницаемость для паров воды у изделия «Op-Site®» составляет $20 \text{ г/м}^2 \cdot \text{ч}$, что сопоставимо с показателем здоровой кожи ($10 \text{ г/м}^2 \cdot \text{ч}$).

Введение лекарственных препаратов в гидрофильный слой, прилегающий к ране, способствует более быстрому восстановлению эпителия и ранозаживлению. В связи с актуальностью и острой востребованностью клиники в эффективных ранозаживляющих покрытиях кожных ран процесс разработки таких систем и поиск совершенных материалов продолжается.

Создана двухкомпонентная искусственная кожа, изготовленная из коллагена и полисахарида гликозаминогликана. Бычий коллаген приклеивается к полисахариду, чем уменьшается скорость рассасывания коллагена организмом. Эти два компонента образуют вспененную структуру для имитирования нижнего слоя кожи, а сверху система покрыта силиконовым слоем. Склеенные лоскуты смачивают и накрывают ими рану. После этого неодермис на-

растет; до 30 % заболеваний связано с травматизмом. Ежегодно на 100 000 населения регистрируется свыше 1700, среди них около 37,5 % приходится на переломы верхних и 31,1 % нижних конечностей. В РФ ежегодно регистрируется до 20 млн травм. Среди различных переломов доля повреждений длинных костей варьирует от 27 до 88,2 %. Особенно сложны для лечения переломы диафиза бедренной кости, диафиза костей голени, заканчивающиеся, как правило, госпитализацией. В этих случаях угрозу жизни для пациентов представляют массивные открытые раны и жировая эмболия. Катастрофическая потеря трудоспособности населения сопровождается огромными материальными затратами. Несмотря на использование современных конструкций и технологий лечения, процент осложнений и неудовлетворительных результатов все еще остается на высоком уровне (до 37 %).

Оптимизация процесса заживления дефектов костной ткани с помощью новых технологий и материалов является актуальной проблемой в медицине. В настоящее время восстановление дефектов костной ткани остается в центре внимания как фундаментальной медицинской науки, так и клинической практики. В клинической практике проблему восстановления дефектов костной ткани в последние годы пытаются решить путем разработки и внедрения новых методик реконструктивных операций с использованием материалов, восполняющих утраченный объем кости, и факторов, улучшающих ее репаративные свойства.

Анализ литературы позволяет сделать вывод о том, что в настоящее время для замещения костных дефектов предлагается широкий выбор трансплантационных материалов, различных по составу, форме и свойствам. Несмотря на широту спектра материалов для костной пластики, на сегодняшний день ни один из них не отвечает всем требованиям современной реконструктивной хирургии, что делает необходимым активный поиск новых и совершенствование существующих материалов.

Все виды костных материалов и заменителей кости можно разделить на следующие группы: *аутогенные трансплантаты*; *аллогенные имплантаты* (аллоимплантаты); *ксеногенные имплантаты* (ксеноимплантаты); *аллопластические материалы*. При этом широкий круг применяемых в медицине природных (аллогенных и ксеногенных) и синтетических материалов (препараты на основе коллагена, гидроксиапатита, хонсурид, хитозан, сплавы металлов, керамика, биоситаллы, полимеры и их композиты), не снимает актуальности проблемы, так как пока не создано материала, отвечающего всем необходимым требованиям, предъявляемым к материалам для регенерации дефектов костной ткани.

Практический опыт, накопленный клиницистами в области челюстно-лицевой хирургии и травматологии, показывает, что используемые в настоящее время остеопластические материалы имеют как преимущества, так и недостатки. Именно поэтому необходимым является поиск новых материалов – заменителей костной ткани, обладающих следующими преимуществами

ми: относительной простотой проведения хирургического вмешательства, расширением возможности моделирования, стабильностью структуры, отсутствием инфекционных возбудителей и т. д.

По современным представлениям «идеальный» костнозамещающий материал должен обладать рядом свойств:

остеогенностью (содержать клеточные источники для остеогенеза);

остеоиндукцией (запускать остеогенез);

остеокондукцией (служить матрицей для образования новой кости в ходе репаративного остеогенеза, обладать способностью направлять ее рост);

остеопротекцией (заменять кость по механическим свойствам).

В нормальных условиях основная часть репаративных процессов костной ткани происходит за счет остеобластов надкостницы, которые проникают в зону перелома и восстанавливают целостность кости. Несмотря на достаточно активную способность к репарации, костная и хрящевая ткань иногда не в состоянии полностью устранить дефицит тканей, возникший в результате действия повреждающего фактора, что является серьезной проблемой в реконструктивной ортопедии. Попытки восстановить утраченную часть кости или хряща предпринимались с давних пор и сводились, прежде всего, к аллотрансплантации или использованию синтетических материалов. Однако у этих широко применяемых и ставших уже рутинными технологий есть множество недостатков: от наличия иммунологического барьера и дефицита пластического материала до остаточного ограничения качества жизни, даже после проведенного лечения (синтетические протезы).

Исторически сложилось, что основную часть биоматериалов для восстановления костных дефектов получают из хрящевой и/или костной ткани человека и животных. Для изготовления композиционных материалов используют также компоненты других тканей (кожи, сухожилий, мозговой оболочки). При этом наиболее подходящими для трансплантации и последующей биоинтеграции являются *ауто трансплантаты*, которые готовятся из собственных тканей пациента и этим полностью исключаются основные иммунологические и большинство инфекционных осложнений при последующей пересадке. В клинической практике наиболее широко применялись аллотрансплантаты свежесамороженной, лиофилизированной, деминерализованной, формализованной, а также малодифференцированной костных тканей. Однако такие материалы должны готовиться непосредственно перед трансплантацией. В противном случае клиника должна иметь банк для хранения такого материала, что в реальности доступно только очень крупным медицинским учреждениям из-за высокой стоимости приготовления и хранения данных материалов. Кроме того, возможности получения значительных количеств аутоматериала весьма ограничены, и при его заборе, как правило, донор подвергается серьезным оперативным вмешательствам. Все это существенно ограничивает широкое применение ауто трансплантатов. Поэтому, несмотря на полученные положительные результаты экспериментальных и клинических исследований при проведении остеопластики с использовани-

ем вышеуказанных аллотрансплантатов, данный вид остеопластических материалов так и не получил широкого распространения.

Значительную роль в ортопедии и травматологии играют металлы. Например, одним из таких подходов к лечению переломов трубчатых костей является совершенствование аппаратов внешней фиксации (АВФ), история которых насчитывает свыше 100 лет. Однако эти конструкции не обеспечивают в полной мере механику процесса остеогенеза. Металлические (стальные) спицы и стержни, широко применяемые в настоящее время, вступают в сложные взаимодействия с окружающими тканями, что приводит к возникновению осложнений (металлозы, аутоиммунные реакции, асептическое воспаление, выделение из металлической конструкции токсических лигирующих компонентов (никель, хром и др.). В результате возникают индивидуальная непереносимость, остеопороз, остеолитический процесс, нестабильность фиксации имплантата. Серьезной проблемой в восстановительной ортопедии является снижение риска развития инфекции. Только при открытых переломах в результате развития бактериальной инфекции опасность возникновения инфекций возрастает до 5–33 %. Весьма сложны для лечения хронические остеомиелиты и так называемые имплантат-ассоциированные остеомиелиты, которые возникают в месте введения ортопедического имплантата (протезов суставов, укрепляющих штифтов, шпилек, винтов и т. п.). Узким местом при восстановительной хирургии с применением ортопедических имплантатов и фактором, ограничивающим такой метод восстановления костных тканей, является предотвращение инфекции на границе контакта поверхностей тканей и имплантата. В этом случае ситуация осложняется необходимостью доставки в эту интерфейсную область противовоспалительных и антимикробных препаратов и поддержания их концентрации на заданном уровне длительное время.

Для устранения этих неблагоприятных моментов, сопровождающих использование в восстановительной ортопедии металлических имплантатов и конструкций, сравнительно недавно (30–35 лет) сформировалось новое материаловедческое направление, ориентированное на повышение биосовместимости материала. Широкое распространение получили титановые имплантаты (стержни, спицы) с оксидным слоем на поверхности, который снижает реактивные изменения в тканях на границе с имплантатом. Однако оказалось, что поверхности титановых имплантатов, модифицированные оксидной пленкой, практически не взаимодействуют с костной тканью. Имплантация металлической конструкции в зону повреждения костной ткани должна сопровождаться развитием связей и взаимодействия материала имплантата с костной тканью. Этот подход лег в основу концепции биоактивных кальций-фосфатных материалов для репаративного остеогенеза.

Биокерамика сочетает в себе как биологическую активность, так и достаточную механическую прочность. Биокерамические материалы используются для изготовления зубов, костей, суставов. Главное требование при применении таких материалов – биосовместимость имплантата. Предпочтение в костно-пластической хирургии отдается пористым материалам, обеспечи-

вающим их быструю инфильтрацию в среде живого организма. Образующаяся костная ткань прорастает в поры материала, обеспечивая прочную связь с костью. Основное достоинство – сопоставимость с костными тканями, механическая прочность и их пригодность для изготовления конструктивных имплантантов для черепа и позвоночника. При этом пористые биокомпозиционные материалы по физико-механическим показателям находятся на уровне губчатых костных тканей. Среди используемых – биокомпозиционные (кальций-фосфатные) материалы: марки «Interpore-200» и «Interpore-500», «Calcitite-2040», «Ostrich NR» (США), «Ceros-80» (Швейцария), «Osprovit 1,2» (Германия), «БАК-1000» (Россия), «Bioapatite» (Франция).

В челюстно-лицевой хирургии широкое распространение получили гидроксиапатит и его композиции с другими материалами. Описаны разнообразные формы и способы получения кальций-фосфатных материалов в виде порошков, гранул, микрочастиц, пластин и т. п., а также в виде композиции с различными веществами. Имеется много сообщений об успешном применении синтетических костно-пластических материалов, таких как сульфат кальция, биоактивное стекло, эфиры цианакриловой кислоты, полиакриламидный гель, трикальцийфосфат, препараты на основе альгината натрия и др. Разрабатываются и исследуются пористые стеклокристаллические (ситалловые) биоимплантаты; ряд препаратов рекомендован для клинических испытаний.

Пористый гидроксиапатит, в отличие от плотного, обладает большей эффективностью остеointegrативных процессов за счет усиления сорбционной способности и увеличения общей площади частиц. Многими авторами и экспериментально, и клинически доказано, что использование гидроксиапатита имеет значительные преимущества перед другими имплантационными материалами; к его положительным характеристикам относятся: легкость стерилизации, продолжительный срок хранения, высокий уровень биосовместимости и медленная резорбция в организме. Однако есть мнение, что основным недостатком гранулированного гидроксиапатита является то, что при имплантации его в костную ткань нельзя достичь последовательной формообразующей и укрепляющей остеопластики. Поэтому рекомендовано использовать гранулированную гидроксиапатитную керамику только как наполнитель при достижении механической стабильности костной структуры другими способами.

С целью упрочнения гранулированного гидроксиапатита предложены препараты на его основе с растворимым желатином. Последний рассасывается в течение недели после имплантации препарата. Однако сам желатин не является оптимизатором остеогенеза, а только формообразующим компонентом. Экспериментальная апробация смесей порошка гидроксиапатита с раствором гликолевой кислоты и гидроксиапатита с фибрином при поднадкостничном имплантировании выявила весьма положительные результаты, заключающиеся в активном формировании новой кости. Однако многие хи-

хирургические вмешательства, выполняющиеся на костях лицевого скелета, часто проводятся в условиях воспалительного процесса и постоянной угрозы инфицирования костного дефекта патогенной микрофлорой полости рта, что в итоге нередко приводит к отторжению костезамещающего препарата. С этой целью разработан и создан препарат «Лингогентагал» на основе композиции гидроксиапатита ультравысокой дисперсности с линкомицином и гентамицином. Экспериментальные исследования созданного препарата позволили выявить его эффективное антибактериальное воздействие в области воспалительного очага костной раны, а также способность в ней костеобразования.

После установления в 1970-х годах способности коллагена стимулировать регенерацию костной ткани были начаты получение и исследование биокomпозиционных материалов, содержащих одновременно коллаген и гидроксиапатит. Например, для челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии были разработаны композиции «Alveloform» и «Bigraft», содержащие очищенный фибриллярный кожный коллаген и частицы гидроксиапатита (фирмы «Collagen Corp.», «Palo Alto», США). Данные материалы с хорошими результатами были использованы для восстановления альвеолярного гребня при хирургическом лечении больных с пародонтитами. Гистологические и ультраструктурные исследования доказали, что композиция – коллаген/гидроксиапатит положительно влияет на регенерацию кости, выполняя главным образом каркасную функцию, то есть проявляет в основном свои остеокондуктивные свойства. По мнению ряда исследователей, биокomпозиционные материалы, содержащие кожный коллаген «Ziderm» и синтетический гидроксиапатит, обладают определенными остеогенными потенциями. Серия таких гибридных материалов создана в России; это «Гидроксиапол», КоллапАн® – композиты гидроксиапатита и коллагена в виде гранул, пластин и гелей, в том числе наполненные антибиотиками, разработанные фирмами «Интермедапатит», «Росдент», «Полистом»; биоактивный гранулированный остеопластический материал Биальгин® на основе аморфного, нанодисперсного (5–10 нм), полностью резорбируемого гидроксиапатита кальция, включенного в полисахаридную матрицу альгината натрия. Большое количество работ было посвящено применению композиций на основе гидроксиапатита и коллагена. На Лужском заводе «Белкозин» создано две композиции вспененного коллагена с гидроксиапатитом и включением в одну из них антисептика хлоргексидина и иммуномодулятора тимогена. В клинических условиях показано, что при использовании биокomпозита, содержащего гидроксиапатит, резко возрастает скорость заживления костных ран и практически исключается риск послеоперационных воспалительных осложнений, а также спонтанных переломов в области удаленной кисты.

Эффективность использования гидроксиапатита определяется тем, что это соединение является основным структурным компонентом костной ткани и лишено недостатков, присущих большинству остеопластических материа-

лов. Однако область их применения ограничивается лишь случаями заполнения дефектов, ограниченных костными стенками.

Среди подходов, направленных на улучшение механических свойств биоматериалов из гидроксиапатита (уменьшение жесткости, повышение эластичности), в последние 10–15 лет сформировалось направление исследований, ориентированное на получение композитов гидроксиапатита с полимерами. Композиты гидроксиапатита с недеградируемыми полимерными материалами (полиэтиленом, полисульфоном), несмотря на хорошие механические характеристики (модуль Юнга, прочность на сжатие, растяжение и изгиб), значительно снижают биосовместимость гидроксиапатита. Новым решением проблемы, по мнению специалистов, может стать создание новых композитных, гибридных материалов на основе гидроксиапатита и биополимеров.

Существенный прогресс в области остеопластических материалов связан с получением композитов полимерных материалов, имитирующих взаимодействие минеральной части и коллагеновой матрицы костной ткани, синтезированных из природных полиэфиров (молочной, гликолевой и др. кислот), способных к биodeградации и биорезорбции. Комбинирование полилактида с гидроксиапатитом резко (в 5–20 раз) усиливает механические свойства композита по сравнению с системами гидроксиапатит/коллаген.

В связи с большим травматизмом и явлением остеопороза большое число пациентов нуждаются в полной замене суставов. Имплантации тазобедренных суставов (ТБС) начали осуществлять в 1960-х гг., процедура получила развитие, после того как доктор Чернли применил самозатвердевающий полиметилметакрилат («костный цемент»), стабилизирующий механический анкер («якорь») в металлическом протезе. Полная замена сустава предполагает имплантацию длительно функционирующего изделия, поэтому материал для такого эндопротеза отличается от костнопластических материалов, имплантируемых на некоторое время, в течение которого они заменяются новообразованной костной тканью.

Шаровидный протез для полной замены бедра состоит из двух компонентов – бедренного и вертлужного (рис 2.9). Бедренный стержень изготавливают из сплавов титана или кобальта с хромом, он состоит из головки, шейки и вала. Этот элемент фиксируется в костном канале посредством цементирования или прессовой посадки. Бедренная головка протеза обычно изготавливается из сплава Co-Cr, окиси алюминия или двуокиси циркония и может иметь полимерное покрытие. Монолитные бедренные протезы менее склонны к коррозии или разборке. Модульный имплантат подбирается индивидуально пациенту. Изношенная несущая полиэтиленовая поверхность может быть заменена новой без удаления металлической части имплантата из костного канала. Монолитный вертлужный компонент изготавливают из полиэтилена ультравысокой молекулярной массы.

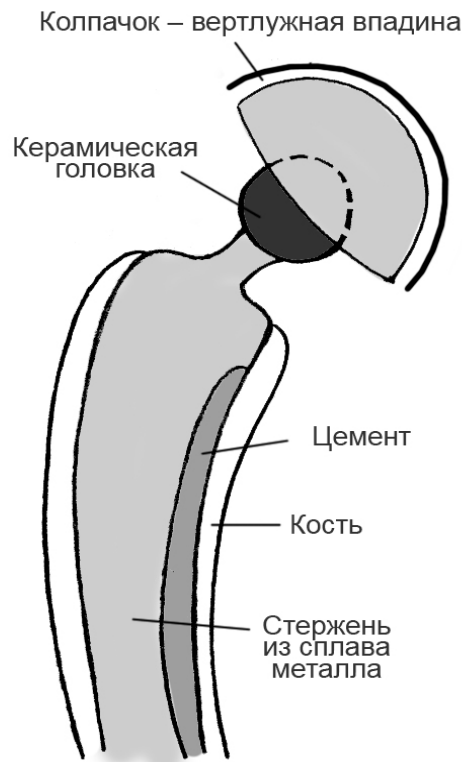


Рис. 2.9. Схема цементированного протеза бедра Чернли

В настоящее время эндопротезы ТБС выпускают десятки фирм, в этих протезах сочетаются металлические, керамические и полимерные детали. Однако поиск более совершенных материалов для протезов продолжается. Хорошие результаты получены при использовании углероднаполненного полиэтилена сверхвысокой молекулярной массы, полиформальдегида, фторопласта и полиамидов. Пористые полимерные материалы служат биосовместимым покрытием на крепежном стержне бедренной составляющей сустава. Аналогичные принципы конструирования применяют для создания протезов коленного, плечевого и других крупных суставов.

Для фиксации отломков костей с целью улучшения процесса их сращения применяют различные крепежные элементы (болты, штифты, пластины), которые до недавнего времени выполняли в основном из металлов или сплавов. Однако такие недеградируемые элементы после завершения остеогенеза в месте перелома необходимо удалять. Это требует повторного хирургического вмешательства, что удлинит сроки лечения и подвергает пациента дополнительным страданиям, а также риску инфекции. Практика использования полимерных материалов для изготовления элементов крепления отломков, во-первых, позволяет получить детали меньшего веса, во-вторых, улучшить их контакт с тканями, то есть их вживляемость, в-третьих, отпадает необходимость извлечения этих изделий из места дефекта. Для этого возможно применение как биостабильных, так и биоразрушаемых полимерных материалов ([рис. 2.10](#)).

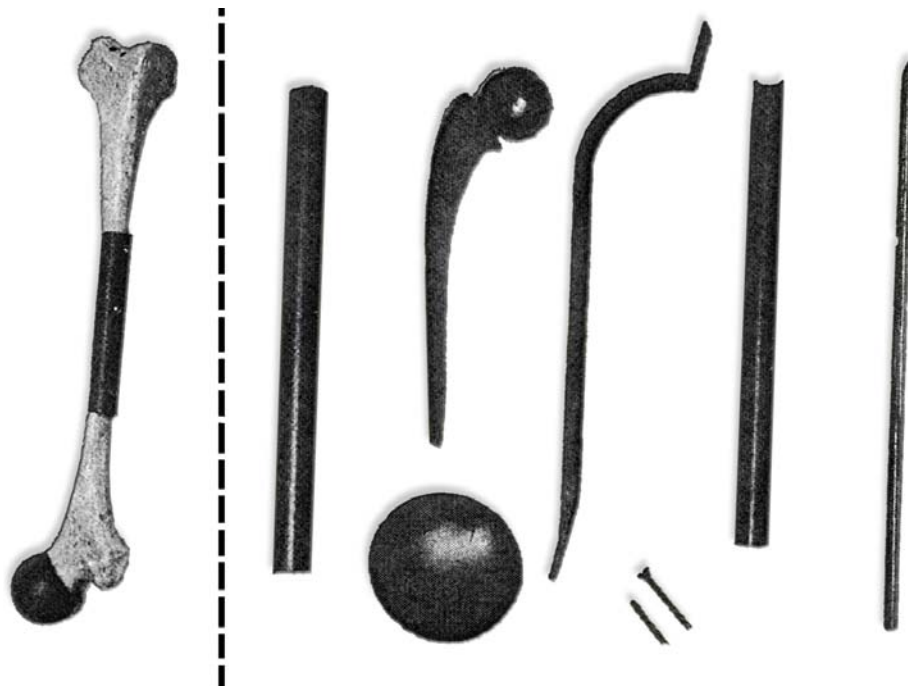


Рис. 2.10. Крепежные и другие ортопедические элементы для восстановления костных переломов, изготовленные в НИИ конструкционных материалов из полипропилена, наполненного углеродом (г. Москва, Россия)

Сконструированы и применяются в клинике для фиксации околоуставных и других сложных переломов фиксаторы из полиамидов, изготовленные литьем из расплавов. Хорошо себя зарекомендовали фиксаторы с массивным (до 40 % от материала покрытия) пористым покрытием из полисульфона.

Крепежные элементы и фиксаторы, изготовленные из биоразрушаемых полимеров, еще более привлекательны, так как они полностью замещаются со временем новообразованной костной тканью.

Для этого применимы полимеры гидроксикарбоновых кислот, прежде всего, молочной и гликолевой, а также сополимеры полилактида/ полигликолида. Эти материалы близки по свойствам нативной костной ткани, а скорость их биорезорбции может варьировать в зависимости от типа полимера и его молекулярной массы. Так, пластинки из сополимеров молочной и гликолевой кислот толщиной 2 мм, использованные для соединения отломков костей лица, обеспечили заданную скорость резорбции без острых реакций со стороны тканей.

Довольно широкое распространение получили штифты из разрушаемых полимеров, дополнительно усиленных армированием материалами из метилметакрилата, капроновыми волокнами, винилпирролидоном и др. Подобные конструкции сохраняют необходимую прочность длительное время, до 6 и более месяцев, что обеспечивает завершение остеогенеза в месте дефекта; их полная резорбция в организме проходит в течение 1,5–2,0 лет. Возможно дополнительное введение в состав покрытий крепежных элементов антимикробных средств для предотвращения развития инфекции.

Полимеры гидроксипроизводных алкановых кислот также привлекают внимание исследователей. В связи с тем, что скорости биорезорбции ПГА *in vivo* существенно ниже, чем у известных биоразрушаемых биоматериалов (полилактида, полигликолида), а прочностные характеристики выше, имеется принципиальная возможность использования этих полиэфиров для длительно текущей регенерации крупных и сложных костных дефектов и повреждений. В связи с имеющимися сообщениями о возможном пьезоэлектрическом эффекте ПГА, свойстве, очень важном для процесса остеогенеза, эти полимеры особо привлекательны для реконструкции дефектов костной ткани.

Показана возможность изготовления из ПГА объемных имплантатов (рис. 2.11), обладающих, как установлено в экспериментах на животных в тесте эктопического костеобразования и на модели сегментарной остеотомии), остеокондуктивными и остеоиндуктивными свойствами.

Описана возможность применения пластин и болтов из полигидроксibuтирата для закрытия дефектов костной ткани, которые спустя 6 месяцев полностью закрылись регенерированными тканями. Следует отметить весьма медленную деструкцию материала пластин; только спустя 25 месяцев была отмечена частичная резорбция полимера.

Показана эффективность применения конструкций из полигидроксibuтирата, нагруженных антибиотиками, для лечения экспериментального остеомиелита, вызванного стафилакокковым заражением. Подавление инфекции и регенерация костных тканей происходили на фоне разрушения полимерного матрикса и высвобождения из него антибиотиков. Эти результаты представляют большой интерес для лечения хронических, трудно протекающих костных инфекций, возникающих в результате открытых переломов и осложнений в послеоперационном периоде, а также в результате имплантации протезов.

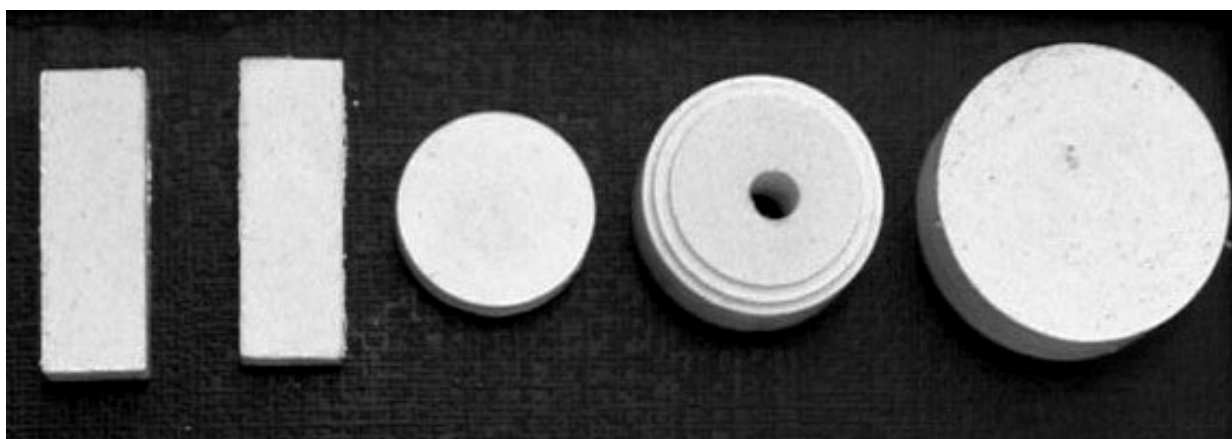


Рис. 2.11. Экспериментальные образцы конструкций – прототипы имплантатов для репаративного остеогенеза, изготовленные из полигидроксibuтирата и композитов полигидроксibuтирата с гидроксиапатитом (натуральные размеры) (изделия и фото Е. И. Шишцацкой)

Композиты на основе полимеров и различных материалов рассматриваются как наиболее перспективные остеопластические материалы. Полимерная связующая основа может быть наполнена костными цементами и пломбировочными материалами, кальций-фосфатными материалами. В качестве не разрушаемых полимеров рассматривают полиэтилен сверхвысокой молекулярной массы; в качестве разрушаемых – полимеры карбоновых кислот, а также полисульфоны, эпоксидные смолы, поликарбонаты. Композитам из биоразрушаемых полимеров монокарбоновых кислот (ПЛК, ПГК) и гидроксиапатита уделяется особое внимание. Полагают, что наполнение полимеров гидроксиапатитом повышает механическую прочность материала и его сродство к костной ткани. Эти композиты обладают свойствами близкими нативной костной ткани и высокой механической прочностью (прочность на сжатие – свыше 100 МПа, прочность на растяжение – 110–120 МПа, ударная прочность – свыше 150 кДж/см²).

Помимо полимерных и композитных крепежных элементов, для фиксации и сборки костных отломков используют склеивающие смеси (клеи, цементы). Такие субстанции, кроме функции механической фиксации отломков и заполнения трещин, выполняют роль соединительной фазы между костной тканью и материалом имплантата. Несмотря на недостаточную механическую прочность, наибольшее распространение получили акриловые цементы, которые сравнительно давно используют для фиксации стержней эндопротезов, вводимых в каналы трубчатых костей.

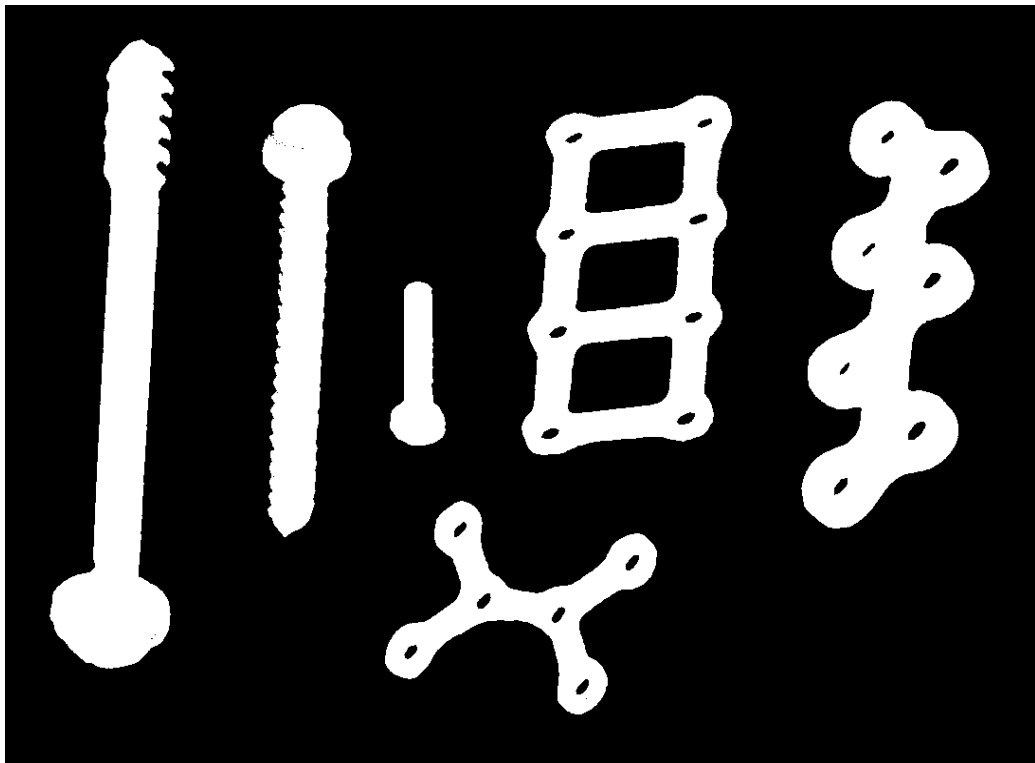


Рис. 2.12. Крепежные элементы для фиксации костных отломков, изготовленные из полилактида и гидроксиапатита

Большой проблемой в реконструктивной ортопедии является наличие адекватных пломбировочных материалов для заполнения крупных полостей в костной ткани, возникающих в результате проявления остеопороза или секвестров, например, в случае удаления опухолей. Для этого используют композиты гидроксиапатита с коллагеном типа «Коллапана», однако в результате быстрого гидролиза (разрушения) этого материала он не пригоден для заполнения полостей большого объема (свыше 4–6 см³). В качестве пломбировочных материалов разрабатывают составы на основе полиуретанов, вспененного полиметилметакрилата, однако эта проблема пока не решена.

2.3. Материалы, используемые для конструирования искусственных органов

Патология, сопровождаемая выходом из строя жизненно важных органов (сердца, легких, печени, почек, поджелудочной железы), приводит к смерти пациента, если не функционирующий орган не удастся заменить. Трансплантатом может служить орган другого человека или искусственный орган, разработанный с использованием новейших биомедицинских технологий. Негативными моментами, связанными с трансплантацией донорских органов, являются их дефицит и проблемы с иммуннотторжением. Последнее делает необходимым пожизненный прием пациентами дорогостоящих лекарственных препаратов, подавляющих иммунитет, что сопровождается серьезными побочными эффектами. Искусственные органы имеют ряд преимуществ, так как их имплантация требует меньших затрат времени, они изготавливаются массово, что сокращает время «ожидания» нуждающихся. Однако жизненно важные органы очень сложны, и их изготовление весьма трудоемко и требует специализированных высокофункциональных материалов и устройств. Клиническое применение искусственных органов в настоящее время ограничено только временным поддержанием функций жизненно важных органов и не обеспечивает многолетнего их функционирования.

Более оптимистичная ситуация при замене менее важных органов (органы чувств, кровеносные сосуды, клапаны сердца). Успех конструирования искусственных органов во многом определяется наличием и выбором адекватного биоматериала. Активная разработка новых материалов медицинского назначения привела к тому, что в настоящее время широкий спектр биосовместимых материалов весьма успешно применяют для изготовления различных эндопротезов и устройств, предназначенных для замены десятков (около 40) различных частей человеческого организма.

2.3.1. Искусственная почка

Почка была первым органом, для которого был создан искусственный конструктор. В 1940-х годах Кольфом был изобретен аппарат диализа, который стал искусственной заменой почки. Роль этого парного внутреннего органа в функционировании организма велика; почки поддерживают равновесие состава крови, контролируя давление, объем и кислотность крови, регулируя концентрации химических веществ, синтезируя гормоны, и выполняют роль фильтров. Почки могут быть повреждены вследствие наследственных дефектов, а также травм и многих заболеваний. Удаление продуктов обмена и воды почками – это весьма сложный процесс для имитирования. Почечная недостаточность последней степени может быть исправлена посредством диализа или трансплантации донорской почки. Диализ – это одновременная диффузия и фильтрация, отличающиеся от естественной функции почек; этот процесс прост, но весьма эффективен. Диализаторы используют для удаления избыточной жидкости из организма и растворимых продуктов обмена. Обменники (фильтрующие элементы диализатора) должны иметь высокую проницаемость для воды и полярных растворимых веществ, для их изготовления используют производные целлюлозы, пористые волокна из полисульфона, полиметилметакрилата или поликарбонатов. Диализат должен содержать заданные физиологические концентрации ионов и питательных веществ, чтобы исключить потери этих компонентов из организма. Диализ – это эффективный и спасительный раствор, но он не идеален при почечной недостаточности. Аппарат диализа удаляет мочевину и неизрасходованные питательные вещества, такие как вода, сахара и соли из крови, заменяя этим функцию естественной почки. Однако естественная почка также перенаправляет неиспользованные питательные вещества обратно в организм; это процесс, который диализ выполнить не может. В среднем пациент подвергается гемодиализу три раза в неделю в течение 5–6 часов за одно лечение, при этом пациент тратит время, а службы здравоохранения – огромные средства.

В ряде исследовательских центров Европы и США начата разработка биоискусственной почки. Созданы модели, которые содержат обычный патрон-гемофильтр и биореакторную камеру с устройством стимуляции почечного канальца, включающее 10^9 клеток почечного проксимального канальца. Такая биоискусственная почка направляет питательные элементы по трубкам, обложенным почечными клетками, повторно поглощающими полезные питательные вещества и отсылающими их через пористые стеки трубок в кровь. В настоящее время устройство проходит ограниченные клинические испытания.

2.3.2. Искусственные легкие

Легкие обменивают двуокись углерода в крови на кислород. Каждое легкое содержит маленькие воздушные мешочки – альвеолы, подвешенные в сетке узких капилляров, позволяющих только одному эритроциту проходить

по ним одновременно. Каждая клетка выделяет двуокись углерода и поглощает кислород через мембраны альвеол. Легкое содержит 40 различных типов клеток, структура которых является слишком сложной для того, чтобы ее можно было построить искусственно, и все функции легкого до конца не исследованы. Поэтому в настоящее время разработаны только машины содействия дыханию и газообмену. Во время хирургических операций кровь удаляется из организма, и функцию оксигенации и удаления продуктов обмена, а также возвращения крови в организм осуществляют газообменники (оксигенаторы). В клинической практике применяют оксигенаторы различных конструкций: пузырьковые, мембранные, пористые.

В пузырьковых оксигенаторах газообмен происходит непосредственно на пленке между кровью/газом вокруг каждого пузырька. Преимущество этой конструкции в наличии огромной площади поверхности для обмена при минимальном пограничном слое в результате того, что кровь и фазы газа перемешиваются. Контроль скорости относительной транспортировки можно осуществлять по размеру пузырьков, диаметр которых, как правило, составляет 30–50 мкм. Недостаток пузырькового оксигенатора в том, что кровь постоянно образует новые разделы фаз «кровь-газ», негативно влияющие на клетки крови и белки плазмы. Поэтому такие оксигенаторы используют в случае кратковременных процедур подключения пациентов к газообменнику.

В мембранных оксигенаторах кровь непосредственно не соприкасается с газом, так как они разделены мембраной (толщина 0,2–0,4 мкм). Материал мембраны должен быть газорастворимым. Как правило, для этого используют полимерные материалы (силоксаны, полипропилен, силикон). Эффективность насыщения крови кислородом определяется свойствами используемого полимерного материала; чем выше значение проницаемости ($D\alpha$), тем эффективнее процесс газообмена (P_{CO_2}/P_{O_2}). У целлюлозы проницаемость составляет величину порядка 25, а эффективность газообмена около 18; у силоксана соответственно 1000 и 5; у полиэтилена – 12 и 3. Для придания жесткости мембране фильтрующий слой укрепляют жестким макропористым слоем с размером пор в несколько мкм. Площадь мембраны в оксигенаторе достаточно большая, не менее 2–5 м², поэтому мембрана скручена в виде спирали с пространством для крови и газа порядка 1–3 мм.

Полимерные мембраны из полых волокон или листов с многочисленными порами диаметром 1 мкм представляют собой пористые мембранные оксигенаторы. Цилиндрическое устройство заполняется пучками полых волокон. Через внутренний канал волокон или через зазоры между волокнами течет кровь. Диаметр пространства для крови может быть очень небольшим около 100 мкм. Связано это с тем, что многочисленные волокна смачиваются параллельно, поэтому сопротивление потоку и сдвигу, прилагаемое к крови, очень низкое. В данной конструкции оксигенатора силы поверхностного натяжения препятствуют прохождению крови через поры волокон (или мембраны), в результате газ осуществляет обмен на постоянном стыке фаз «газ/кровь», образуемый при попадании крови в устройство, поэтому взаимодействие газа и крови сводится к минимуму.

Сравнительно недавно в Институте трансплантологии и искусственных органов Росздрава разработан имплантируемый катетер с источником кислорода, который вставляется в полую вену (вену, возвращающую кровь к сердцу) для оказания помощи пациентам с хроническими и острыми легочными заболеваниями. По мере того как кровь проходит катетер, она вновь обогащается кислородом [4]. Устройство может обеспечить взрослого половиной того кислорода, который нужен для дыхания продолжительностью до 2 недель, поэтому оно полезно в качестве краткосрочного устройства помощи дыханию, пока естественные легкие восстанавливаются после травмы или заболевания.

2.3.3. Протезы органов зрения

Процесс световосприятия весьма сложен. Весь процесс видения предмета занимает 0,01 с, что гораздо быстрее, чем период обработки изображения фотоаппарата самым быстрым компьютером. Свет падает на роговицу, фокусируется зрачком на кристаллической линзе, которая далее придает ему более точную фокусировку с тем, чтобы лучи света получили форму конуса в узловой точке глаза. Радужная оболочка контролирует диаметр зрачка, управляя количеством света, пропускаемым в глаз. Как только лучи света проходят узел, они расширяются в зеркально отражаемый конус, проходя через стекловидное тело, фокусируются на сетчатке с задней стороны внутреннего глаза. Сетчатка состоит из светочувствительных нервных клеток – палочек и колбочек, передающих электронные сигналы по оптическим нервам зрительной зоны коры головного мозга, которая представляет собой два маленьких участка в нижней задней части мозга. Если зрительная зона коры головного мозга повреждена, зрение может быть потеряно, даже если глаз и зрительный нерв являются полностью функциональными.

Ежегодно тысячи человек теряют зрение из-за механического повреждения роговицы в результате болезни или химических ожогов. Трансплантация донорского глаза является обычной процедурой, но, как и в других случаях с донорскими органами, пересадка лимитирована дефицитом трансплантатов. Эндопротезы глаза, выполняющие косметическую функцию при потере глаза, давно разработанная и распространенная процедура. Орбитальные имплантаты на первых порах изготавливали из стекла. Далее для этих целей стали применять полимеры, прежде всего полиметилметакрилат. Применение полимеров существенно уменьшило вес протеза. Усовершенствованные конструкции глазных орбитальных протезов за счет прикрепления их к глазным мышцам приобрели подвижность.

Наиболее распространенной операцией по восстановлению зрения в настоящее время является имплантация искусственного хрусталика. Ежегодно восстанавливается зрение более чем миллиону пациентов в результате операций по удалению катаракты. При этом вместо помутненного хрусталика имплантируют интраокулярную линзу. Линзы изготавливаются из оптиче-

ского полиметилметакрилата. В последние годы для этого стали применять модифицированные кремнеорганические материалы, сополимеры винилпирролидона, композиции коллагена с акрилатами и др. Разработаны и выпускаются серийно различные типы интраокулярных линз: моно-, ди- и мультифокальные (рис. 2.13). При имплантации искусственный хрусталик (линзу) помещают сзади радужной оболочки, иногда – перед ней. Линза закрепляется с помощью гибких полимерных петель. Поскольку внутри глаза перемещение небольшое, интраокулярная линза стабильна, и процент успеха очень высокий на многие годы.

Полимеры применяют для разработки имплантатов, обеспечивающих снижение внутриглазного давления и отток жидкости при глаукоме. Дренирующие имплантаты, обеспечивающие оптимальную скорость оттока жидкости из передней камеры глаза или области глазного яблока, изготавливают из пористого коллагена из высокоочищенных препаратов склеры животных, кремнийорганических трубочек, вспененного политетрафторэтилена. Более сложным дренирующим устройством являются клапаны, в конструкции которых (помимо трубочки) предусмотрена камера, снабженная водопроницаемой мембраной. Материалом для изготовления глазных клапанов служат сшитые силиконы, метилметакрилат, полиамиды. Отдельные полимеры используют для эндопротезирования роговицы в случаях ее значительных повреждений, а также для замещения стекловидного тела. Последние представляют собой гелевые системы.



Рис. 2.13. Мягкая акриловая интраокулярная линза [AcrySof- ReSTOR](#), производства компании ALCON (данные сайта ООО «Центр коррекции зрения «Окулюс» [<http://ktk.ru>])

При повреждениях зрения центрального происхождения задача восстановления дефектов намного сложнее. На протяжении 40 лет предпринимались попытки восстановления зрения посредством передачи электрических сигналов на зрительную зону коры головного мозга. Воздействие заключается в том, чтобы создать яркие пятна света (фосфины) в сознании. Пятна перемещаются, образуя изображение посредством передачи электрических импульсов различным электродам. Изображение походит на электронное табло или на телевизионное изображение очень плохого качества. Однако из-за безопасности пациентов восстановление зрения путем электрической стиму-

ляции по-прежнему остается экспериментальным методом. Функциональный имплантированный искусственный глаз – это дело далекого будущего.

Исследователи Массачусетского технологического института и Массачусетской клиники глаза и уха (США) разрабатывают в настоящее время имплантат глаза, который может восстановить зрение пациентам, страдающим заболеванием сетчатки, включая дегенерацию желтого пятна – возрастного заболевания, являющегося основной причиной слепоты. Разрабатываемый имплантат сетчатки включает две силиконовые микросхемы, одна из которых обеспечивает солнечную энергию и обрабатывает изображение окружающей обстановки пациента, снятое миниатюрным фотоаппаратом, установленным в очках, надетых на пациента. Функция другой – расшифровывать информацию изображения и передавать электрические импульсы рецепторным клеткам сетчатки, доставляющим зрительные сигналы мозгу. Весьма вероятно, что по мере увеличения мощности компьютеров по обработке данных и уменьшения размеров процессоров станет возможным создание искусственного глаза.

2.3.4. Реконструкция органа слуха

Сложная система органа слуха (уха) преобразует звуковые волны в электрические нервные сигналы для дешифровки их мозгом. Орган состоит из внешней части (ушная раковина и воронка ушного канала), передающей звучание вовнутрь в направлении среднего уха; среднего уха, внутреннего уха (улитки), содержащего тысячи звуковых рецепторов, (так называемые волосковые сенсорные клетки) и тысячи нервных путей, которые передают звуковую информацию от волосковых сенсорных клеток к слуховому центру мозга (слуховой коре мозга).

Глухота может возникать вследствие различных причин (врожденных дефектов, старения, травмы, инфекционных заболеваний). Глухота может быть связана с дефектами в любой из четырех частей уха и классифицируется по той части, которая ее вызвала. Кондуктивная глухота относится к неспособности внешнего или внутреннего уха передавать звук и часто вызывается образованием губчатой кости в среднем ухе, которая фиксирует косточки (отосклероз). Данное состояние лечится благодаря применению слухового аппарата или хирургически с использованием протеза. Нейросенсорная глухота – следствие дефектов в улитке либо в результате повреждения волосковых сенсорных клеток (сенсорная глухота), либо в результате повреждения нервных волокон. Центральная глухота возникает в результате повреждения ствола мозга или слухового нерва.

Искусственный протез «Bioglass®», созданный в 1969 г. доктором Мервиным, был первым искусственным материалом, присоединяемым к живым тканям. Ранее предпринимались попытки использования имплантатов среднего уха, изготовленных из биоинертных материалов (титана, тефлона, платины, тантала) и пластмассы (типа «Пластипор»), но они выходили из

строю. Дело в том, что при имплантации изделий из недеградируемых материалов, вокруг них (как реакция на инородное тело) образуется фиброзная капсула, изолирующая имплантат от организма. Для некоторых клинических случаев формирование капсулы или шрама вокруг имплантата не представляет проблемы, но для имплантата среднего уха это неприемлемо. Перемещение имплантата может также привести к образованию отверстия в барабанной перепонке, а сам имплантат может провалиться через это отверстие, причинив барабанной перепонке необратимое повреждение. Имплантат среднего уха Bioglass® позволил испытать новую концепцию восстановления органов человека – биоактивное склеивание. Специальный состав стекла содержал соединения, из которых образованы кости и тканевая жидкость (Na_2O , P_2O_5 , CaO и SiO_2). Ионы, стимулирующие костные клетки, мигрируют из имплантата; в результате на его поверхности образуется слой фосфата кальция, аналогичного минеральной составляющей костной ткани. Между имплантатом и костью организма-хозяина образуется биоактивная связь. Первый имплантированный образец имплантата среднего уха «Bioglass®» надежно функционировал у пациентки в течение 10 лет спустя после операции и далее. Это успешный пример позволил восстановить слух тысячам пациентов.

Во многих случаях повреждений внутреннего уха, например, в результате повреждения волосковых клеток, имплантаты типа «Bioglass®» не могут исправить ситуацию. Решение проблемы неврологической глухоты началось с изобретения Александра Белла в 1876 г., которое получило название «био-ухо». В созданном конструкторе речь преобразовалась в электрические сигналы с помощью микрофона; электрические импульсы были преобразованы громкоговорителем снова в слова. В настоящее время имплантат «био-ухо» способен восстанавливать слух до такой степени, что пациенты могут вести разговор по телефону. Имплантат улитки содержал три отдела [20]:

микрофон и звуковой процессор, присоединенный к задней части ушной раковины, как обычный слуховой аппарат. Звуковой процессор преобразовывал звук в цифровую информацию и отсылал ее антенне передатчика, прижимаемой к боковой части головы магнитом;

имплантат, установленный внутри головы, но рядом с антенной, получал переданный сигнал и преобразовывал его в электрический сигнал, отсылаемый затем на электрод во внутреннем ухе через маленькие провода;

комплекс электродов доставлял электрические сигналы через маленькие контакты (электроды) слуховому нерву, а слуховой нерв передавал звуковую информацию мозгу, где она обрабатывалась.

Современные имплантаты улитки все еще являются дорогостоящими, их применение ограничено и требует специального обучения пациентов. Качество звука, стимулированного электродами, низкое, и общие результаты непредсказуемы. Слуховая реабилитация или терапия – это ключ к успешному применению имплантата улитки для многих реципиентов имплантата. Имплантат не может решить все клинические проблемы, способствующие глухоте. Для достижения максимальной эффективности новому пользователю

лю потребуются практика слушания. Для детей реабилитация является критической с точки зрения развития навыков языка и речи.

2.3.5. Искусственное сердце

Болезни сердца – главная причина смертности, из-за которой каждый год умирает несколько миллионов людей. При потере функциональной способности сердечной мышцы для частичного или полного восстановления насосной функции сердца достаточно часто приходится прибегать к имплантированию технических устройств, имитирующих насосную функцию сердца. Для этого разрабатываются эндопротезы целого сердца или устройства, выполняющие функцию левого желудочка. К имплантации подобных устройств прибегают, как правило, у пациентов, ожидающих очереди для пересадки донорского сердца.

Метод трансплантации донорского сердца, несмотря на весьма широкое распространение (в США ежегодно пересаживают сотни сердец), лимитируется, главным образом, дефицитом донорских органов. Попытки заменить сердце человека ксенотрансплантатами животных обнадеживающих результатов пока не дали. Первые попытки пересадки сердца на животных были предприняты в 30-х гг. прошлого столетия. Только после создания аппаратов искусственного кровообращения, сделавших возможным отключение сердца на время операции, стало возможным проведение работ по замещению сердца инженерными конструкциями. Эндопротезы сердца активно стали разрабатывать в США и СССР с конца 1960-х гг. Были сформулированы основные требования, предъявляемые к конструкторам сердца и материалам для их изготовления. Прежде всего, насосная функция искусственного сердца (ИС) должна удовлетворять потребности организма и иметь надежный источник энергии для функционирования. Очень важным моментом является использование тромборезистентного материала, исключающего тромбообразование и травмирование клеточных компонентов крови. Устройство должно по размерам соответствовать грудной полости для размещения конструкции и стабильно работать в штатном режиме на заданный срок функционирования. Для изготовления элементов искусственного сердца, применяемые на первых порах материалы (тефлон, натуральный каучук, полиметилметакрилат, поливинилхлорид) оказались малопригодными для длительного функционирования. Далее были рассмотрены в качестве вариантов свойств поверхностей элементов конструкции ИС материалы с гладкой поверхностью, а также материалы с пористой и неровной поверхностями. Хорошие результаты были получены при использовании для изготовления элементов искусственного сердца сегментированных полиуретанов с гладкой поверхностью. Повышение прочности полиуретанов возможно армированием их сетками, изготавливаемыми из политерефталата. Для изготовления элементов, контактирующих с кровью, применяют высокочистые металлы с чистотой поверхности не ниже 10-го класса. Для ряда элементов конструк-

тора сердца используют силиконовые резины.

Конструкции искусственного сердца представляют собой одну или две автономные емкости, снабженные входным и выходным клапанами (аналоги желудочков сердца). Искусственные желудочки отделены мембраной от пневматической камеры переменного объема за счет нагнетаемого или откачиваемого воздуха. В зависимости от модели ИС камеры изготавливали диафрагменного или мешочного типов. В последнем мембрана представляет собой цельный мешок, в который нагнетается воздух. В конструкторе диафрагменного типа мембрана выполнена в виде эллипсоидной диафрагмы, фиксированной к стенке искусственного желудочка.

Одной из первых моделей искусственного сердца были конструкторы ИС типа «Поиск» (разработка НИИ трансплантологии и искусственных органов Росздрава) и Джавик-7, разработанный в США. Модель ИС Джавик-7, представляющий собой четырехкамерный полиуретановый агрегат с двумя диафрагменными насосами и четырьмя механическими клапанами, подсоединялся к организму и был рассчитан на службу в течение 4–5 лет; его эксплуатация предусматривала использование проводов, проходящих через кожу к внешнему аккумулятору. В 1980-х годах этот конструктор сердца проходил клинические испытания, но не позволил добиться долгосрочного успеха, хотя и служил в качестве запасного сердца для поддержания жизни пациентов в течение коротких периодов времени (1 неделя), пока они ожидали трансплантатов. В 70-е и 80-е годы прошлого века разнообразные модели эндопротеза сердца были разработаны в СССР и США. Отечественные конструкции искусственного сердца дифрагменного типа с камерой для крови, изготовленной из сегментированных полиэфируретанов, «Витур» и «Гемотан» были разработаны в СКТБ МТ им. П. О. Сухого. В одной из моделей впервые в мировой практике были использованы трехстворчатые лепестковые клапаны, что позволило улучшить гемодинамику и снизить вероятность тромбообразования. Эта конструкция ИС была рассчитана на 10-летний цикл функционирования. Оптимизированные конструкторы ИС «Поиск-10» были успешно опробированы на телятах и прошли клинические испытания (рис. 2.14). Эта модель ИС представлена двумя овальными конструкциями с воздушными камерами, снабженные эллипсоидной диафрагмой и клапанами и представляет собой портативное устройство (120 см длиной, 110 см шириной и 80 см высотой) весом порядка 210 г, с объемом заполнения 120–140 см³ и ударным объемом 80–100 см³.

Большое разнообразие моделей эндопротезов целого сердца было создано в США. С конца 1990-х гг. в Европе и США в клинической практике начали имплантировать ряд конструкторов сердца. Полностью пересаженное искусственное сердце было имплантировано в июле 2001 г. Роберту Тулзу, 59-летнему американцу, в штате Кентукки. Устройство весом 1 кг, называемое «АбиоКор», имело размер грейпфрута. Господин Тулз умер через 4 месяца из-за плохого общего состояния здоровья. Спустя некоторое время аналогичные устройства были имплантированы нескольким десяткам пациентов, остро нуждающимся в замене больного сердца. Большинство пациентов

прожили дольше, чем предсказывалось в их прогнозе до имплантации, поскольку клинические эксперименты были ограничены теми лицами, выживание которых после операции в течение более 30 дней не прогнозировалось. Эта модель ИС выпускается серийно компанией «Абиомед Инк.». ИС «АбиоКор» – это титановый и полимерный насос с питанием от внешнего аккумулятора, который пациент носит на плечах. Через кожу не проходит никаких проводов, что сокращает риск инфекции.

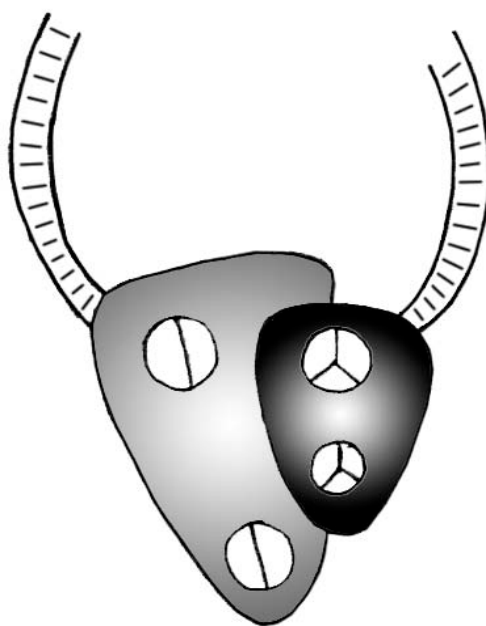


Рис. 2.14. Схема эндопротеза сердца «Поиск-10А», разработанный в институте трансплантологии и искусственных органов [12]

В настоящее время в США и Европе имплантируют конструктор искусственного сердца «MicroMed DeBakey Ventricular Assist Device™», разработанный и серийно выпускаемый фирмой «Johnson Space Center» Национальной Астронавтической Федерацией США. Весьма удачной считается другая модель – «Penn Sate's», также разработанная в США.

Серьезной проблемой является разработка надежного привода, способного функционировать вне или внутри организма. Пока не реализована возможность использования ядерного источника энергии для ИС, способного длительно и стабильно функционировать.

Новые возможности, представляемые новейшими биомедицинскими технологиями, связанные с техникой клеточной и тканевой инженерии, открыли пути для конструирования эндопротезов сердца принципиально новыми методами. Однако до недавнего времени попытки создать функциональный эквивалент миокарда не удавались из-за невозможности восстановления коронарного кровотока, то есть повторения его ангиоархитектоники и автономной проводящей системы. Направление этих работ было ориентировано на создание тканеинженерных конструкций, толщина которых обес-

печивала бы выживаемость клеток после трансплантации в функционирующее сердце. Одним из методов, позволяющим обеспечить биоартифициальный орган по всей толщине сосудистой сетью, является метод реперфузии сосудистого русла девитализированного органа суспензионной культурой эндотелиальных клеток. К приносящей артериальной ветви подсоединяется канюля, через которую под давлением производится перфузия среды, содержащей эндотелиальные клетки, тогда как основные функциональные клетки органа вносятся в него в иммобилизованном состоянии в коллагеновом или фибриновом геле.

Прорывной результат по конструированию функционального сердца методом реперфузии и ретрансплантации кардиомиобластов достигнут в 2007 г. исследовательской группой Дорис Тайлор из [университета Миннесоты](#) (США). Полученные от взрослых особей 28 сердец были девитализированы, отмыты и заселены эмбриональными крысиными кардиомиоцитами. Заселение эндотелиальными клетками сосудистого русла было выполнено путем подключения к аорте проточной перфузионной системы с отводом жидкости через полость правого желудочка. Кардиомиобласты были инъецированы в толщу миокарда. Через некоторое время подключали кардиостимулятор и обеспечивали пульсирующий ток среды. В результате впервые получена функционирующая модель сердца с сосудистой сетью и миокардом, отвечающим ритмичными физиологическими сокращениями в ответ на стимуляцию. Таким образом, передовые технологии тканевой инженерии 3-го поколения позволили воплотить в жизнь идею функционирующего сердца.

В дальнейшем нужно ожидать исследований, связанных с трансплантацией данной модели, хотя использование этой технологии без изменений сопряжено с необходимостью использования, как минимум, иммунодефицитных животных или перехода на аутогенный клеточный материал. Это исследование является революционным, даже если рассматривать данную модель артифициального сердца в качестве тест-системы для медицинской фармакологии, актуальность которой также не подвергается сомнению. Ожидается, что разработка может быть доведена до клинических испытаний в течение ближайших 10 лет.

2.3.6. Гибридная печень

Печень – большой и сложный орган, образованный мультифункциональными клетками, которые в зависимости от локализации и удаления от источника артериальной крови, имеют тысячи функций. Печень регулирует белковый обмен, уровень жиров и углеводов в крови, факторов свертывания крови, синтезирует множество важных для жизнедеятельности химических веществ и очищает кровь от токсинов. Это множество функций пока не удастся имитировать с помощью искусственного органа. Наиболее успешно в настоящее время решается функция детоксикации крови клиническими методами с использованием плазмофореза и криофльтрации. Однако оба

метода делают необходимым частые посещения клиники больными. Перспективным способом замены поврежденной печени в настоящее время является технология замены поврежденной печени гибридом искусственной ткани, так называемого конструктора, полученного методом тканевой инженерии. Второй путь лечения печеночной патологии, активно разрабатываемый в настоящее время, – имплантация в поврежденную печень стволовых клеток. Основными трудностями при разработке биоискусственной печени являются слабая пролиферативная активность клеток печени при культивировании и их низкая жизнеспособность. Для повышения физиологической активности гепатоцитов разрабатываются два подхода:

внутримышечная имплантация пула изолированных гепатоцитов в микро- или макрокапсулах, изготовленных из полимерных материалов (типа альгината и агарозы);

перфузия крови или плазмы пациента с использованием экстракорпоральных устройств, содержащих свободную взвесь функционирующих донорских гепатоцитов (в основном, свиных) или гепатоцитов, иммобилизованных на поверхности полимерных матриксов или в объеме.

Есть данные о том, что инкапсулированные гепатоциты, вводимые интраперитонеально, в течение небольшого срока (7–10 дней) способны заменять функцию печени. Однако по истечении 4–6 недель инкапсулированные гепатоциты теряют функциональную активность. Одной из причин этого может быть разрушение капсулы. Для депонирования гепатоцитов описаны положительные примеры использования для этих целей пористых гранул на основе поливинилформальдегида, а также полупроницаемых полых волокон типа Plasmaphan (AKZO-NOBEL, Wuppertal, Германия) с диаметром пор ~ 0,5 мкм. Разрабатываются экстракорпоральные системы, представляющие собой коллагеновый гель с иммобилизованными в нем гепатоцитами; в качестве носителей гепатоцитов исследуются полимерные двухмерные матриксы, изготовленные из сополимеров молочной и гликолевой кислот, модифицированные коллагеном. Успехи в области конструирования биоискусственной печени с применением гепатоцитов млекопитающих позволили начать применение таких конструкций в клинических условиях для поддержки функции печени у пациентов, ожидающих проведения ортотопической трансплантации печени.

Биоискусственная печень – пример использования экстракорпоральных систем для конструирования гибридных искусственных органов. Принцип работы экстракорпоральной системы ([рис. 2.15](#)) сходен с традиционным гемодиализом: артериальная кровь пациента циркулирует через специальное устройство, основным элементом которого является мембрана на основе пористых волокон с иммобилизованными клетками. Кровь течет внутри волокон, тогда как взвесь функционирующих клеток находится во внешнем пространстве, или наоборот. Субстрат-зависимые клеточные культуры могут быть иммобилизованы на поверхности волокон, входящих в состав рабочей ячейки. Предел пропускания мембраны должен быть ограничен веществами, молекулярная масса которых не превышает 50–80 кДа (газы, пептиды, не-

большие белки). Оптимальными, надежными и безопасными в использовании считаются мембраны с диаметром волокон 200 мкм. Скорость кровяного потока при этом должна быть 200 мл/мин, активная поверхность картриджа – меньше, чем 2,5 см².

Новым направлением в терапии печеночной недостаточности является трансплантация фетальных тканей. Фетальные соматические клетки имеют преимущества перед соматическими клетками взрослых доноров, так как они имеют слабоэкспрессированные комплексы главных антигенов гистосовместимости (это на порядок снижает уровень посттрансплантационных осложнений). Фетальные органы содержат в основном стволовые и бластные клетки, обладающие мощным пролиферативным потенциалом. И наконец, фетальные ткани при трансплантации вносят уникальный комплекс ростовых факторов, стимулирующих регенерацию тканей реципиента.

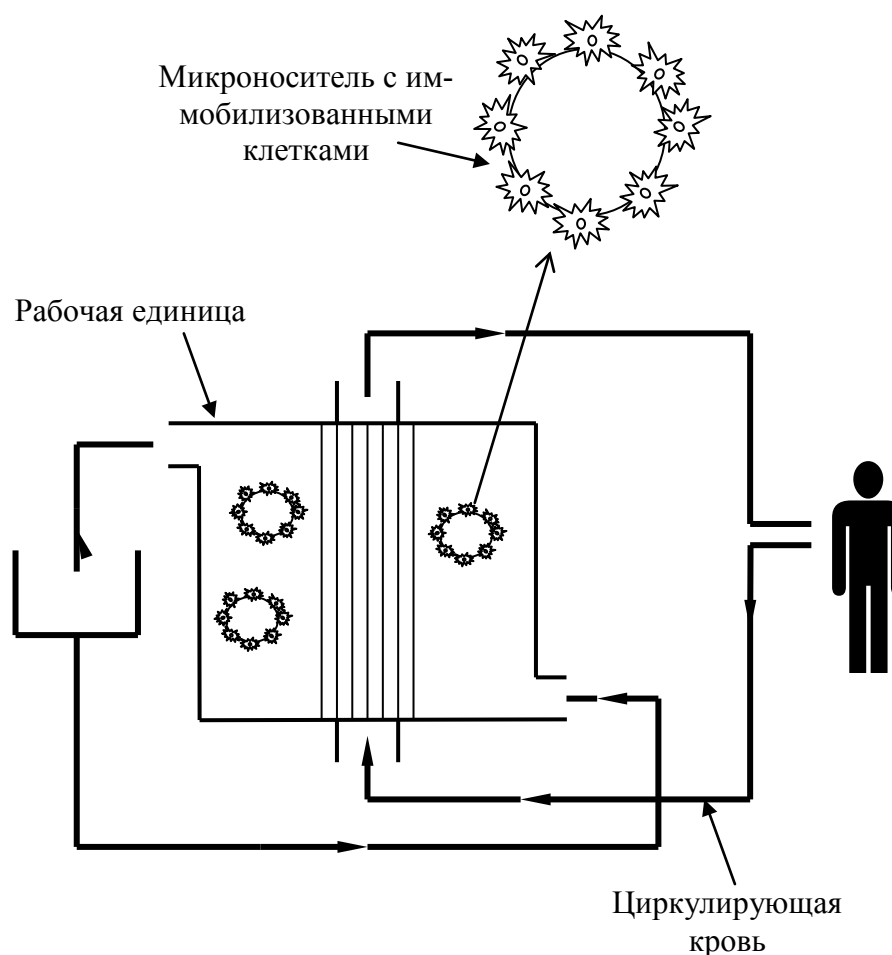


Рис. 2.15. Схема экстракорпоральной системы [Волова, Севастьянов, Шишацкая, 2006]

Такие исследования активно проводятся в настоящее время, в том числе в ограниченных масштабах в условиях клиники.

2.3.7. Искусственная поджелудочная железа

Поджелудочная железа регулирует уровень глюкозы в крови. Островки эндокринных панкреатических β -клеток снижают уровни глюкозы путем увеличения уровней гормонов, открытия рецепторов глюкозы в клетках. Если поджелудочная железа не может синтезировать инсулин, клетки не усваивают глюкозу, и энергия берется из распада жиров, что может привести к коме и смерти. Хронический дисбаланс глюкозы ведет к обезвоживанию и может вызывать слепоту, почечную недостаточность, сердечную недостаточность и нарушение кровообращения в ногах и ступнях, которое может привести к ампутации конечностей. Сахарный диабет является широко распространенным заболеванием, по медико-социальной значимости он занимает третье место после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. Несмотря на определенные достижения последних лет, современная терапия сахарного диабета по-прежнему не обеспечивает полноценной компенсации патологического состояния. Основной причиной ранней инвалидизации и сокращения продолжительности жизни являются диабетические ангиопатии и нейропатии. Поэтому необходима разработка новых подходов к лечению сахарного диабета, которые могли бы существенно повлиять на течение диабетических ангиопатий. Одним из таких подходов, как альтернатива трансплантации поджелудочной железы при лечении инсулинзависимых больных, является создание биоискусственной поджелудочной железы. В 1969 г. в США исследователями Университета штата Миннесота был разработан насос инсулина, который весил 300 г и имплантировался подкожно. Сравнительно недавно в Великобритании (Университете Сити, Лондон) разработан экспериментальный образец искусственной поджелудочной железы, непрерывно подающий инсулин под кожу и поддерживающий концентрацию глюкозы в крови на постоянном уровне. Конструкция состоит из трех частей: датчика, устанавливаемого на кожу и измеряющего уровни глюкозы в крови, ручного портативного компьютера, анализирующего эту информацию, и маленького насоса, впрыскивающего глюкозу в организм. Это миниатюрное устройство можно будет устанавливать, например, на брючный ремень или иной аксессуар одежды. Разработчики этого устройства полагают, что оно поступит на рынок примерно через 5 лет.

Перспективным подходом считается возможность использовать β -клетки для производства соответствующего количества инсулина, действующего как детектор и как устройство контролируемого выпуска. Для конструирования гибридного органа, содержащего клетки поджелудочной железы, необходимо решение серьезной проблемы, связанной с необходимостью создания условий поддержания островков инсулинопроизводящих клеток поджелудочной железы в функционирующем состоянии, защищая их от иммунной системы организма. Клетки островков при этом должны реагировать на изменяющиеся уровни глюкозы в крови пациента и вырабатывать необходимое количество инсулина.

К настоящему времени созданы гибридные системы, содержащие

функционирующие островковые клетки поджелудочной железы (β -клетки), покрытые иммуноизолирующими мембранами, в виде микрокапсул размером от 100 до 800 мкм (рис. 2.16), экстраваскулярных диффузионных камер и интраваскулярных диффузионных камер (рис. 2.17).

Микрокапсулы представляют собой везикулы, состоящие из «ядра» (или «активной зоны»), содержащей отдельные клетки или небольшие кластеры клеток, и оболочки, представляющей собой полупроницаемую микропористую мембрану. Микрокапсулы имеют относительно высокое соотношение площади поверхности к объему для минимизации диффузионных ограничений. Толщина мембраны может быть менее, чем 1 мкм, обеспечивая высокую скорость массопереноса и жизнеспособность иммобилизованных клеток. Для наиболее надежной иммуноизоляции мембрана не должна пропускать компоненты, масса которых превышает 50–80 кДа. Имплантация микрокапсул осуществляется инъекционно.

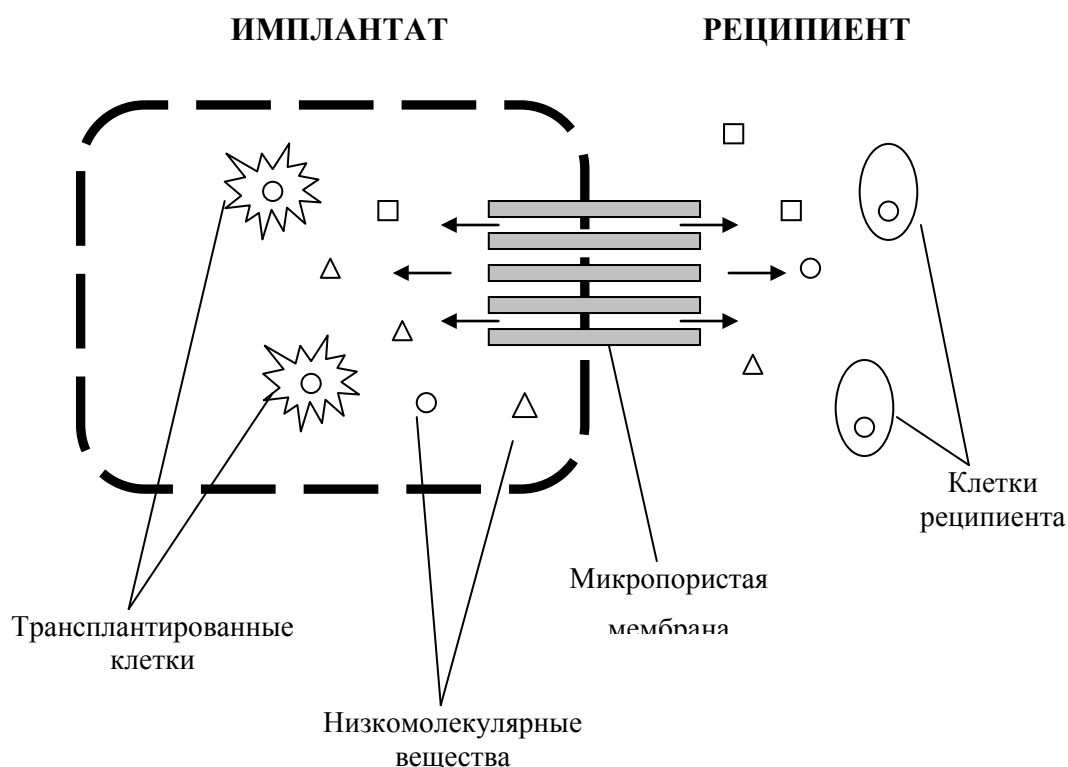


Рис. 2.16. Схема микрокапсулы [Волова, Севастьянов, Шишацкая, 2006]

Основным элементом экстра- и интраваскулярных диффузионных камер являются полые волокна или макрокапсулы. Входящие в состав таких матриц волокна имеют диаметр 200–1500 мкм и толщину стенок 10–300 мкм, что значительно превышает толщину мембраны в микрокапсулах, предел пропускания – 50–100 кДа. Экстра- и интраваскулярные матрицы на основе полых волокон имеют большую механическую целостность и про ч-

ность, чем микроинкапсуляционные матрицы. Это особенно важно в случае использования клеток с ограниченным временем жизни. Тем не менее макроинкапсуляционные матрицы имеют свойственные им недостатки, которые вытекают из диффузионных свойств. Клетки в макрокапсулах не могут существовать при высоких плотностях вследствие ограничений доставки газов и веществ в капсулу. Центр подобных клеточных скоплений становится некротическим. Кроме того, любые клеточные реакции, которые зависят от изменений окружающей среды (например, уровня глюкозы в крови), будут происходить с задержкой во времени, равной времени диффузии газов и веществ как внутрь капсулы, так и из нее, создавая задержку между стимулом и необходимым клеточным откликом.

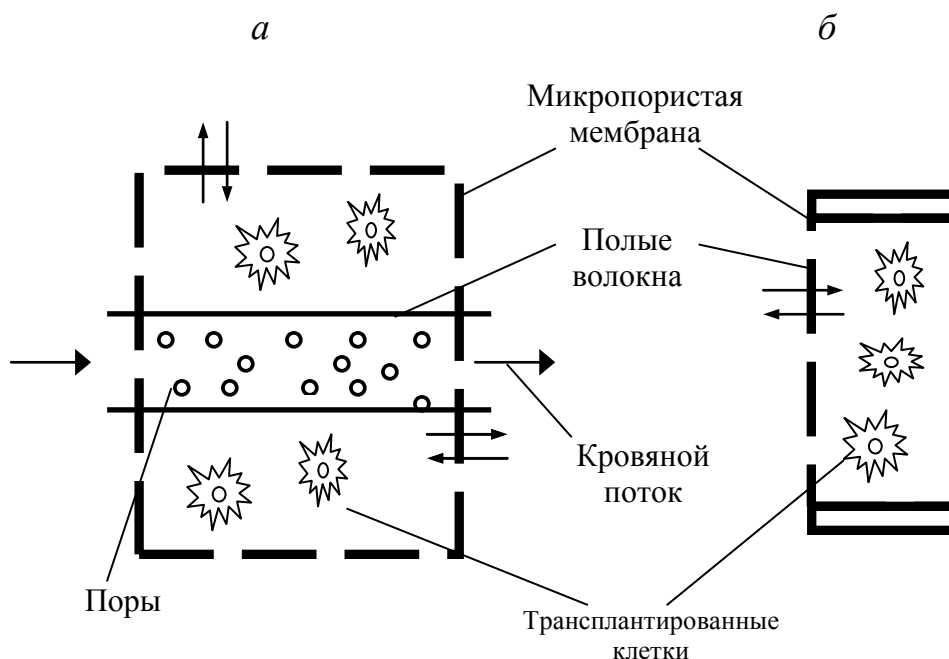


Рис. 2.17. Схема (а) интраваскулярных и (б) экстраваскулярных диффузионных камер на основе полых волокон [Волова, Севастьянов, Шишацкая, 2006]

Иммуноизолирующие матрицы и системы используют для иммобилизации различных типов клеток, включая клетки поджелудочной железы. Источником β -клеток при конструировании искусственной поджелудочной железы служат поджелудочная железа свиньи, крупного рогатого скота, кроликов, реже – ткани плодов человека и новорожденных. В качестве матриц для инкапсулирования клеток используют агарозу и ее производные, сульфат целлюлозы, полиакрилаты, полиэлектролитные комплексы сульфат альгината с поли-*L*-лизинном; полиэтиленгликоли. Для конструирования диффузионных камер применяют: пористые системы из сегментированных полиэфируретанов (СПУ) и блоксополимеров СПУ с силоксанами, полупроницаемые мембраны из полисахаридов, полупроницаемые мембраны на основе производных альгинатов, полупроницаемые мембраны из гидрогелей и их

сополимеров на основе полиакриламидов, поливинилового спирта и полиакрилонитрил-сульфат метисульфоната (гидрогель AN69). В настоящее время проводятся клинические испытания гибридной поджелудочной железы с использованием алло- β -клеток, а трансплантация островков поджелудочной железы с середины 70-х годов прошлого столетия в медицинских центрах Европы и США осуществлена нескольким сотням больных; у каждого десятого пациента достигнута инсулиннезависимость реципиентов в течение одной недели после начала функционирования гибридной системы.

2.3.8. Другие искусственные органы

Орган обоняния. Бионические органы обоняния, преобразующие запах в электронные сигналы, разработаны, однако они представляют собой функционирующие самостоятельно машины, а не искусственные части тела. Предназначены они для применения не в организме человека, а скорее имеют своей целью использоваться в качестве детекторов, в частности для контроля качества и свежести продуктов или установления соответствия партий химических веществ или парфюмерных изделий. На «нюхающем» детектируемом конце устройства вакуумный насос затягивает воздух, пропускаемый через пары термисторов, покрытых запахопоглощающим материалом. Когда происходит конденсация, температура на термисторе несколько повышается, отсылая электронный сигнал на компьютер. Используемые поглощающие материалы – это материалы, которые можно обнаружить в обонятельном эпителии носа, то есть жиры, белки и углеводы.

Гортань – это полый хрящ в верхней части трахеи. Гортань защищает трахею, предотвращая удушье при глотании; выступает в роли клапана, позволяющего нагнетать давление в легких, благодаря чему мы можем поднимать тяжелые предметы, а также создает голос за счет вибрации голосовых связок, после чего ротовой аппарат формирует слова. В результате онкологических заболеваний возникает необходимость удаления гортани и отвод трахеи к отверстию в шее (стоме) для дыхания. В этом случае речь возможна только с помощью мышц в пищеводе. Следует отметить, что только 15 % пациентов добиваются хорошей речи таким образом.

Для облегчения и улучшения качества речи после резекции гортани, применим Т-образный протез, например, марки «Blom-Singer». Протез представляет собой полый стержень, который соединяет трахею с пищеводом через отверстие, сделанное в задней части трахеи. Протез действует как клапан, пропускающий воздух в пищевод, но не позволяющий жидкостям и твердым веществам поступать в трахею. Перевернутая резиновая диафрагма запускает воздух при вдыхании и не допускает потерю воздуха через стому во время выдыхания, так что создаваемый пищеводом голос направляется в ротовую полость. Разработаны электронные варианты гортани, например, модель «Servox Inton». Конструкция включает вибрирующий электронный

звуковой источник, приводимый в действие нажимной кнопкой. Когда он плотно прижат к шее, то передает звук в ротовую полость. Этот звук может быть сформирован в речь, когда человек выговаривает слова. У данных устройств часто имеется вторая кнопка, способствующая выработке интонации.

Совершенствование устройств подобного типа сможет иметь электроды, имплантированные в мышцы горла, которые будут подсоединяться к мини-компьютеру. Электроды будут записывать сигналы мышц, предшествующие акту речи. Эти сигналы вначале потребуется нанести на график и далее интерпретировать разработчиками для программирования устройства.

Таким образом, видно, что развитие медицинского материаловедения и, в частности, совершенствование полимерных систем все шире позволяет в качестве альтернативы дефицитным трансплантатам применять искусственные эндопротезы и имплантаты. Биоискусственные системы должны сочетать в себе свойства живой и неживой ткани таким образом, чтобы при необходимости полностью или частично, временно или постоянно заменить функции тех или иных утраченных естественных органов. Наиболее известными примерами практического применения гибридных органов являются замещения функций поджелудочной железы, печени, пищевода, кровеносных сосудов и др. (табл. 2.6).

Таблица 2.6

Примеры биоискусственных (гибридных) органов и систем

Гибридный орган	Биологический компонент	Синтетический компонент
Искусственная поджелудочная железа	Островковые клетки	Полимерная капсула
Искусственная печень	Гепатоциты	Полимерная капсула
Искусственный пищевод	Клетки слизистой ткани	Силиконовая трубка
Искусственный протез кровеносного сосуда	Эндотелиальные клетки	Пористый политетрафторэтилен
Искусственный нейрон	Нейроны	Проводники
Искусственный хрящ	Хондроциты	Полимерная основа
Искусственные эритроциты	Гемоглобин	Полимерная капсула

Применение искусственных механических и биоискусственных имплантатов становится нормой. Каждый год от 4 до 5 млн «запасных» частей устанавливается в организмы людей, что позволяет существенно улучшить качество жизни или продлить ее.

2.4. Материалы для депонирования и контролируемой доставки лекарственных препаратов

Разработка систем контролируемой доставки лекарственных средств (СКДЛ) (в англоязычной литературе «drug delivery control», DDC) является наиболее перспективным и быстро развивающимся направлением в совре-

менной фармакологии. Главное достоинство этих систем заключается в возможности длительного и стационарного поддержания требуемого уровня лекарственного препарата в крови и/или тканях пациента на необходимый период времени. Это позволяет избегать высоких стартовых концентраций препарата и уменьшить число процедур. Успех конструирования СКДЛ во многом определяется наличием адекватного материала, используемого в качестве матрикса для депонирования лекарства. Такие материалы должны быть абсолютно безвредными для организма, иметь определенные физико-механические свойства, обладать биоразрушаемостью без образования токсичных продуктов, не инактивировать лекарственные препараты и смешиваться с ними в различных фазовых состояниях. Идеальная СКДЛ должна быть инертной, биосовместимой, механически прочной, с высоким содержанием лекарства, должны исключать возможность неконтролируемого высвобождения препарата, быть легко имплантируемой и извлекаемой, при этом не должна вызывать дискомфорт у пациента, просто изготавливаться и стерилизоваться.

В последние годы СКДЛ становятся все более совершенными. Помимо создания простых полимерных матриц с заданным профилем выхода препарата, разрабатываются системы, способные реагировать на изменения химической среды организма и, соответственно, изменять скорость поступления лекарства в кровь пациента. Создание СКДЛ актуально для целевой терапии, когда необходимо направленно доставлять лекарства к определенным органам и тканям. Контролируемая доставка применима для широкого круга лекарственных препаратов. На основе биodeградируемых носителей создаются лекарственные формы для снятия болей, антидепрессанты, контрацептивные препараты, противораковые и противовоспалительные препараты. Разработка лекарственных форм с заданными сроками выхода препарата позволяет также создавать вакцины с контролируемым выходом иммуногена. При этом исчезает необходимость в реиммунизации.

Применение различных материалов в качестве матрикса для депонирования препаратов позволяет варьировать скорость распада матрицы и, соответственно, управлять кинетикой выхода препарата. Например, показана возможность создания микрочипа на основе сополимеров полилактид/гликолидов, представляющего собой несколько резервуаров, поочередно высвобождающих содержащееся в них вещество. Подобный эффект может быть достигнут также при использовании смеси микросфер, изготовленных из полимеров разных типов с различной скоростью деградации.

2.4.1. Материалы и методы, применяемые для депонирования контролируемой доставкой лекарственных препаратов

При выборе материала для создания систем контролируемой доставки лекарственных средств руководствуются следующими соображениями: материал должен быть химически инертным, не иметь в своем составе выщелачи-

ваемых примесей, легко синтезироваться, а в случае гидролиза (или резорбции) не образовывать токсичных соединений. Это силикон, полиуретаны, полиэтилен, полиэтиленвинилацетат. Привлекаются давно применяемые в медицине материалы, разрабатываются новые полимеры, отвечающие требованиям, которые предъявляют к скорости распада и физическим характеристикам систем доставки. Необходимость использования биodeградируемых материалов для этой цели привела к активной разработке биоразрушаемых полимеров синтетического и природного происхождения, среди которых наибольшее развитие получили полиэферы: полилактиды, полилактидгликолиды, полиэтиленгликоль, полиангидриды, полиортоэферы, полисахара (крахмал, декстран, хитозан) и в последние годы – полигидроксиалканоаты.

Биodeградируемые носители лекарственных препаратов постепенно разрушаются в организме, при этом на скорость биodeградации полимерного матрикса и, соответственно, выход лекарственного вещества влияют многие факторы: химическая структура и состав; расположение мономеров, наличие ионных групп и случайных мономеров или дефектов в полимерной цепи, пространственная структура, молекулярный вес и распределение молекулярного веса, наличие низкомолекулярных включений, параметры процесса изготовления, стерилизация, условия хранения, форма и место имплантации, адсорбируемые и абсорбируемые включения (вода, липиды, ионы и т. д.), физико-химические факторы (ионный обмен, ионная сила, рН), физические факторы (изменения формы и размера, коэффициента диффузии, разрушение вследствие растворения или давления и т. д.), механизм гидролиза.

Многообразие материалов, используемых для получения СКДЛ, позволяет создавать системы для разнообразных лекарственных средств различных типов, среди них: пленки, спрессованные компакты в виде стержней и таблетированных форм, а также микрокапсулы, микросферы, наночастицы, липосомы, мицеллы. В большинстве случаев препарат в системе доставки находится в связанном виде – конъюгирован с макромолекулами полимера посредством химической связи, которая влияет на скорость высвобождения лекарства. В связи с этим чаще всего при депонировании препаратов используются химические последовательности небольшой длины, так называемые «спейсеры» (пояски). Связывание препарата с матрицей таким способом снижает вероятность повреждения его молекулярной структуры, иногда, однако, приводя к снижению биологической активности. Формы СКДЛ могут быть различными – в виде мицелл, микрочастиц, объемных конструкций в форме таблеток, которые можно имплантировать подкожно, внутримышечно, внутрибрюшинно, а также применять орально. Таблетированные формы могут быть покрыты дополнительными оболочками из полимера с целью регуляции скорости выхода препарата. Наиболее перспективными считаются СКДЛ на основе биodeградируемых микросфер и микрокапсул, которые обычно имеют размер от 10 до 1000 нм. Микрокапсулы отличаются от микросфер тем, что лекарство в них не диспергировано в матриксе, а находится как бы в резервуаре. Микрочастицы можно применять для создания лекарственных форм огромного спектра препаратов, с их помощью относительно

просто контролировать профиль выхода лекарства, они легко могут быть введены инъекцией в кровоток, подкожно или внутримышечно, адаптированы для орального применения или ингаляций. Препарат в микросферах либо связывается с полимерным матриксом, либо находится в свободном состоянии в порах конструкции. Выход препарата происходит за счет растворения матрикса в водной среде и в результате деградации биоразрушаемого полимерного матрикса. К микрочастицам также можно отнести и микролипосомы, представляющие собой высокоорганизованные липидные молекулы, которые образуют сферическую слоистую структуру, включающую в себя раствор, в котором они ресуспендированы.

Технология производства – это важный момент в процессе разработки СКДЛ. Основным требованием является простота реализации. Несмотря на многообразие методик, применяемых для получения микросфер, можно выделить несколько основных направлений.

К первой группе относят методики с применением растворителей, которые используются для создания полимерных пленок и микросфер. Лекарство добавляется к раствору полимера в виде водного раствора и формирует эмульсию или в сухом виде растворяется в том же растворителе, что и полимер. Далее из полученных растворов и/или эмульсий изготавливают пленки или микросферы. В процессе изготовления микросфер эмульсии предварительно гомогенизируют, перемешивая с помощью мешалок или используя ультразвуковую обработку.

Крупные трехмерные конструкции (стержни и таблетированные формы) изготавливают методом холодного или горячего прессования, а также экструзией из расплавов. Первый метод наиболее прост в применении и заключается в создании заданной формы матрицы из гомогенизированного с лекарственным препаратом измельченного полимера с использованием пресса. При горячем прессовании полимер, смешанный с термостабильным лекарством, размягчается под воздействием температуры, более высокой, чем температура стеклования полимера, но достаточно низкой, чтобы не вызвать деструкции лекарственного препарата; форма фиксируется высоким давлением. Может быть применена обратная последовательность операций – вначале прессование, а уже потом воздействие температурой. При этом частицы полимера не только спрессовываются, но и спекаются между собой, образуя прочную трехмерную конструкцию.

Метод экструзии из расплавов заключается в непрерывном выдавливании размягченного полимерного материала через отверстия определенного сечения. Данный метод используется при создании лекарственных форм в виде пленок, волокон, нагруженных лекарством. При диспергировании лекарства в расплаве создается истинный молекулярный раствор. Это решает проблему создания СКДЛ на основе препаратов с плохой растворимостью. Наиболее распространенные способы смешения препарата с полимерным матриксом – диспергирование в расплаве, внесение посредством аэрозольной сушки, со-испарение, со-осаждение и со-измельчение. Диспергирование в расплавах может быть использовано в создании комплексов с неустойчи-

выми молекулами, такими как пептиды и белки для их стабилизации.

При создании СКДЛ, у которых на поверхности полимерной матрицы формируют специфические лиганды, используют различные стратегии, выбор которых зависит от того, происходит ли связывание до или после сборки препарата с носителем. Главной целью любого из подходов является достижение максимальной эффективности связывания с сохранением лигандом максимального сродства к его рецептору. Присоединение лиганда к уже готовой матрице требует наличия в составе полимера функциональных терминальных групп, сохраняющих свою активность в процессе изготовления носителя. Подобная стратегия подходит, например, для связывания моноклональных антител. Аналогичные методы используют и при создании матриц с «пришитыми» к ним лекарственными препаратами.

Кроме создания СКДЛ в виде имплантируемых матриц, возможно получение полимерной конструкции *in situ*. Эта методика основана на способности ряда полимеров, например полилактидов, спонтанно образовывать твердотельные формы при введении раствора полимера в воду. Сначала полимер растворяется в фармакологически приемлемом растворителе (N-метил-1,2-пирролидон или бензоил бензоат); после добавления к раствору соответствующего лекарственного препарата полученная смесь вводится инъекцией подкожно или внутримышечно. Многообразие из существующих методов изготовления СКДЛ указывает на продолжающийся поиск в этом направлении исследований. В зависимости от целей и области применения пролонгированных лекарственных препаратов возможно варьирование как собственно метода изготовления СКДЛ, так и используемого в качестве матрикса материала.

Контролируемая доставка препаратов остро востребована при различных, в том числе длительно текущих и системных заболеваниях. Особенно актуальны СКДЛ на основе биodeградируемых полимерных матриц для депонирования противовоспалительных и противоопухолевых препаратов, анальгетиков, антидепрессантов, контрацептивов и др. Существует мнение, что введение противоопухолевых препаратов длительного действия в опухоль с последующим хирургическим удалением не только может повысить эффективность действия лекарства, но и снизить токсический эффект, проявляющийся при внутривенном введении, используемом в традиционной химиотерапии. Описаны нагруженные цитостатическим препаратом (пакситакселем) полиангидридные диски, имплантированные в полость опухоли мозга крысам. В ходе эксперимента было замечено значительное увеличение концентрации препарата в тканях мозга и увеличение средней продолжительности жизни подопытных животных. В клинических условиях описано заметное снижение массы опухоли мозга пациентов при введении в полость опухоли полимерного имплантата, содержащего пакситаксель.

В связи с тем, что противоопухолевые препараты вызывают сильные токсические побочные эффекты, действуя одновременно на больные и на здоровые клетки, активно разрабатываются СКДЛ для целевой противораковой терапии на основе микрочастиц. Подобные системы способны специфич-

чески связываться с раковыми клетками за счет присутствующих на их поверхности лигандов и обеспечивать адресную терапию. При этом повышается доступность препарата на фоне снижения общей дозы, необходимой для подавления роста раковых клеток, сглаживаются побочные эффекты.

СКДЛ востребованы для лечения длительно текущих инфицированных костных тканей. Показана перспективность биодеградируемых имплантатов, несущих антибиотики в лечении хронических и имплантатассоциированных остеомиелитов для подавления стафилококковой инфекции. Для лечения ожогов и трудно заживаемых кожных ран разрабатываются различные типы полимерных пленок, содержащих антимикробные и противовоспалительные препараты. В настоящее время активно разрабатываются полимерные матрицы в виде пленок, в состав которых входят лекарственные препараты и ростовые факторы применительно к клеточной и тканевой терапии. Подобные конструкции могут быть использованы как оболочки кровеносных сосудов для предотвращения рестенозов. Возможность терапии поражений нервной системы с использованием СКДЛ также привлекает внимание исследователей. В работе полилактидные микросферы, содержащие нейротрофический фактор, были имплантированы крысам с болезнью Паркинсона; в эксперименте зафиксирована не только регенерация клеток мозга, но и функциональное улучшение животных.

Разработка лекарственных форм с заданными сроками выхода препарата позволяет создавать вакцины с контролируемым выходом иммуногена. При их применении исчезает необходимость в реиммунизации. Предполагается, что пульсовый характер выхода антигена из полимерной матрицы имитирует повторный ввод вакцины. Варьированием мономерного состава полимера и его молекулярной массы можно добиться широкого спектра скоростей распада компонентов имплантата. Даже при отсутствии пульсового характера высвобождения антигена, пролонгирование его выхода повышает эффективность иммунизации.

Использование СКДЛ в лечении сахарного диабета также является шагом вперед в развитии фармакологии. Большинство систем, исследуемых в качестве носителей для инсулина, основаны на взаимодействии глюкозы крови с глюкозооксидазой, иммобилизованной на поверхности полимера в составе матрицы. Глюкоза/глюкоз-оксидазная реакция приводит к понижению рН вокруг системы, вследствие чего ускоряется распад полимерной матрицы и поступление в кровь инсулина.

Контрацептивные СКДЛ могут быть эффективно использованы как в медицине, так и в ветеринарии. Вагинальные кольца из полиэтилен/винилацетата обеспечивают стабильный гормональный фон на протяжении десятков суток. На основе этой технологии создана система пролонгированного действия «NuvaRing®». Для контроля размножения животных разрабатываются полилактидные микросферы и имплантаты, содержащие аналоги гонадотропин-стимулирующего гормона.

Многообразие возможных вариантов строения СКДЛ открывает широкие перспективы в лечении различных заболеваний. Использование для этой

цели биodeградируемых материалов значительно увеличивает перспективность данного направления. Развитие этого нового направления в фармакологии и совершенствование лекарственных систем позволит до минимума снизить стрессовое воздействие терапии на пациента и упростит процедуру лечения.

2.4.2. Применение полигидроксиалканоатов в качестве матриц для конструирования систем контролируемой доставки лекарственных препаратов

Полигидроксиалканоаты являются перспективным материалом для создания СКДЛ, так как соответствуют многим требованиям, предъявляемым к материалам для данных систем. Эти полимеры биосовместимы и инертны по отношению к животным тканям, в биологических средах разрушаются до конечных продуктов (CO_2 и H_2O). В отличие от других, широко используемых в контролируемой доставке лекарств, материалов, таких как желатин, протеины, полилактид и поли(этиленгликоль)-поли(D,L-лактид), ПГА можно получить в химически чистом виде, и они могут деградировать в биологических средах с регулируемой скоростью. Применение ПГА в контролируемой доставке лекарств может быть реализовано также созданием различных смесей на его основе с другими быстродеградируемыми биосовместимыми материалами. Используя смеси ПГА с различными материалами, можно управлять пористостью, темпом деградации, а соответственно, и скоростью выхода препарата из полимерной матрицы.

Разработка различных систем доставки лекарств на основе ПГА начата в конце 1980-х годов. На первых этапах полигидроксибутират был исследован в качестве матрицы для приготовления пролонгированных форм препаратов в виде прессованных таблеток на примере 7-гидроксиэтилэфиллина (ГЭФ); экспериментах *in vitro* и *in vivo* кинетика высвобождения лекарства была линейной, скорость высвобождения препарата зависела от соотношения «ПГБ/лекарство» и увеличивалась с уменьшением доли полимера. При нагруженности формы ГЭФ на 60–80 % ГЭФ за 24 ч экспозиции препарат практически полностью выходил в среду; при меньшей величине включения (5–30 %) выход препарата продлевался до 50 ч. Было зафиксировано, что скорость выхода препарата из полимерной матрицы *in vivo* при имплантации подкожно в шейную складку самкам мыши ниже по сравнению с системами *in vitro*. Это, вероятно, вызвано малым объемом жидкости, в котором происходил выход препарата в эксперименте *in vivo*. Далее авторы изучили влияние молекулярной массы ПГБ на кинетику высвобождения лекарства и установили, что с увеличением молекулярной массы полимера от 3 000 до 600 000 Да высвобождение препарата из прессованных таблеток возрастало.

Показана возможность создания на основе ПГБ пролонгированных форм кофеина, высокомолекулярных пептидных и гормональных средств с контролируемой скоростью высвобождения препаратов. Сравнительное

исследование сополимера ПГБ/ПГВ показало, что с уменьшением доли гидроксивалерата скорость высвобождения препарата усиливается. Это, вероятно, связано со следующим: чем меньше в сополимере гидроксивалерата, тем более рыхлыми получаются таблетки в процессе прессования и, значит, более проницаемыми для жидкостей. Есть информация о положительных результатах применения прессованных компактов из ПГБ для пролонгированной доставки метохлорамида при подкожной имплантации крупному рогатому скоту; выход препарата составил 12 мг/день. Описана эффективность данной лекарственной формы для профилактики токсикоза, вызываемого овсянкой у скота при выпасе его на полях, где она произрастает.

Исследование систем контролируемой доставки препаратов в виде таблетированных форм, изготовленных из полигидроксибутирата, проведено в Институте биофизики СО РАН. Были получены формы в виде таблетки, нагруженной рубомицином. В работе использовали фармацевтический препарат даунорубимина (рубомицин гидрохлорид, ФАО «Фарейн»). Выбор препарата обусловлен востребованностью в клинической практике, простотой детектирования, растворимостью в воде и растворителях. Последнее позволяет использовать для разработки лекарственной формы рубомицина, помимо твердофазных систем, растворы и эмульсии препарата. В качестве полимерного носителя исследован полимер β -гидроксимасляной кислоты. При нагружении таблеток антибиотиком рубомицином в связи с его токсичностью были получены двухслойные таблетки, которые готовили из смесей полимера с лекарственным препаратом методом холодного прессования на гидравлическом прессе. Таблетки диаметром 6 мм имели сердцевину из ПГБ диаметром 3 мм содержащую рубомицин и пористую оболочку из того же полимера (рис. 2.18). Пористую оболочку получали, добавляя к навеске полимера $\frac{1}{2}$ от его объема кристаллы NaCl. Из готовых таблеток соль удаляли экспозицией последних в физиологическом растворе в течение 10–12 ч.

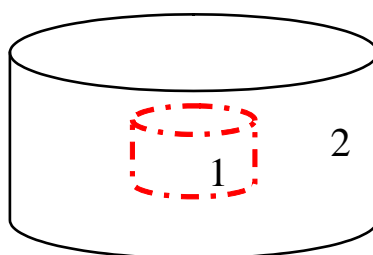


Рис. 2.18. Схематичное изображение двухслойной таблетки:
1 – сердцевина, содержащая рубомицин, 2 – пористая оболочка

Кинетику выхода рубомицина из полимерного матрикса изучали *in vitro*. Для этого таблетки помещали в стеклянные флаконы из темного стекла объемом 200 мм, которые наполовину были заполнены средой (0,9 %-ный раствор NaCl). Флаконы размещали в термостате при 37,7 °С. Через определенные промежутки времени (в начальный период через 6–12 ч, далее в течение 1–2-х недель – ежедневно, затем – еженедельно) определяли количество

рубомидин в физиологическом растворе. Главный вопрос, на который предстояло ответить на данном, начальном, этапе, заключался в следующем: какой будет динамика выхода рубомидина из разработанной лекарственной формы в зависимости от нагруженности препаратом и будет ли иметь место резкий выход препарата в начальный период эксперимента? Получены такие результаты: при высокой нагруженности таблеток рубомидином (от 40 % и выше) с увеличением концентрации рубомидина время его выхода сокращалось и составляло от десятков до сотен часов. Вследствие высокой концентрации в форме водорастворимого препарата выход его происходил, главным образом, за счет растворения в среде. При снижении содержания препарата в форме до 20 % и менее его выход в раствор происходил существенно медленнее и исчислялся десятками суток. В этом варианте выход препарата в раствор происходил не только за счет простого растворения с поверхности таблетки, но и в результате диффузии. В результате этого, время выхода препарата существенно возросло. Так, в течение 60 суток наблюдения при содержании рубомидина в таблетке, равным 20 %, в раствор вышло практически 100 % препарата; при 15 % – около 75 %; при 12 % – около 60 %. Профили выхода рубомидина в раствор при его низком содержании в форме (1, 2 и 3 %) имели вид, характерный для диффузионного процесса. При этом с поверхности таблетки растворялась лишь незначительная часть препарата, а большая его часть высвобождалась в результате диффузии. В течение наблюдаемого периода диффузионный выход препарата был прямо пропорционален его концентрации в форме.

Экспериментальная форма пролонгированного рубомидина исследована в эксперименте на лабораторных животных. Двухслойные таблетки под ингаляционным наркозом были имплантированы внутрибрюшинно лабораторным белым мышам линии Balb/c. В асептических условиях экспериментальные лекарственные формы в виде двухслойной таблетки были помещены внутрь брюшной полости белых мышей. Для введения таблеток производили нижний срединный разрез кожи живота и брюшины и пинцетом размещали таблетку справа от разреза. Таблетку предварительно увлажняли в стерильном физиологическом растворе. Рану ушивали послойно шелком. В ходе опыта периодически по три животных выводили из эксперимента передозировкой ингаляционного наркоза. Из отобранных проб крови экстрагировали рубомидин и определяли его концентрацию на спектрофлуориметре Aminco (Thermo Spectronic, США). Общего токсического эффекта при имплантации лабораторным животным экспериментальных форм рубомидина не отмечено. Поведение, рост и развитие животных в опытной группе не отличалось от контрольной. Рубомидин детектировался в крови животных в ходе всего эксперимента. В течение первых пяти суток концентрация препарата в крови постепенно возрастала от 0,5 до 2,0 нг/мл. Далее динамика концентрации препарата в крови носила колебательный характер, сохраняясь при этом в течение 10 суток в диапазоне 1,7–2,3 нг/мл. В ходе эксперимента авторы не ставили целью учет выведения препарата из организма. Первый пик концентрации, скорее всего, связан с растворением и вымыванием препарата с по-

верхности сердцевинной части формы и его оттоком через микропоры наружного пористого слоя. Второе нарастание концентрации рубомицина в крови животных, начавшееся с седьмых суток эксперимента, связано с деградацией пористой наружной оболочки и полимерного матрикса сердцевинной таблетки, а также высвобождением и диффузией препарата.

В ходе опыта вокруг имплантированной формы отмечено формирование тонкой капсулы из соединительной ткани (рис. 2.19).

Поверхность имплантатов в ходе эксперимента в результате деградации полимера становилась все более шероховатой; появлялись трещины, крупные поры и лакуны (рис. 2.20).

Эти результаты показали, что ПГА пригодны в качестве биodeградируемого матрикса в виде прессованных форм для создания лекарственных препаратов длительного действия.

Возможен другой способ доставки лекарственных препаратов, включенных в полимерный матрикс в виде пленок. Методом полива из расплавов ПГА получены пленки, содержащие метиленовый красный в качестве модельного низкомолекулярного препарата. Скорость выхода препарата из ПГА матриц была заметно ниже, чем из сополимерных пленок. Морфология пленок зависела от температуры, при которой происходила кристаллизация полимера. При низких температурах число ядер кристаллизации было больше, так что конечный продукт состоял из множества сферолитов. Высокая температура приводила к выпадению метиленового красного из смеси, вследствие чего начальный пиковый выброс при экспозиции пленки в буфере был более выражен. Добавление к высококристаллическим ПГА наполнителей позволяет получать более эффективные пленочные лекарственные формы. Описаны эластичные и достаточно прочные пленки из смеси сополимера ПГБ/ПГВ, наполненные лекарственными препаратами. Показана возможность функционирования таких пленок в системах *in vitro* на сроке до двух месяцев.

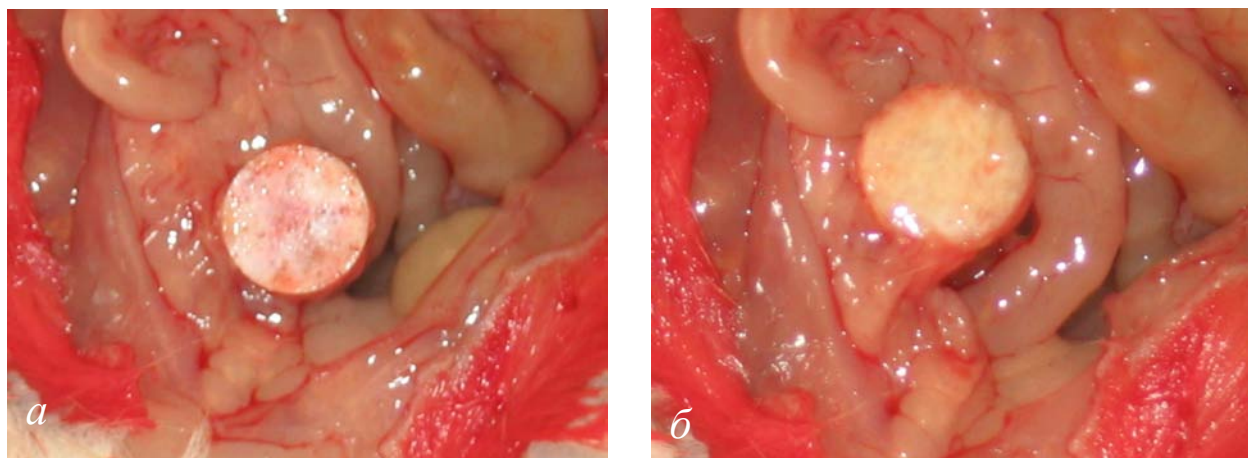


Рис. 2.19. Внешний вид экспериментальной формы пролонгированного рубомицина в брюшной полости мыши: третьи (а) и 10-е сутки (б) эксперимента (материал и фото Е. И. Шишацкой)

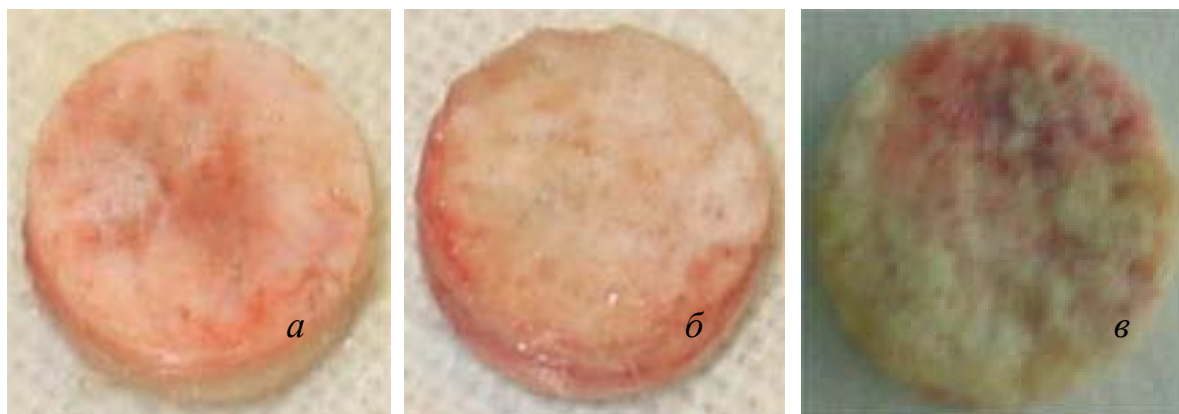


Рис. 2.20. Внешний вид полимерных таблеток с рубомицином после имплантации лабораторным животным на разных сроках эксперимента: 3 (а), 6 (б) и 10 (в) суток (материал и фото Е. И. Шишацкой)

В связи с активно развивающимся в настоящее время новым направлением в фармакологии – микроинкапсулированием, к ПГА, подверженным переработке различными методами из различных фазовых состояний и деградируемым в биологических средах, возник большой интерес. Следует отметить, что первые способы инкапсулирования растворимых пептидов в микрокапсулы из полигидроксибутирата, а также его композитов с полилактидами были запатентованы во второй половине 1980-х гг. Микрочастицы (микрошферы) являются одной из наиболее перспективных систем контролируемой и долговременной доставки лекарств. В настоящее время в литературе описывается большое число работ, посвященных методикам их изготовления. Процесс испарения растворителя нашел широкое применение в качестве одного из основных методов получения микрошфер из биоразрушаемых полимеров. Особое внимание уделяется микрошферам резервуарного типа, способным нести в себе высокомолекулярные соединения и обладающих высокой пористостью. Для изготовления таких конструкций, как правило, применяется метод испарения растворителя из двух- или трехкомпонентной эмульсии. Для цельнотельных микрошфер используют однокомпонентные системы. Впервые метод выпаривания растворителя из эмульсии «вода-в-масле-в-воде» (В/М/В) для изготовления биоразрушаемых ПГБ/ПГВ микрошфер был предложен Биссери в 1983 г. В литературе представлено описание методов получения микрошфер из ПГА с использованием эмульсий «масло-в-масле» (М/М) и «масло-в-воде» (М/В). Характеристики микрошфер, получаемых методом испарения растворителя из эмульсии, зависят как от свойств самого полимера, так и от параметров процесса изготовления. Выбор концентрации полимера в растворе и соотношения других компонентов, а также параметров процесса может сказаться не только на свойствах микрошфер, но и на самой возможности их формирования. В качестве компонентов эмульсии для метода В/М/В чаще всего используются системы, содержащие водный раствор желатина, раствор полимера в органическом растворителе (хлороформе, дихлорметане, трихлорметане) и раствор поверхностно активного вещества (ПАВ) (поливинилового спирта, ПВА; полиэтиленгликоля, ПЭГ

и др.). Водно-масляную эмульсию из раствора желатина и раствора полимера после интенсивного перемешивания охлаждают и добавляют к раствору ПАВ. Далее, в течение нескольких часов эмульсию механически перемешивают; полученные микросферы собирают, отмывают и высушивают в вакууме. Соотношение компонентов эмульсии, концентрация используемых растворов, скорость и продолжительность перемешивания, температура среды могут варьировать. Наряду с перемешиванием эмульсии с помощью пропеллера, для формирования микрокапсул возможно применение ультразвука. Наиболее важными характеристиками микросфер как систем контролируемой доставки лекарств являются их размер, включение препарата, пористость матрикса, которые определяют кинетику и скорость выхода препарата. Принято считать, что микросферы малого размера (до 2 мкм) наиболее пригодны для клинической практики. Имеющиеся данные по динамике выхода препарата в зависимости от нагруженности микросфер противоречивы. Существуют данные как о снижении скорости выхода с увеличением содержания препарата, так и о противоположных результатах. Анализ литературы позволяет заключить, что пока не представляется возможным прийти к единому мнению относительно взаимосвязи между всеми параметрами процесса и свойствами микрочастиц. Однако, несмотря на сложность интерпретации полученных в описанных работах данных, дальнейшие исследования по вопросу управления свойствами микросфер актуальны. Спектр морфологических характеристик микросфер, получаемых различными методами, открывает широчайшие возможности, в особенности для внедрения микросфер резервуарного типа в качестве долговременных систем контролируемой доставки лекарств.

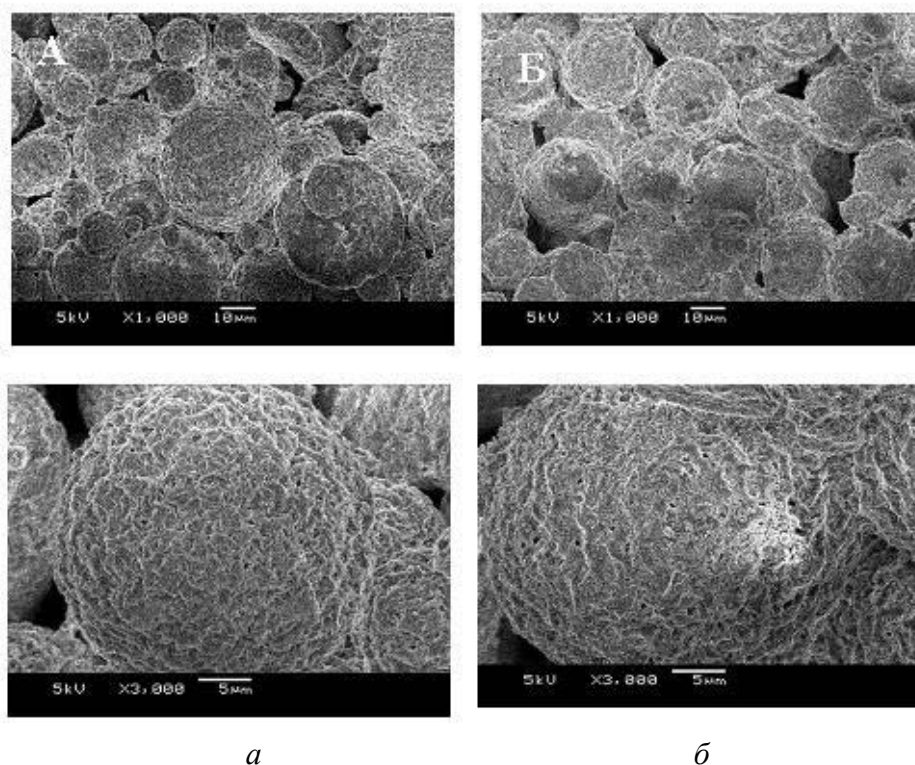


Рис. 2.21. Микрофотографии микросфер, полученных из полигидроксibuтирата (а) и сополимера гидроксibuтирата с гидроксивалератом (б)

К настоящему моменту описаны вполне удачные примеры депонирования препаратов в матриксы в виде микрочастиц из ПГА. Показана возможность депонирования антибиотиков и противоопухолевых препаратов. В Институте биофизики СО РАН сконструированы полимерные формы в виде пленок, таблеток и микрочастиц, нагруженные препаратами (гемоглобин, шиконин, антибиотики, антипролиферативные препараты); исследована кинетика ликвидации препаратов в биологических средах и динамика разрушения полимерного матрикса. Наиболее перспективной формой приняты полимерные микрочастицы диаметром от 0,5 до 5,0 мкм ([рис. 2.21](#)), пригодные для длительного, (до 12 недель) функционирования *in vivo* при различных способах введения (внутримышечно, внутрибрюшинно, внутривенно).

Исследована реакция тканей на имплантацию полимерных микрочастиц из полигидроксibuтирата и показано, что она характеризуется незначительной по силе воспалительной реакцией, выраженной и нарастающей во времени макрофагальной инфильтрацией с присутствием моно- и многоядерных гигантских клеток инородных тел, резорбирующих полимерный матрикс. Образования фиброзных капсул вокруг полимерных микрочастиц, а также некротических и других неблагоприятных морфологических изменений и перестроек тканей на имплантацию микрочастиц из ПГБ не зафиксировано.

На примере рубомицина гидрохлорида получена экспериментальная форма пролонгированного цитостатического препарата в виде микрочастиц. В эксперименте на лабораторных животных при однократном введении микросфер внутрибрюшинно показана возможность поддержания концентрации препарата в крови и перитонеальной жидкости длительное время (до 10 суток). Лекарственная эффективность микрочастиц из ПГА, нагруженных рубомицином, продемонстрирована на лабораторных мышах с привитой асцитной карциномой Эрлиха (АКЭ) в 100 %-но летальной дозе (3×10^6 /животное). Установлено, что экспериментальная лекарственная форма рубомицина гидрохлорида, депонированного в матрикс из ПГА в виде микросфер, при внутрибрюшинном введении оказывает выраженный антипролиферативный эффект по отношению к АКЭ и значительно (до 40 %) снижает смертность мышей-опухоленосителей.

Микросферы, изготовленные из ПГБ методом испарения растворителя из эмульсии и содержащие контрацептивный препарат левоноргестерол, показали эффективность применения в эксперименте на лабораторных животных. При имплантации внутримышечно мышам микросфер, изготовленных из ПГБ и нагруженных препаратом (дозы 1,92 и 3,84 мг/мышь), контрацептивный эффект зафиксирован на сроке до 60 суток по сравнению со сроком действия лекарственной формы препарата, заключенного в капсулу (35 суток). Применимость микросфер из ПГБ, содержащих анестезирующий препарат трамадол, показана для снятия постоперационных болей в эксперименте на крысах. Микросферы вводили через эпидуральный катетер. Эффект проверяли болевым тестом на термическое раздражение (вода, 52,5 °С). Срок действия трамадола, включенного в микросферы, увеличился с 4 до 21 ч по

сравнению с традиционным эпидуральным введением.

Показана возможность использования ПГБ для приготовления оральных лекарственных систем с целью доставки вакцин, способных защищать антигены вакцин от перевариваемости в желудке. Проведено испытание микросфер диаметром менее 10 мкм, содержащих кумарин, *in vivo* в опыте на мышцах при однократном оральном введении. Результаты показали хорошую абсорбцию микросфер в Пейеровых бляшках спустя 48 ч после потребления. Описано использование сополимера ПГБ/ПГВ для изготовления микросфер с включением тетрациклина и его гидрохлорида для лечения периодонтитов; в зависимости от соотношения полимера и антибиотика удавалось пролонгировать доставку препарата до 100 ч. При этом обнаружено, что изменение молекулярной массы полимера могло влиять на кинетику выхода антибиотика. Полигидроксibuтират и его смеси с рифампицином в экспериментах на собаках оценены в качестве носителей для изготовления эмболов почечных артерий. Полученные ангиограммы до и после эмболизации показали, что введение микросфер диаметром от 120 до 200 мкм в количестве 10 мг/животное обеспечивало замедление кровотока в почечных артериях с последующей частичной окклюзией прекапилляров. После второй инъекции микросфер была достигнута полная эмболизация. Гистологические исследования тканей почек выявили наличие обструкции почечной артерии и блокирование доставки крови к почке.

Можно констатировать эффективность применения ПГА в качестве матрикса для микроинкапсулирования и создания пролонгированных лекарственных средств. По мнению ряда авторов, будущее ПГА – в пролонгированной доставке высокомолекулярных лекарств, которые применяются длительно и в малых дозах. В этом случае, управляя скоростью разрушения полимерного матрикса, можно будет регулировать скорость выхода препарата. Для этого можно применять различные типы ПГА, имеющие различные скорости деградации в биологических средах, а также использовать ПГА в смесях с различными, в том числе более быстро деградируемыми полимерами. Безусловной проблемой в использовании ПГА из расплавов является достаточно высокая температура плавления, например, ПГБ и ПГБ/ПГВ, которая может приводить к деградации лекарства. Однако привлечение для этих целей среднецепочечных полимеров (например, сополимеров гидроксигексаноата и гидроксioктаноата), которые имеют значительно меньшую температуру плавления, может стать условием для развития контролируемой доставки термоллабильных лекарственных средств.

ГЛАВА 3. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МАТЕРИАЛОВ БИМЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Любой материал, предназначенный для биомедицинских целей, прежде всего должен характеризоваться безвредностью для организма и функциональностью. Комплекс необходимых механо-физических и биосовместимых свойств, которыми должны обладать полимеры медицинского назначения, достаточно широко варьирует в зависимости от конкретных функций или материала, места его имплантации, сроков службы и др. [1].

По отношению к организму имплантируемый материал должен отвечать следующим основным требованиям:

- не вызывать отравления организма и не быть аллергеном,
- не травмировать живую ткань,
- не быть канцерогенным,
- не вызывать антигенного действия,
- не вызывать деструкции и разложения белков и ферментов,
- не нарушать электролитный баланс,
- не вызывать отклонений в системах метаболизма.

Биосовместимые материалы, предназначенные для контакта с кровью, выделяют в группу *гемосовместимых материалов*, то есть материалов, совместимых с кровью. Необходимо подчеркнуть, что все гемосовместимые материалы являются биосовместимыми, но не каждый биосовместимый материал можно использовать для контакта с кровью. Так, биосовместимость металлокерамики или сплавов, используемых для изготовления штифтов, ортопедических или стоматологических протезов, не означает, что эти материалы не будут, например, провоцировать изменения клеточного состава крови.

Гемосовместимые медицинские изделия не должны:

- оказывать токсического, аллергического и воспалительного действия;
- активировать ферментные системы (свертывающую, фибринолитическую, систему комплемента);
- оказывать отрицательное действие на белковые и форменные элементы крови, а также органы и ткани;
- вызывать антигенный и канцерогенный ответ;
- вызывать отклонения в системе метаболизма;
- провоцировать развитие инфекции;
- нарушать электролитический баланс;
- изменять свои медико-технические свойства в процессе нежелательной кальцификации и (или) биодеградации.

К характерным и наиболее ярким признакам отсутствия гемосовместимости медицинских изделий относится появление тромбов и тромбоэмболий, индуцированных их поверхностью. В связи с этим иногда термин «гемосов-

местимые» изделия (материалы, покрытия) заменяют на термин «тромборезистентные» («атромбогенные»), а вместо выражения «не гемосовместимые» изделия используют термин «тромбогенные», что не служит корректной заменой. Далее будет показано, что не существует строгого соответствия между характером реакций различных компонентов крови на инородное тело. При отсутствии, например, признаков активации свертывающей системы крови (свойство тромборезистентной – атромбогенной поверхности) могут наблюдаться активация системы комплемента или реакция нейтрофилов. Следовательно, тромборезистентность – только один из признаков гемосовместимости изделия, контактирующего с кровью, который определяется характером его взаимодействия с организмом человека на молекулярном, клеточном и системном уровнях.

Сформировавшееся мультидисциплинарное направление биоматериаловедения и трансплантологии – тканевая инженерия, остро нуждается в специализированных биосовместимых материалах. Тканевая инженерия ориентирована на создание конструкций, обеспечивающих восстановление, укрепление и улучшение функций тканей. Существуют несколько подходов к использованию полимерно-тканевых конструкций – это инфузия выделенных клеток, создание тканево-индуцирующих материалов и имплантация и культивирование клеток на подложке – модели биоимплантата. Материалы, применяемые в тканевой инженерии, строго должны обладать спектром специальных свойств. Прежде всего, продукты деградации конструкции не должны быть токсичными, конструкция должна сохранять свою форму и обладать достаточной прочностью до тех пор, пока новая ткань организма-хозяина в месте имплантации полностью не восстановится; материал, применяемый для изготовления конструкции, не должен быть иммуногенным, он должен поддерживать рост клеток и организацию их в ткань, в свою очередь, сам имплантат должен беспрепятственно отводить продукты обмена клеток.

Материал под воздействием организма не должен:

поддаваться механическому разрушению и истиранию,
менять структуру и конфигурацию поверхности,
химически трансформироваться и разлагаться,
адсорбироваться и седиментироваться,
экстрагироваться.

Материалы, отвечающие всем этим требованиям, к сожалению, пока не созданы. Тем не менее последовательное изучение позволит в конце концов получить материалы, биосовместимые в буквальном смысле. Однако для создания и освоения новых полифункциональных и биосовместимых материалов необходимо знание и понимание механизмов взаимодействия материала с организмом на молекулярном уровне.

Поэтому основополагающей задачей биоматериаловедения является необходимость изучения молекулярной совместимости материала с биологическими структурами организма. При этом необходимо ответить на следующие вопросы: 1) какие материалы, 2) под действием каких факторов, 3) каким образом изменяются *in vivo*.

3.1. Система методов и тестов, применяемая в биомедицинском материаловедении

По отношению к изделиям из полимерных материалов, используемых в современной медицине, установлен ряд критериев, необходимых для контроля с точки зрения их биологической безопасности. Первоочередным при этом является комплекс исследований физико-химических свойств материала; далее переходят к биологическим испытаниям материала и экстрактов материала в системах *in vitro* и *in vivo*. При этом первоначальный скрининг проводится *in vitro* и *ex vivo*, затем выполняется комплекс острых и хронических тестов *in vivo* и только после этого приступают к клиническим испытаниям. В настоящее время документом, регламентирующим исследования такого рода в США, России и ряде зарубежных стран, является международный стандарт ИСО 10993 (Standards for Biological Evaluation, 1993). В общем виде система тестов ИСО 10993 включает серию последовательных стадий, различающихся как методами, так и объектами исследований ([табл. 3.1](#)).

Таблица 3.1

Программа испытаний медицинских изделий по стандарту ИСО 10993

Стадия	Содержание
I стадия. Характеристика и тестирование исходного сырья	Экспресс-оценка химических, физических и биологических (цитотоксичность, гемолиз <i>in vitro</i>) до и после технологических операций (прессование, экструзия и пр.)
II стадия. Исследование биосовместимых свойств компонентов изделий	Оценка биологической безопасности отдельных составляющих изделия
III стадия. Оценка качества и эффективности контроля на производстве	Аттестация производственных помещений (оценивается система контроля исходного сырья и конечного продукта)
IV стадия. Контроль качества конечного продукта	Контроль исходного сырья и конечного продукта на соответствие паспортным данным и требуемым медико-техническим свойствам.

В России для исследования биологических свойств медицинских изделий и материалов действуют также рекомендации Минздрава РФ [8; 9].

3.1.1. Физические и физико-химические методы исследования полимеров биомедицинского назначения

Свойства полимерных материалов определяются их химической структурой, макро- и молекулярной структурой. Изучение базовых свойств полимеров проводится с применением комплекса физических и физико-химических методов, включая спектроскопию, рентгеноструктурный анализ, дифференциальный термический анализ, электронную микроскопию и др.

Инфракрасная (ИК) спектроскопия – один из методов оптического спектрального анализа, основанный на способности вещества избирательно взаимодействовать с электромагнитным излучением с поглощением энергии в инфракрасной области спектра. Инфракрасная область – это длинноволновая часть спектра с длинами волн от 0,75 до 1000 мкм, которая делится на ближнюю (0,75–2,5 мкм), среднюю (2,5–50 мкм) и дальнюю (50–1000 мкм) области. Обычно в ИК-спектроскопии используют не длину волны, а волновые числа $\tilde{\nu}$ (см⁻¹), которые определяют число волн λ_0 (в вакууме), укладываемых в 1 см: $\nu = 1/\lambda_0$. Произведение волнового числа и множителя C , равного скорости света в вакууме ($C \approx 3 \cdot 10^{10}$ см/с), представляет собой частоту волны: $\nu = \tilde{\nu} \cdot C$. В практике спектрального анализа волновое число принято для краткости называть частотой и обозначать его ν вместо $\tilde{\nu}$.

Известны инфракрасные спектры испускания, отражения и поглощения, однако наибольшее распространение в ИК-спектроскопии получили спектры поглощения. Спектр поглощения можно получить, располагая лишь небольшим количеством вещества (миллиграммы и менее) в любом агрегатном состоянии, в растворе, при разных температурах и давлениях, окрашенного и непрозрачного в видимом свете, люминесцирующего и т. п.

Поглощение света веществом описывается законом Бугера – Ламберта – Бэра, связывающим интенсивность монохроматического светового потока I_0 , падающего на образец, и потока I , прошедшего через него, с характеристиками молекул исследуемого (поглощающего) вещества и его концентрацией в образце:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon c l}, \quad (3.1),$$

где ε – удельный коэффициент поглощения, л/(моль·см); c – концентрация вещества, моль/л; l – толщина слоя вещества, см.

На практике используют логарифмическую форму записи закона Бугера – Ламберта – Бэра:

$$D = \lg(I_0/I) = -\lg(I/I_0) = \varepsilon \cdot c \cdot l, \quad (3.2),$$

где D – оптическая плотность вещества.

Параметр $(I/I_0) \cdot 100\% = T$ называется пропусканием. ИК-спектр поглощения представляет собой зависимость пропускания T или оптической плотности D от волнового числа.

Поглощение света веществом в ИК-области спектра связано с возбуждением колебания молекул. Существуют два основных вида молекулярных колебаний ([рис. 3.1](#)):

валентные, при которых атомы совершают колебания вдоль связи, при этом происходит изменение длин связей, соединяющих атомы;

деформационные, при которых происходит изменение валентных углов между связями.

Каждому типу связи соответствуют колебания определенной частоты, а следовательно, и полосы или пики поглощения в ИК-спектре. Частоты этих колебаний сохраняются в спектрах различных соединений и называются *характеристическими*. После снятия спектра полимера по характеристическим полосам поглощения можно идентифицировать группы, входящие в его состав, а также и сам полимер.

Кроме частоты колебания (или волнового числа) каждая полоса в спектре может быть охарактеризована интенсивностью, шириной и типом поляризации. Интенсивность полосы характеризуется концентрацией функциональных групп, поглощающих свет с длиной волны λ , а также молекулярной структурой вещества. Так, наиболее интенсивными в спектре являются пики, отвечающие валентным колебаниям. Различают *интенсивность в максимуме поглощения* и *интегральную интенсивность* (площадь под спектральной кривой поглощения). Интенсивность в максимуме измерить проще и ею пользуются чаще.

Полосы поглощения делят на *сильные*, *средние* и *слабые* в зависимости от высоты полосы (пика) в максимуме поглощения или от площади под спектральной кривой поглощения. Ширину полосы можно измерять на уровне половины ее высоты в максимуме (полуширина полосы). Если образец полимера ориентирован, то, используя поляризованный свет, для каждой полосы в спектре можно определить тип ее поляризации. Детальная интерпретация колебательного спектра макромолекулы связана громоздкими вычислениями, однако в большинстве случаев можно ограничиться различными приближенными приемами.

Для интерпретации колебательных спектров полимеров необходимо и достаточно знать полосы поглощения характерных групп звеньев макромолекул. Иногда такая единица совпадает с мономерным звеном цепи (например, изотактический полипропилен), в некоторых случаях она содержит два мономерных звена (синдиотактический полипропилен, полиакрилонитрил), либо включает лишь «половину» мономерного звена (полиэтилен). При анализе спектра следует учитывать, что число характеристических колебаний для данной химической группы будет различно в зависимости от того, принадлежит ли эта группа молекуле полимера или мономера.

Как известно, общее число колебаний, с помощью которых с известной степенью приближения можно описать вообще колебания в молекуле, зависит от числа степеней свободы молекулы. Молекула, состоящая из n атомов, имеет $3n$ степеней свободы. Три степени свободы из их общего числа приходятся на поступательное и три – на вращательное движение. Таким образом, колебательное движение молекулы имеет $(3n-6)$ степеней свободы (для линейных молекул $3n-5$). Такое же количество основных колебаний следует ожидать в ИК-спектрах. Однако поглощение ИК-излучения молекулой наблюдается только в том случае, если происходящий при этом переход на более высокий колебательный уровень связан с изменением электрического дипольного момента молекулы. Только такие переходы являются разрешенными. Например, рассмотрим характеристические колебания группы $-\text{CH}_2-$.

В молекуле CH_2Cl_2 для нее характерны три характеристических колебания – два валентных в интервале частот 2940–2915 и 2885–2860 cm^{-1} и одно ножничное деформационное колебание в интервале 1480–1460 cm^{-1} . В полимерной молекуле, содержащей группы $-\text{CH}_2-$, следует ожидать шесть характеристических колебаний: удвоенное число указанных выше трех характеристических колебаний, поляризованных различным образом: параллельно и перпендикулярно оси цепи. В [табл. 3.2](#) в качестве примера приведены длины волн сильных полос поглощения некоторых функциональных групп.

Совершенно очевидно, что, например, альдегиды, кетоны и карбоксил-содержащие соединения нельзя идентифицировать только по положению полосы поглощения карбонильной группы $\text{C}=\text{O}$, которая входит во все эти молекулы. Кроме полосы поглощения, характерной для группы $\text{C}=\text{O}$, каждая другая функциональная группа дает дополнительную характеристическую полосу поглощения: альдегидная группа – полосу $\text{C}-\text{H}$, карбоксильная – $-\text{OH}$. И все же ИК-спектр не всегда позволяет однозначно решить вопрос о строении вещества, точно его идентифицировать, так как часто в одной области спектра поглощают несколько групп и полосы поглощения перекрываются. Поэтому помимо ИК-спектра полимера для его идентификации необходимы результаты качественного и количественного элементного анализа.

Таблица 3.2

Типичные области ИК-спектра, применяемые для идентификации классов органических соединений

Колебания	Класс соединений	ν , cm^{-1}
$\text{C}-\text{H}$, валентные	алифатические	2800–3000
$\text{C}-\text{H}$, валентные	ненасыщенные	3000–3100
$\text{C}=\text{C}$, валентные	алкены	1630–1680
$\text{C}=\text{C}$, валентные	ароматические	1500–1600
$\text{C}\equiv\text{C}$, валентные	алкины	2100–2260
$\text{C}-\text{H}$, веерные	алкены, ароматические	700–1000

Очень часто полосы в спектре могут быть диффузными, т. е. «размытыми». Это может быть обусловлено двумя причинами: во-первых, макроскопическими дефектами образца, например, сильной неравномерностью пленки по толщине или высокой полидисперсностью и неравномерностью расположения частиц полимера в таблетке или суспензии; во-вторых, несовершенной молекулярной структурой образца. К выводам о структуре и свойствах полимера на основе таких спектров следует относиться с большой осторожностью, поскольку каждая диффузная полоса может состоять из множества неразрешенных компонент.

В руководствах по ИК-спектроскопии приводят подробные таблицы характеристических частот поглощения практически для всех типов структурных элементов молекул. Классическими являются *таблицы Колтуна*. В последнее время созданы также компьютерные базы данных по

ИК-спектроскопии для десятков тысяч индивидуальных соединений, в том числе и для большинства известных полимеров. Например, компьютерная база данных OPUS позволяет провести быструю идентификацию соединения по его ИК-спектру при условии, что исследуемое вещество выделено в достаточно чистом виде.

Необходимо иметь в виду, что ни один метод, включая ИК-спектроскопию, не может дать исчерпывающей информации о структуре вещества. Поэтому по возможности следует использовать сочетание нескольких методов. В первую очередь необходимо (возможно, методом перебора) определить, к какому классу соединений относится исследуемое вещество, а затем более детально изучать его функциональный состав.

Наряду с качественным определением строения сложных молекул ИК-спектроскопия дает возможность проводить количественный анализ полимеров, например, определять состав сополимера, содержание функциональных групп, наличие и содержание посторонних веществ в полимере, степень ненасыщенности и др.

Практически важной областью применения ИК-спектроскопии является измерение *степени кристалличности*, основанное на различиях в положении интенсивности полос поглощения в спектрах высококристаллического и полностью аморфного полимеров. Однако этот метод необходимо сочетать с другими независимыми методами измерения степени кристалличности.

В сочетании с другими физическими методами, например, спектроскопией, ЯМР высокого разрешения и рентгеноструктурным анализом, ИК-спектроскопия может быть также использована для изучения стереохимической структуры макромолекулы.

В ИК-спектроскопии для регистрации спектров используют одно- и двухлучевые спектрометры.

Как правило, ИК-спектрометр работает по двухлучевой схеме: два параллельных световых потока пропускают через кювету с анализируемым образцом и кювету сравнения. Это позволяет уменьшить погрешности, связанные с рассеянием, отражением и поглощением света материалом кюветы и растворителем.

В обычных ИК-спектрометрах (с волновой дисперсией) спектр регистрируется последовательно. Спектрометры же с фурье-преобразованием позволяют сразу получить всю информацию о спектре в форме интерферограммы. В настоящее время наиболее совершенными приборами для ИК-спектроскопии являются однолучевые ИК-фурье-спектрометры, позволяющие получать результирующий спектр на основе автоматической обработки десятков спектров, снимаемых для одного вещества за 1 минуту. Результирующий ИК-спектр относится только к исследуемому веществу, из него автоматически удаляются фоновые спектры воздуха оптического канала, растворителя, а также шумовые эффекты самого прибора.

На ИК-спектрометрах можно исследовать растворы полимеров, а также твердые полимеры в виде пленок, таблеток, паст.

Растворы рекомендуется использовать в тех случаях, когда исследуют не весь спектр, а лишь отдельные характеристические полосы, например, при количественном анализе, когда требуется определить лишь поглощение для нескольких длин волн. Для приготовления растворов тщательно подбирают растворитель и устанавливают оптимальную концентрацию раствора, которая для большинства углеводородных полимеров обычно составляет 10–100 г/л. Толщина слоя раствора в кювете должна быть равна приблизительно 0,1 мм. Используют преимущественно кюветы двух типов: постоянной толщины и разборные различных конструкций. Оба окошка кюветы делаются из прозрачного в ИК-диапазоне материала – KBr, LiF, NaCl, KCl, CaF₂.

Используемые растворители должны быть достаточно прозрачными в области поглощения исследуемого вещества, не должны химически взаимодействовать с растворенным полимером, а также с материалом кювет. Очевидно, что при работе с кюветами, окна которых сделаны из солей щелочных и щелочноземельных металлов, нельзя использовать воду и содержащие воду растворители. Наиболее удобными растворителями в ИК-спектроскопии являются хлороформ, тетрахлорид углерода, тетрахлорэтилен и сероуглерод.

Пленки полимера для ИК-спектроскопии получают нанесением концентрированного раствора полимера (определенной концентрации) на поверхность окошка кюветы и последующим испарением растворителя. Более разбавленные растворы наносят на поверхность ртути или воды в ограничительные кольца, определяющие площадь пленки. Из ряда полимеров можно получать пленки прессованием. Многие полимерные материалы можно разрезать на тонкие слои с помощью микротомы или других приспособлений.

Образцы в виде таблеток готовят растиранием тонко измельченного порошка галогенида щелочного металла (обычно KBr) с определенным количеством тонко измельченного полимера до образования однородной смеси с последующим вакуумированием в специальной пресс-форме и прессованием под давлением.

Используемые для ИК-спектроскопии пасты представляют собой суспензии полимера в минеральном масле. Естественно, что масло не должно обладать в исследуемой ИК-области собственным поглощением. Обычно для приготовления суспензий используют вазелиновое масло, прозрачное в широком спектральном интервале: 5000–3100, 2700–1500 см и 1300–70 см⁻¹. Для приготовления пасты полимер тщательно растирают в агатовой ступке и смешивают с небольшим количеством вазелинового масла. Затем образовавшуюся пасту наносят тонким слоем на одно из окошек разборной кюветы и накрывают сверху другим окошком; собранную таким образом кювету помещают в держатель.

На [рис. 3.1](#) в качестве примера приведены ИК-спектры стандартного образца полигидроксибутирата (ПГБ) и образца, полученного микробиологическим синтезом.

Ультрафиолетовая (УФ) спектроскопия охватывает коротковолновую область оптического диапазона и с одной стороны примыкает к видимой области спектра, а с другой – к рентгеновской. Длины волн УФ и видимой областей принято выражать в нанометрах (нм). Весь УФ-спектр делят на ближний с длиной волны 400–300 нм, дальний – 300–200 нм и так называемый *вакуумный*, с длиной волны 200–50 нм (при исследовании в области 200 нм применяют специальные вакуумные приборы, так как воздух сильно поглощает жесткое УФ-излучение).

В *УФ-спектроскопии* используют и спектры излучения, и спектры поглощения. При исследовании полимеров пользуются в основном спектрами поглощения (абсорбционная УФ-спектроскопия).

При воздействии света УФ и видимого диапазонов длин волн происходит возбуждение электронных оболочек молекул вещества, что обусловлено переходом валентных σ - и π -электронов, а также неспаренных (не участвующих непосредственно в образовании связей) электронов из основного состояния в возбужденное с более высокой энергией. Это сопровождается появлением полос поглощения в спектре при длинах волн, соответствующих разности энергий возбужденного и невозбужденного уровней. Каждому электронному уровню молекулы соответствует набор колебательно-вращательных уровней. Так как энергия возбуждения электронных оболочек молекулы значительно больше энергии возбуждения ее колебаний, то переход электронов обычно сопровождается изменением колебательно-вращательного состояния молекулы. Поэтому молекулярно-электронные спектры жидкостей и твердых тел состоят из широких полос.

Для возбуждения валентных электронов, участвующих в образовании разных связей, требуется разная энергия. Наибольшая энергия требуется для возбуждения электронов, участвующих в образовании ординарных связей (σ -связей), наименьшая – для электронов, участвующих в образовании ненасыщенных сопряженных связей. Поэтому большинство насыщенных соединений имеют поглощение в вакуумной УФ-области (до 200 нм). Возбужденные уровни расположены настолько густо, что поглощение насыщенных соединений сплошное.

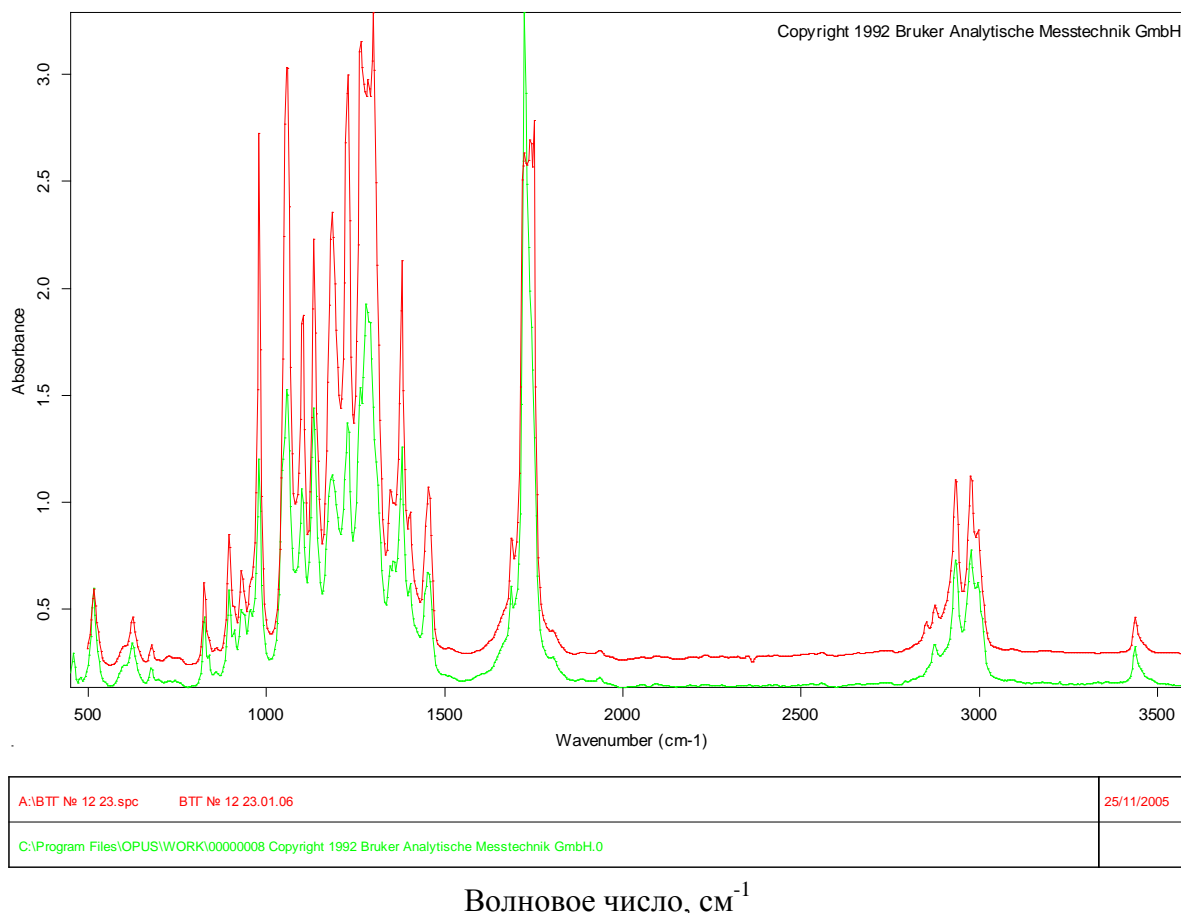


Рис. 3.1. ИК-спектры стандартного образца (1) поли-(3)-гидроксибутирата из базы данных ИК-спектров фирмы Bruker (OPUS) и образца, синтезированного в Институте биофизики СО РАН (спектр П. В. Миронова)

Избирательное поглощение в УФ и видимых областях спектра характерно для ненасыщенных соединений. Их поглощение определяется наличием в ненасыщенных связях легко возбудимых π -электронов. Группы атомов, ответственные за избирательное поглощение, называют хромофорами. Простейшими хромофорами являются группы с изолированными кратными связями C=C, C \equiv C, C=O и др. Они также имеют поглощение в вакуумной УФ-области спектра или на границе рабочего интервала (около 200 нм) обычных спектрофотометров.

Положение полос поглощения хромофоров (максимум поглощения $\lambda_{\text{макс}}$) и их интенсивность могут значительно изменяться в зависимости от природы групп атомов, присоединенных к молекуле, содержащей хромофор, и не имеющих собственного поглощения. Такие группы называются ауксохромами. Типичными ауксохромами являются группы OH, OCH₃, NH₂, N(CH₃)₂; к ним можно отнести и атомы галогенов. Под влиянием ауксохрома происходит сдвиг полос поглощения в сторону больших (батохромный эффект) или меньших длин волн (гипсохромный эффект).

Смещение полос поглощения и увеличение их интенсивности наблюдаются также при взаимодействии хромофоров между собой. Так, сопряжение этиленовых связей вызывает батохромное смещение поглощения. Взаи-

модействие с ауксохромами и эффект сопряжения приводят к тому, что поглощение большинства хромофоров наблюдается в ближней УФ и видимой областях спектра, удобных для спектрального анализа. В [табл. 3.3](#) представлены некоторые наиболее распространенные простые хромофоры и положение максимумов их полос поглощения.

Таблица 3.3

Характеристические полосы поглощения некоторых типов хромофоров в УФ-спектре

Хромофоры	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	Интенсивность полосы поглощения	Возбуждение
>C=C<	175–200	Сильная полоса	π -электронов
>C=O	180–195		
	270–295	Слабая полоса	Свободной электронной пары кислорода
O-H	185	Полоса средней силы	
-NH ₂	215		
-N=N-	340–370	Слабая полоса	Свободной электронной пары азота

Как и большинство насыщенных соединений, не содержащих кратных связей, полимеры прозрачны в ближней УФ и видимой областях спектра (полиолефины, полимеры и сополимеры хлор- и фторпроизводных этилена, поливиниловый спирт и др.). Полимеры сложных эфиров акриловых кислот (полиакрилат, полиметакрилат), поливиниловые сложные эфиры (поливинилацетали и т. п.), а также полимерные эфиры карбоновых кислот, содержащие карбонильный хромофор, поглощают на границе вакуумной УФ-области (около 200 нм). Полимеры, содержащие карбоксильный хромофор или бензольные кольца, поглощают в значительной части УФ-области. Спектры полимеров в УФ-области, как правило, невыразительны и не имеют практического применения для исследования структуры.

Фон спектра полимера обычно не мешает изменению оптической плотности хромофоров добавок, вводимых в полимеры (антиоксидантов, пластификаторов, стабилизаторов), поэтому УФ-спектроскопию применяют для анализа примесей в полимерах. Правильно выбранные аналитическая полоса поглощения и толщина поглощаемого слоя обеспечивают необходимую чувствительность анализа и его точность. Для определения интенсивности аналитической полосы поглощения используют метод базисной линии.

При наличии изолированной полосы базисную линию (линия *L*) проводят как прямую, сливающуюся на краях полосы с фоном поглощения ([рис. 3.2, а](#)). Однако в спектрах полимеров и других соединений наличие изолированной полосы поглощения является скорее исключением, чем правилом. При наличии двух или более перекрывающихся полос можно провести общую базисную линию (линия *L*), продолжая (в сторону коротких длин волн) прямолинейный участок спектра за полосой поглощения ([рис. 3.2, б](#)). В обоих методах оптическая плотность D_A данной полосы поглощения *A*

определяется отрезком на перпендикуляре, опущенном на ось абсцисс из максимума полосы, до точки пересечения перпендикуляра с линией L .

Для количественного определения оптической плотности по УФ-спектрам пользуются законом Бугера – Ламберта – Бера, из которого следует, что

$$c = D/(\varepsilon l), \quad (3.3),$$

где c – концентрация частицы, обуславливающей данную полосу поглощения; D – оптическая плотность; ε – коэффициент поглощения, отнесенный к единице толщины поглощающего слоя (1 см) и единице концентрации испытуемого раствора (1 моль/л); l – толщина поглощающего слоя.

УФ-спектроскопия позволяет исследовать твердые полимеры (пленки, порошки, таблетки, получаемые из тонкоизмельченной смеси полимера и бромида калия) и их растворы.

При исследовании растворов используют растворители, поглощающие свет в области длин волн менее 200 нм, например предельные углеводороды (гексан, гептан), циклогексан. Можно использовать хлороформ, этилацетат, дихлорэтан, которые поглощают свет в области менее 250 нм, а также воду, спирты и другие соединения, прозрачные для того диапазона УФ-излучения, который обычно используют в аналитических целях. Выбор растворителя ограничивается растворимостью полимеров и также возможностью искажения спектров вследствие реакций комплексообразования и ассоциаций между растворенным веществом и растворителем. Однако прозрачность растворителей в УФ-области спектра позволяет использовать поглощающий слой большой толщины, а это существенно при определении малых количеств примесей и добавок. Простота установления точной концентрации и количественных расчетов на основании закона Бугера – Ламберта – Бэра – одно из преимуществ работы с растворами. Преимуществом применения пленок является отсутствие необходимости введения поправок на поглощение растворителя, а также удобство хранения образцов.

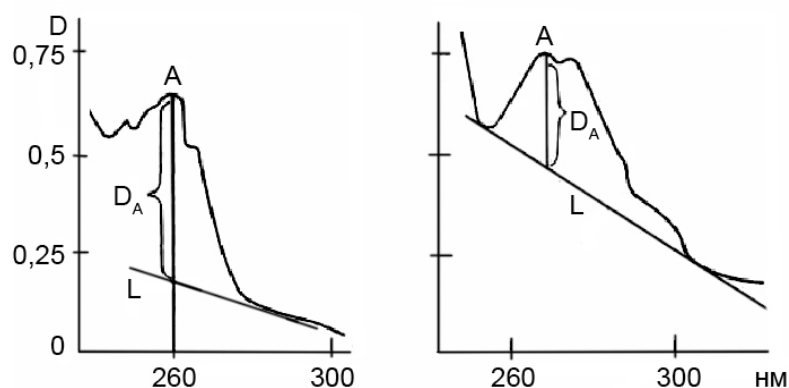


Рис. 3.2. Измерение оптической плотности методом базисной линии

Существует два основных типа приборов для УФ-спектроскопических исследований (одно- и двухлучевой), каждый из которых имеет свои пре-

имущества и недостатки. Однолучевой прибор, измеряющий оптическую плотность по отдельным точкам, в сочетании с измерительной системой по схеме уравновешенного моста является наилучшим прибором для точных количественных измерений, однако работа на нем трудоемка и долговременна. Двухлучевой регистрирующий прибор позволяет получать хорошие спектры для качественного изучения, однако для количественных целей он менее точен, чем однолучевой.

Однолучевые спектрофотометры СФ-26 и СФ-16 предназначены для измерения пропускания и оптической плотности растворов и твердых веществ в диапазоне 186–1100 нм. Спектрофотометр СФ-26 поставляется в двух вариантах – основном и дополнительном, включающем цифровой вольтметр Щ1213, который используется вместо стрелочного прибора для более объективного измерения пропускания (оптической плотности). Однолучевой спектрофотометр СФ-46 со встроенной микропроцессорной системой предназначен для измерения пропускания, оптической плотности жидких и твердых веществ в области 190–1100 нм. Диспергирующим элементом служит дифракционная решетка с переменным шагом и криволинейным штрихом.

Регистрирующие двухлучевые спектрофотометры СФ-10 СФ-14, СФ-16 предназначены для измерения пропускания и оптической плотности прозрачных и мутных сред и коэффициентов диффузного отражения твердых и порошкообразных веществ в видимой области спектра (от 400 до 750 нм). Спектрофотометры состоят из осветителя, двойного призмного монохроматора, фотометра поляризационного типа, приемно-усилительной части и записывающего механизма.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопия) представляет собой особый вид абсорбционной спектроскопии. Явление резонанса в спектре ЯМР наступает при поглощении электромагнитного излучения парамагнитными ядрами, находящимися в однородном внешнем магнитном поле. Ядерный магнитный резонанс наблюдают в соединениях, молекулы которых имеют ядра, в состав которых входит нечетное число нейтронов или протонов. Если парамагнитное ядро поместить в однородное магнитное поле, то возможна различная ориентация его магнитного момента по отношению к внешнему полю, которая определяется магнитным спиновым квантовым числом m_I (m_I может принимать значения $+I, I-1, \dots, -I$). При наложении дополнительного переменного электромагнитного поля, магнитный вектор которого перпендикулярен однородному магнитному полю, возможна вынужденная переориентация магнитного момента ядра, сопровождаемая поглощением энергии высокочастотного поля (ядерный магнитный резонанс, [рис. 3.3](#)).

Для измерения резонансного сигнала пробу исследуемого вещества (в виде жидкости или раствора) вносят в однородное магнитное поле H_0 . Исследуемое вещество помещают в центр индукционной катушки, создающей высокочастотное электромагнитное поле с частотой ν . Затем изменяют напряженность магнитного поля H_0 до тех пор, пока не наступает явление резонан-

са. В этот момент образец начинает поглощать энергию высокочастотного поля и ток, протекающий по катушке, возрастает. Изменение величины протекающего тока (резонансный сигнал) может быть измерено и зарегистрировано, то есть получают спектр ядерного магнитного резонанса. Наиболее благоприятными объектами для ЯМР-спектроскопии являются ядра, у которых отношение m_I/I , а следовательно, и ΔE достаточно велики. Это ядра со спином $I = 1/2$, такие, как ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{19}F и ^{31}P .

Методы ядерного магнитного резонанса (ЯМР) в настоящее время находят широкое применение для решения разнообразных задач в полимерной химии. Основных направлений применения этого метода в полимерной химии два: детальное изучение микроструктуры полимерных цепей с помощью аппаратуры высокого разрешения; исследование молекулярных движений в полимерах и различных химических процессов в полимерных системах с использованием импульсной методики ЯМР.

ЯМР высокого разрешения очень чувствителен к природе химических связей и строению отдельных групп атомов и поэтому достаточно надежен при анализе конфигурационных последовательностей звеньев в макромолекулах. Сравнение площадей сигналов отдельных групп позволяет определить относительное содержание последовательностей, например, триад и тетрад в сополимерах, что особенно важно, в частности, при рассмотрении модели роста цепи.

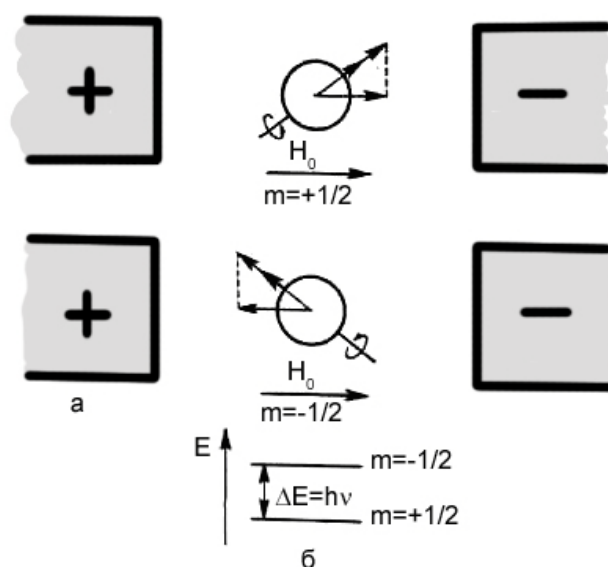


Рис. 3.3. Магнитное ядро атома в однородном магнитном поле:

a – возможные ориентации оси магнитного момента;

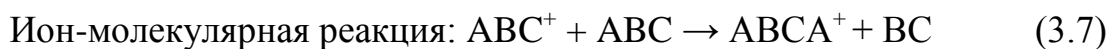
б – энергия ядра при различной ориентации

Импульсная методика ЯМР применяется для измерения времен релаксации в исследуемых объектах, которые в значительной мере определяются интенсивностью и характером молекулярных движений. Во многих полимерных системах, содержащих кристаллические и аморфные области, пластификаторы, растворители, олигомеры, или в частично заполимеризо-

вавшихся образцах такие различия в движениях молекул обуславливают наличие двух или трех времен релаксации. Это дает возможность разделения наблюдаемых сигналов на несколько компонент и позволяет определять степень кристалличности или набухания полимеров, глубину превращения в реакциях полимеризации и т. д.

Метод ЯМР выгодно отличается от других физических и химических методов отсутствием разрушения полимерных образцов при исследовании, не требует длительных измерений и обработки результатов. При исследовании процессов полимеризации в блоке метод позволяет получать информацию о кинетике реакций образования полимеров на основе самых разнообразных соединений, а также сложных композиций, содержащих наполнители, пластификаторы и т. д. Лучшие ЯМР-спектрометры, сочетающие аппаратуру высокого разрешения и релаксометры, выпускают фирмы «Bruker» (ФРГ), «Varian» (США) и др.

Масс-спектроскопия является аналитическим методом, при котором исследуемый образец, находящийся в газообразном состоянии в высоком вакууме ($\sim 10^{-6}$ мм рт. ст.), подвергается ионизации и фрагментации. Образовавшиеся после ионизации положительно заряженные частицы ускоряются в электрическом поле, затем разделяются в магнитном поле на пучки ионов с одинаковым отношением массы к заряду и далее регистрируется соответствующая им интенсивность. Ионизация молекулы осуществляется путем электронного удара; при этом образуются молекулярные ионы в виде катион-радикалов (уравнение 3.4). В том случае, когда одной молекуле передается количество энергии, большее, чем это необходимо для ионизации (потенциал ионизации органических соединений 8–15 эВ), то образующийся молекулярный ион распадается на «осколки» (фрагментация). В общем случае энергию электронного удара выбирают достаточно высокой (50–70 эВ), так что масс-спектр хорошо воспроизводится, и его вид не зависит от приложенной энергии. Для молекулы ABC в масс-спектрометре принципиально возможно протекание реакций согласно схеме:



В процессе ионизации преимущественно образуются положительные молекулярные и фрагментные ионы, а также незаряженные частицы (например, радикалы). Вероятность образования отрицательных ионов в данных

условиях $\sim 1/10^4$. Ионизация молекулы с помощью энергетически бедных термических электронов (2–4 эВ) приводит, напротив, к захвату электрона и образованию отрицательных молекулярных ионов. Этот метод спектроскопии электронного захвата особенно пригоден для определения молекулярной массы, так как вследствие незначительной энергии электронов подавляются процессы фрагментации.

Для измерения масс-спектра проба исследуемого вещества (0,1–2 мг) вносится в эвакуируемую ионизационную камеру масс-спектрометра (рис. 3.6) и ионизируется далее электронным пучком. При помощи соответствующим образом направленных электрических полей положительно заряженные частицы ускоряются, формируются в пучок, проходя через узкую входную щель, и попадают в постоянное магнитное поле, ориентированное перпендикулярно направлению движения ионов. Незаряженные частицы удаляются из ионизационной камеры с помощью вакуумного насоса.

В магнитном поле ионы распределяются по круговым орбитам, радиус которых r зависит от заряда иона e , его массы m , напряженности магнитного поля H и скорости v прохождения иона через щель в соответствии с уравнением

$$r = \frac{2mU}{eH}. \quad (3.8)$$

При постоянных внешних условиях ионы в зависимости от отношения массы к заряду описывают траектории движения с различными радиусами, на чем и основывается принцип разделения при масс-спектроскопии.

Если изменяется напряженность ускоряющего электрического поля при постоянном магнитном поле или если изменяется магнитное поле при постоянном ускоряющем электрическом поле, то радиусы кривых движения ионов изменяются согласно уравнению (3.8). Ионы с различными массовыми числами (m/e практически равно m , так как преимущественно образуются частицы с зарядом, равным единице) появляются через выходную щель друг за другом и отдают свой заряд приемнику ионов (масс-спектрометр). Ионный ток в приемнике как функция ускоряющего напряжения и дает масс-спектр; при этом величина напряжения определяет массовое число иона, а величина ионного тока – количество различных ионов (рис. 3.4, а). Масс-спектр может быть зарегистрирован также и без сканирования магнитного или электрического полей. В таком случае разделенные пучки ионов направляются на фотопленку либо на детектор иного принципа действия (масс-спектрограф). В первом случае мерой интенсивности ионов служит степень почернения пленки. Зарегистрированный масс-спектр обычно воспроизводится или графически с помощью штрихов, или в виде таблицы; при этом интенсивность отдельных пиков указывается в процентах к наиболее интенсивному пику (базисный пик). На рис. 3.4 в качестве примера приведены масс-спектры монометилового эфира этиленгликоля.

Молекулярный пик (parent peak) представляет собой пик с наибольшим массовым числом, так как бимолекулярные реакции, которые могут приводить к увеличению молекулы согласно уравнению (3.7), происходят очень редко в условиях высокого разрежения в масс-спектрометре. Молекулярный пик соответствует массе молекулярного иона и указывает точную молекулярную массу исследуемого вещества. Для отличия молекулярных пиков от фрагментных служит, кроме того, тот факт, что органические соединения, содержащие элементы C, H, N, O, S и галогены, всегда имеют четное массовое число (исключение составляют вещества с нечетным числом атомов азота в молекуле). С помощью высокоразрешающих масс-спектрографов возможно определение молекулярной массы с точностью до четырех знаков после запятой, что позволяет определять брутто-формулу исследуемых соединений.

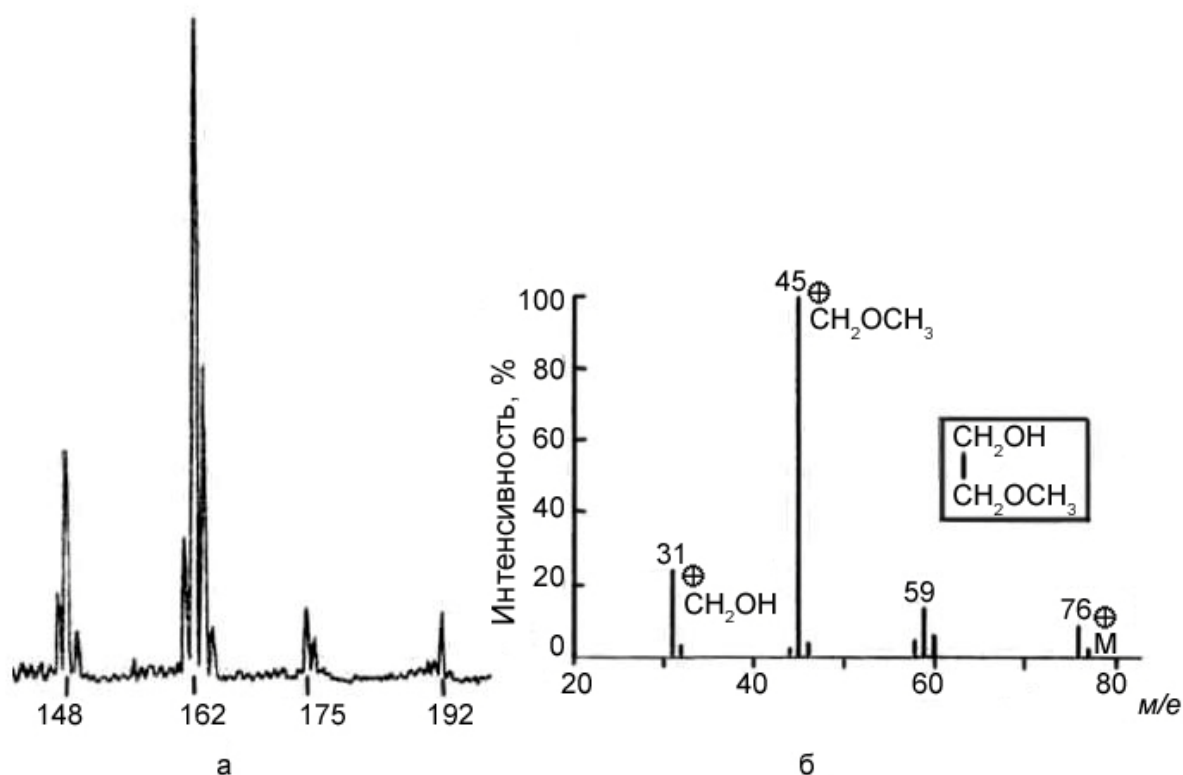


Рис. 3.4. Масс-спектры монометилового эфира этиленгликоля:
a – регистрируемый спектр (фрагмент); *б* – графическое изображение масс-спектра (справочные данные)

Интенсивный молекулярный пик содержится в спектре только в том случае, если в результате электронного эффекта молекулярный ион стабилизирован. Так, в спектре ароматических соединений наблюдают большой молекулярный пик, в то время как в спектрах соединений алифатического ряда интенсивность этого пика очень часто мала. Для алифатических углеводов интенсивность молекулярного пика уменьшается от первичных к вто-

ричным и третичным углеводородам; такой последовательности благоприятствуют процессы фрагментации. В соответствии с увеличением стабильности молекулярные ионы можно приблизительно расположить в следующий ряд: спирты < кислоты < амины < сложные эфиры < простые эфиры < углеводороды с неразветвленной цепью < карбонильные соединения < алициклические соединения < олефины < олефины с сопряженными связями < ароматические соединения.

Как молекулярные, так и фрагментные пики в масс-спектре обычно сопровождаются пиками малой интенсивности, так называемыми изотопными пиками. Отношение интенсивностей этих пиков является характеристической величиной; она отражает изотопный состав естественных объектов. Соотношение интенсивностей изотопных пиков молекулярных ионов позволяет оценить брутто-состав соединения (конкретные примеры имеются в оригинальной литературе).

Анализ масс-спектров органических соединений с целью установления их структуры сводится к рассмотрению возможных схем их фрагментации. Молекулярный ион распадается не по любому пути, а лишь по энергетически наиболее благоприятному, который описывается, как правило, мономолекулярной реакцией. Поэтому для каждого данного соединения всегда получают типичный и воспроизводимый спектр, соответствующий определенным фрагментам. Для предсказания возможных реакций фрагментации можно привлекать в определенном объеме схемы механизмов пиролиза. Вероятность фрагментации молекулярного иона зависит от энергии соответствующей связи и возможности стабилизации «осколочного» иона. Такие ионы, как карбониевые, стабилизированы при протекании химических реакций благодаря индуктивным и мезомерным эффектам. В результате преимущественно образуются фрагменты, обладающие высокой устойчивостью и проявляющиеся в масс-спектре с большой интенсивностью. Эти фрагменты, обозначаемые как ключевые, отличаются к тому же еще и характеристическими массовыми числами. На такие фрагменты ориентируются при использовании масс-спектра для установления структуры соединения. При анализе масс-спектров руководствуются известными правилами образования осколочных ионов, которые изложены в литературе по масс-спектроскопии.

Анализ масс-спектра неизвестного соединения начинают с отнесения пиков с наибольшим массовым числом, так как эти пики являются определяющими при оценке спектра [молекулярный пик, (M-X)-пик, пики стабилизированных фрагментов] по сравнению с пиками с низкими массовыми числами. Прежде всего, идентифицируют молекулярный пик, благодаря чему определяют молекулярную массу исследуемого соединения. Было замечено, что соединения, содержащие легко отщепляемые фрагменты X, дают только слабый молекулярный, но интенсивный (M-X)-пик.

В общем случае при расщеплении связи положительный заряд может находиться на обеих частицах. Поэтому оба осколочных иона обнаруживаются в масс-спектре, однако пик, соответствующий иону с меньшим массовым числом, часто менее интенсивен. При масс-спектроскопических исследова-

дованиях, как правило, опускают область от 30 до 40 масс. ед., так что эти массовые числа в спектре не наблюдаются. Однако при оценке (M-X)-пиков необходимо использовать и эту область спектра.

Поскольку такие элементы, как S, Cl и Br, имеют заметно интенсивные по сравнению с молекулярным изотопные пики ионов с массой (M + 2), то присутствие в соединении этих элементов может быть легко обнаружено с помощью масс-спектров.

Большое аналитическое значение имеют характеристические пики. Их массовые числа могут быть определены исходя из молекулярной массы и чисто химических реакций фрагментации. При исследованиях структуры полимеров особенно эффективным является сочетание методов термического анализа и масс-спектропии ([рис. 3.5](#)).

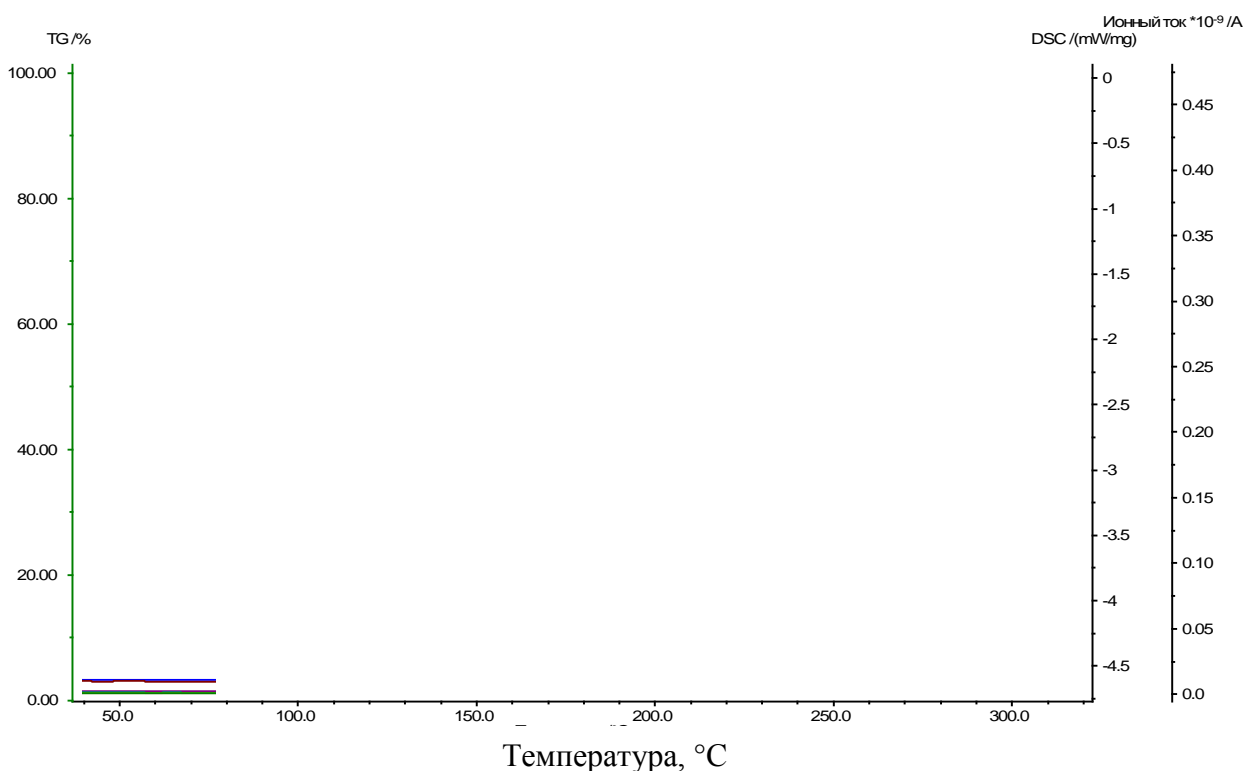


Рис. 3.5. Комплексный термический и масс-спектрометрический анализ полимера (полигидроксibuтират). Указаны температуры термических эффектов и массовые числа фрагментов (спектр П. В. Миронова)

В настоящее время серийно выпускают приборы для комплексного термического анализа, снабженные масс-спектрометрическими анализаторами продуктов термической деструкции исследуемых образцов (например, термоанализаторы германской фирмы «NETZSCH»). При этом одновременно проводится дифференциальный термический анализ (ДТА), термогравиметрия (ТГ), деривативная термогравиметрия (ДТГ) и масс-спектральный анализ продуктов термодеструкции.

В качестве примера на [рис. 3.5](#) приведены результаты комплексного термического и масс-спектрометрического анализа образца полимера (полигидроксибутират), приведены кривые ТГ, ДСК (ДТА) и масс-спектры фрагментов полимера, образующиеся при термическом разложении его расплава. На кривой ДСК теплосодержание (эндотермический пик с минимумом при 182,2 °С) связано с плавлением образца полимера, а при температуре 282,8 °С – с термическим разложением полимера. Продукты термического распада подвергались масс-спектрологии. Соответствующие масс-спектры также приведены на [рис. 3.5](#) с указанием массовых чисел.

Термический анализ применяется для исследования процессов, происходящих в индивидуальных веществах или многокомпонентных системах при нагревании или охлаждении и сопровождающихся изменением внутреннего теплосодержания системы. Термический анализ объединяет группу методов, отличающихся аппаратурным оформлением и измеряемой характеристикой.

Если измеряется температура образца, метод называется термографией, масса образца – термогравиметрией, количество выделившегося тепла – калориметрией, объем – дилатометрией и т. д.

Метод дифференциального термического анализа (ДТА) основан на сравнении термических свойств исследуемого вещества и термически инертного вещества, принятого в качестве эталона. Регистрируемым параметром является разность температур ΔT между образцом и эталоном, измеряемая при нагревании или охлаждении образца с постоянной скоростью. Разность температур ΔT может быть представлена в виде зависимости от температуры исследуемого образца, эталона или времени (кривая ДТА).

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) основан на измерении и регистрации тепловой мощности (то есть количества тепла в единицу времени), выделяемой в образце или эталоне и необходимой для поддержания между ними нулевой разности температур. Например, при выделении тепла в исследуемом образце (экзотермический эффект) специальное программирующее устройство обеспечивает такой же тепловой поток в эталоне при помощи встроенного электрического нагревателя, обеспечивая между образцом и эталоном нулевую разность температур. При поглощении тепла в исследуемом образце (эндотермический эффект) встроенный нагреватель в держателе образца с помощью программирующего устройства компенсирует потери тепла, также обеспечивая нулевую разность температур между образцом и эталоном. Как и в случае метода ДТА, измерение и регистрация тепловых эффектов осуществляется в условиях нагрева или охлаждения с постоянной скоростью. Тепловая мощность может быть представлена как функция температуры или времени (кривая ДСК).

Методы ДТА или ДСК широко применяются для исследования термических свойств веществ, связанных с физическими переходами или химическими реакциями, то есть с изменениями энтальпии. К ним относятся: кристаллизация, перестройки кристаллической структуры, плавление, стекло-

вание (расстеклование), испарение (конденсация), реакции дегидратации, диссоциации и разложения, окисления и восстановления и т. д.

Наиболее широкое распространение при исследованиях полимеров, в том числе и биомедицинского назначения, получил метод ДТА. В качестве эталона используют вещество, не претерпевшее термических превращений в данном температурном интервале. На [рис. 3.6](#) представлена схематическая кривая ДТА полимера, охватывающая всю температурную область существования полимера. Пики, расположенные над основной (базовой) линией, соответствуют экзотермическим процессам (кристаллизация, окисление и др.), а пики под основной (базовой) линией – эндотермическим (плавление, деструкция); для стеклования характерен перегиб на кривой ДТА.

Физические переходы в полимерах, изучаемые методом ДТА, по мере повышения температуры располагаются в следующем порядке: стеклование, «холодная» кристаллизация, переходы типа кристалл – кристалл (рекристаллизация, перекристаллизация), кристаллизация из расплава, плавление. Стеклование, не являясь фазовым переходом, характеризуется постепенным изменением теплоемкости с ростом температуры. На кривых ДТА этот эффект регистрируется как отклонение сигнала от базовой линии в форме ступенчатого уменьшения ΔT . Температуру стеклования обычно принимают по началу этого отклонения.

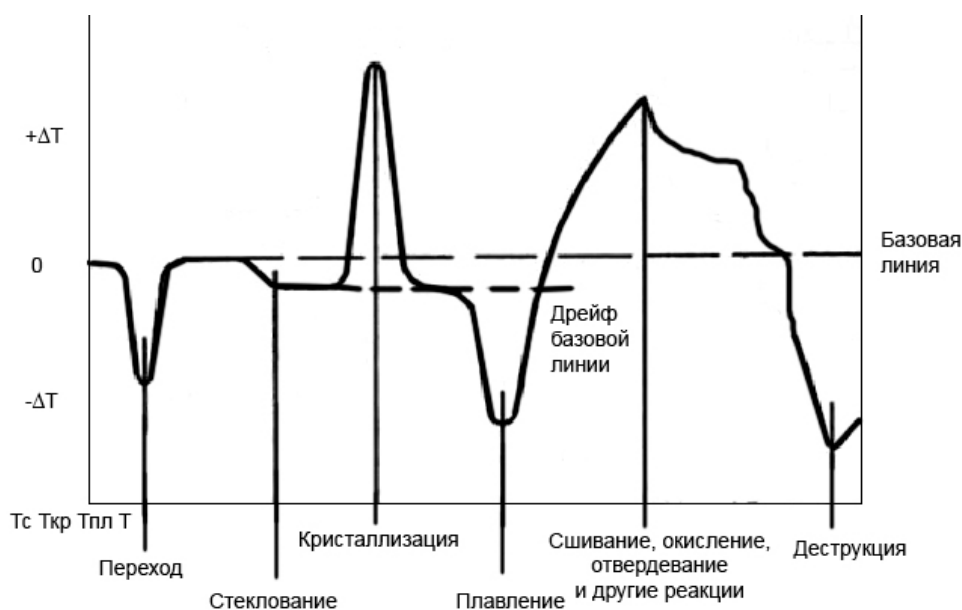


Рис. 3.6. Схематическая термограмма ДТА полимерного образца

Кристаллизация полимеров обычно сопровождается выделением скрытой теплоты, что на термограммах выражается экзотермическими пиками.

Площади под пиками соответствуют теплоте фазовых превращений и по абсолютной величине одинаковы для кристаллизации и плавления. Однако отсутствие экзотермических пиков на термограммах не всегда является

доказательством того, что кристаллизации не происходит, поскольку она может осуществляться очень медленно. Характерными точками пика являются температуры его начала, максимума и окончания. Некоторые полимеры (например, полиэферы, полиуретаны) могут кристаллизоваться при нагревании при температурах значительно ниже температуры плавления, но выше их температуры стеклования. Это называется «холодной» кристаллизацией. При этом происходит упорядочение близлежащих соседних звеньев в аморфных областях, не сопровождающееся перестройкой в расположении молекул. Экзотермический пик «холодной» кристаллизации предшествует эндотермическому пику плавления полимера.

Особенно часто с помощью ДТА исследуют процесс плавления полимеров, то есть переход из твердого кристаллического состояния в жидкое аморфное. Из-за дефектности кристаллической структуры полимеров эндотермический пик плавления находится в температурном интервале, ширина которого обусловлена неоднородностью макромолекул по молекулярной массе и особенностью структуры полимеров (степенью кристалличности, размером и типом надмолекулярных образований). Начало плавления определяют по началу резкого отклонения кривой ДТА от базовой линии (рис. 3.6), а за температуру плавления принимают температуру, соответствующую максимуму пика. Для многих полимеров характерно наличие на кривой ДТА в области плавления не одного, а двух или нескольких пиков. Это объясняется существованием в полимерах кристаллитов различной степени совершенства, а также полиморфизмом полимера, то есть его способностью существовать в нескольких кристаллических модификациях. По площадям пиков плавления можно определить удельные теплоты плавления, предварительно прокалибровав прибор по веществу с известной теплотой.

Как правило, для расчета истинных теплот плавления полимеров приборы калибруют по бензойной кислоте, теплота плавления которой равна 142,4 Дж/г.

Если известна теплота плавления ΔH^* полностью закристаллизованного полимера, то степень кристалличности S_x (%) можно определить по уравнению

$$\alpha = (\Delta H / \Delta H^*) 100, \quad (3.9)$$

где ΔH – теплота плавления исследуемого полимера, Дж/г; ΔH^* – теплота плавления полностью закристаллизованного полимера, Дж/г.

С помощью ДТА можно изучать процессы получения полимеров (определять оптимальные условия реакции, исследовать влияние состава на их скорость и др.) и их химические превращения. Например, можно определить оптимальные условия вулканизации каучуков, отверждения эпоксидных смол, охарактеризовать способность полимера к окислению. Кроме того,

ДТА широко применяют для оценки термостабильности и термодеструкции полимеров.

Более детальные сведения о термическом поведении полимеров дает совмещение ДТА с другими методами исследования: измерением электропроводности, термогравиметрией, термомеханическим методом, газовой хроматографией.

Существует много приборов для проведения ДТА (дифференциальных термографов), отличающихся устройством нагревательных элементов, регистрирующих приборов и т. п. Однако принцип действия всех этих приборов в общем один и тот же.

Термогравиметрический анализ. Некоторые химические процессы, протекающие в веществе при нагревании, сопровождаются изменением его массы (термоокисление, деструкция и др.). Поэтому метод ДТА может быть существенно дополнен применением термогравиметрического анализа (ТГА), сущность которого заключается в оценке изменения массы полимера в зависимости от температуры. Разновидностями ТГА являются: а) изотермическая (или статическая) термогравиметрия (ТГ), когда массу образца измеряют во времени при постоянной температуре; б) квазистатическая (или ступенчатая), когда образец выдерживают при какой-либо температуре до постоянного значения массы с последующим ступенчатым повышением температуры образца; в) динамическая, когда измеряют массу образца при непрерывном нагревании с определенной скоростью.

Кривая зависимости изменения массы от температуры называется термогравиметрической кривой или кривой ТГ. По кривой ТГ можно определить термостабильность (термостойкость) полимера. Термостабильность оценивается температурой начала разложения полимера $T_{\text{н}}$, при которой начинается потеря массы и кривая ТГ отклоняется от исходного нулевого значения, а также температурами T_{10} , T_{20} , T_{50} , при которых происходит потеря 10, 20 и 50 % массы в одних и тех же условиях эксперимента (скорость нагрева, среда и т. д.). Температура, при которой происходит полное разложение вещества, называется конечной температурой разложения $T_{\text{к}}$.

Деривативная термогравиметрия (ДТГ) регистрирует скорость изменения массы вещества во времени. Кривая ДТГ записывается в виде ряда пиков, положение которых совпадает по температурной шкале со ступенями кривой ТГ. С помощью кривых ДТГ можно определить температурные пределы реакции и температуру, соответствующую максимальной скорости реакции. Математической обработкой кривых ТГ и ДТГ можно рассчитать кинетические параметры процесса деструкции вещества: энергию активации E_a и порядок реакции n .

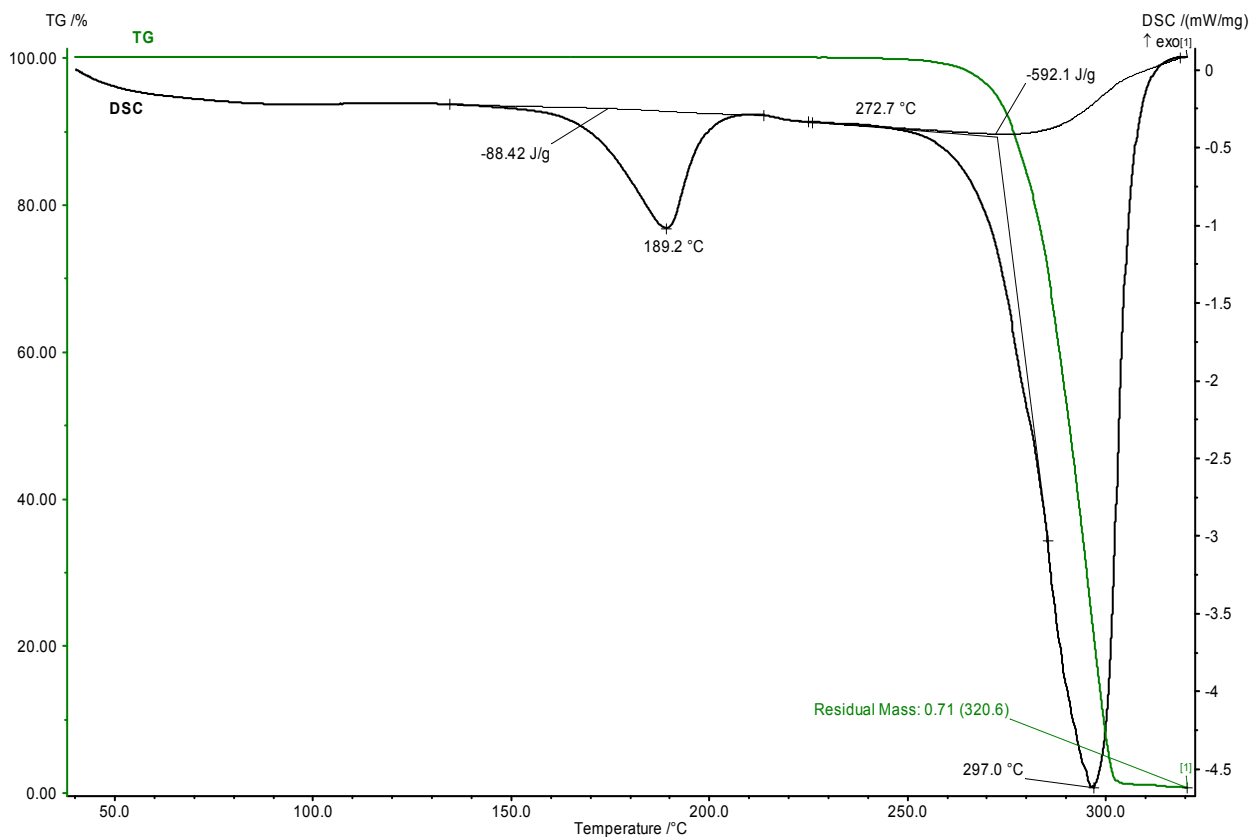


Рис. 3.7. Кривые термического анализа (ДСК и ТГ) полигидроксибутирата (спектр П. В. Миронова)

На [рис. 3.7](#) приведена типичная термограмма образца полигидроксибутирата в условиях нагрева с постоянной скоростью 10 °С/мин.

Изображены кривые термогравиметрического анализа (TG) и дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC). На кривой ДСК имеются два эндотермических эффекта (пики теплопоглощения при температурах 189,2 и 297 °С). Первый из них не сопровождается изменением массы образца и отражает фазовый переход плавления. Указана также автоматически рассчитанная величина теплового эффекта плавления (88,42 Дж/г). Второй эндоэффект сопровождается полной потерей массы образца (термическое разложение с удельной теплотой 592,1 Дж/г)

Рентгеноструктурный анализ представляет собой метод исследования структуры веществ с помощью дифракции рентгеновских лучей. Рентгеновские лучи с длиной волны $\lambda = 0,5\text{--}2,0 \text{ \AA}$ при прохождении через исследуемый образец претерпевают дифракцию. Формирующаяся при этом дифракционная картина отражает информацию о структуре вещества ([рис. 3.8](#)). Основная область применения рентгеноструктурного анализа (РА) – изучение строения кристаллов.

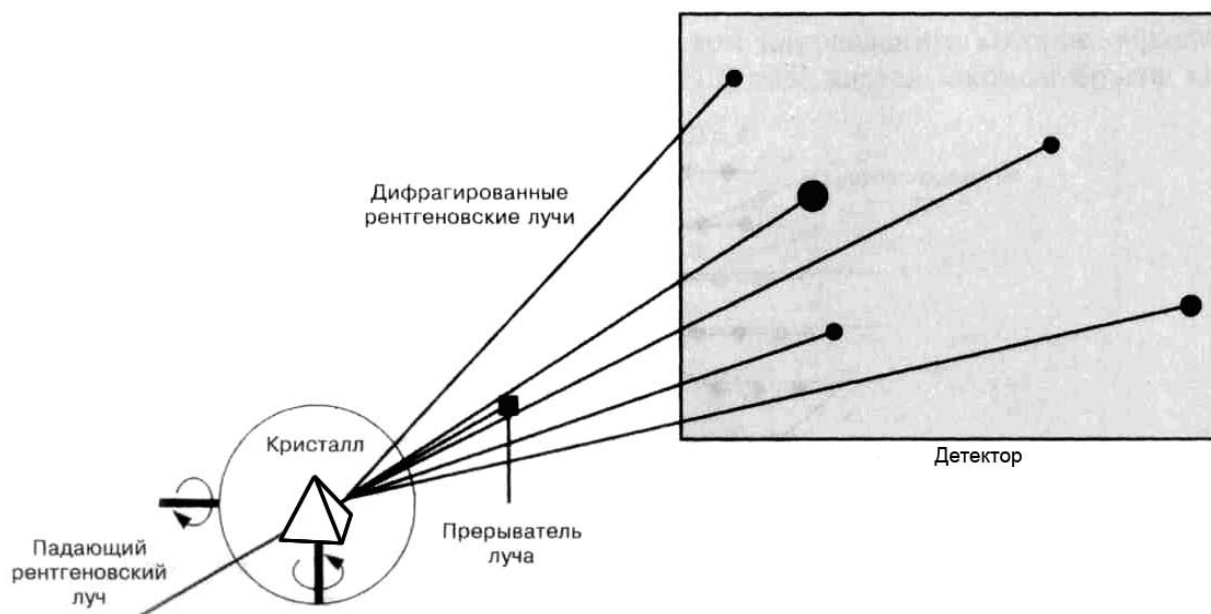


Рис. 3.8. Принципиальная схема прибора для измерения рассеяния рентгеновских лучей

Этим методом исследуют молекулярные кристаллы, определяют длины связей, углы между ними, устанавливают конформацию молекулы и упаковку молекул в кристалле. В частности, методом РА определены параметры элементарных ячеек кристаллов многих полимеров и конформации макромолекул в кристаллическом состоянии. РА применяется также для определения характера и степени ориентации кристаллитов в ориентированных полимерах, для оценки степени кристалличности (СК). Данные РА используют при определении размеров кристаллитов и степени порядка внутри них. Рентгенограммы могут быть использованы и для идентификации кристаллических полимеров. Малоугловое рассеяние рентгеновских лучей находит широкое применение при изучении элементов надмолекулярной структуры.

Основные этапы РА кристаллов разработаны достаточно подробно, благодаря чему этот метод широко используют для определения структур самых различных веществ: минералов, металлов и др.

Методика определения структуры полимерных кристаллитов несколько отличается от методов РА низкомолекулярных веществ. Анализ последних проводится в подавляющем большинстве случаев с использованием относительно крупных единичных кристаллов – монокристаллов, имеющих размеры не менее 0,1–1,0 мм. При этом можно получить несколько сотен или даже тысяч отдельных рефлексов, что позволяет провести подробное структурное исследование и с большой точностью определить параметры элементарной ячейки и координаты атомов.

В случае полимеров анализ приходится проводить на поликристаллических образцах, содержащих большое число отдельных кристаллитов. Из-за небольшого размера кристаллитов и нарушения внутри них трехмерного порядка в расположении атомов и молекул количество рефлексов на рентге-

нограмме даже высококристаллических полимеров не превышает 50–70. Все это ограничивает возможности и точность РА полимеров.

Для РА полимеров целесообразно использовать образцы в виде ориентированных волокон и пленок, обладающих осевой или плоскостной текстурой. Провести структурный анализ неориентированных образцов полимера практически невозможно.

Ориентированные волокна и пленки полимеров, предназначенные для РА, подвергаются различной предобработке (чаще всего отжигу в ориентированном состоянии) для получения максимально закристаллизованных образцов, которые дают рентгенограммы с наибольшим числом рефлексов.

Первый этап структурного исследования основан на определении направлений всех дифрагированных пучков. Вначале по расстоянию между слоевыми линиями на рентгенограмме определяется длина той оси элементарной ячейки, которая направлена вдоль оси текстуры. Поскольку вдоль оси текстуры в подавляющем большинстве случаев в ориентированном образце направлены оси макромолекул, то таким образом определяется длина повторяющегося звена макромолекулы, т. н. период идентичности. Изучая расположение всех рефлексов вдоль слоевых линий и т. н. погасания (то есть количества и положения отсутствующих рефлексов), определяют остальные размеры элементарной ячейки и расположение элементов симметрии, существующих в структуре.

Исходя из размеров элементарной ячейки и числа звеньев макромолекулы, приходящихся на одну ячейку, можно оценить плотность кристаллитов. Экспериментально определенная плотность полимера всегда меньше плотности кристаллитов, поскольку в образце имеются менее упорядоченные, аморфные участки, обладающие меньшей плотностью, а также поры и другие неоднородности. Зная период идентичности и другие параметры элементарной ячейки, а также элементы симметрии, уже на первом этапе исследования структуры во многих случаях удается определить конформацию макромолекулы или же указать несколько наиболее вероятных конформаций и размещение макромолекул в элементарной ячейке. При расшифровке структуры следует также иметь в виду, что во всех известных случаях оси макромолекул в кристаллитах располагаются параллельно друг другу.

Второй этап РА связан с оценкой интенсивности рефлексов. Используя различные методы Фурье-анализа распределения интенсивностей и проводя компьютерный анализ, можно определить координаты отдельных атомов в элементарной ячейке. Однако не во всех случаях удается определить полный набор кристаллографических параметров. Для ряда полимеров найдены только параметры элементарных ячеек, число звеньев в ячейке и плотность кристаллитов. Во многих случаях для определения конформации макромолекул и их упаковки в ячейке одних только рентгенографических данных оказывается недостаточно. В то же время имеются примеры, когда определяется конформация макромолекулы, но упаковку установить не удается. В случае макромолекул, обладающих большей симметрией, уменьшается число пара-

метров, которые необходимо найти, и определение этих параметров проводится с большей точностью.

На втором этапе РА большую пользу может принести привлечение данных других методов. Особенно важно использование данных ИК-спектроскопии в случае полимеров с водородными связями, поскольку этот метод дает сведения о существовании водородных связей, а в некоторых случаях и данные о направлении таких связей. Следует отметить, что определение структуры полимеров представляет собой сложную и трудоемкую работу. Кристаллографические данные о структуре полимера обычно включают в себя символ пространственной группы, характеризующей совокупность элементов симметрии; размеры элементарной ячейки, куда входят в общем случае длины трех осей и углы между ними; число мономерных единиц в элементарной ячейке, плотность кристаллитов и общая характеристика конформации макромолекулы (например, зигзагообразная цепь или спираль с данным количеством звеньев на один оборот).

Определение степени кристалличности (СК) материалов. РА применяют в основном для оценки СК неориентированных образцов полимеров. Метод основан на том, что на рентгенограммах многих полимеров наряду с узкими кристаллическими рефлексами обнаруживаются широкие гало, характерные для дифракции на аморфных неупорядоченных структурах. Интенсивность кристаллических рефлексов пропорциональна количеству кристаллитов, а интенсивность аморфного гало зависит от общего количества аморфного материала в образце. Сравнивая интенсивности рефлексов и гало, можно судить о СК образца.

Основная трудность состоит в том, что общую кривую распределения интенсивности трудно разделить на две части, связанные с кристаллитами и неупорядоченными областями. Основания кристаллических пиков достаточно широки и часто перекрываются друг с другом. Кроме того, небольшая часть дифракции на кристаллитах представляет собой диффузный фон, который трудно отделить от аморфного гало. Последнее также бывает иногда настолько широким, что не удается найти его центр и определить форму. Все же, как показывают результаты многочисленных исследований, при правильном выборе методики и тщательной работе рентгеновские оценки СК дают достаточно надежные результаты.

Для рентгенографической оценки СК разработан ряд методик. Наиболее точные результаты получаются при измерении СК с помощью одинаковой методики у серии образцов одного и того же полимера. Если в серии образцов имеется полностью аморфный образец, то из распределения интенсивности у частично-кристаллических образцов также выделяют тем или иным способом аморфные гало. При стандартных условиях съемки и обработки результатов, сравнивая интенсивности аморфных гало, можно определить СК полимера. В другой наиболее распространенной методике для изучения серии образцов с различной СК используется как аморфная, так и кристаллическая части кривой распределения интенсивности. На кривой распределения интенсивности выбирают два участка, один из которых представляет

часть аморфного гало, а другой – часть интенсивности кристаллических рефлексов. При увеличении СК интенсивность кристаллического участка будет увеличиваться, а аморфного уменьшаться. Определив изменения интенсивности этих участков у серии образцов, можно построить градуировочный график и с его помощью найти СК.

Существуют также методики оценки СК, использующие только кристаллическую часть общей кривой рассеяния. В одной из них для сравнения с экспериментальными данными используется теоретически рассчитанная кривая распределения интенсивности. В других случаях проводится сравнение с интенсивностями рефлексов низкомолекулярных полностью кристаллических веществ.

Не существует единой методики определения кристалличности, пригодной для исследования любых полимеров. В каждом случае выбор того или иного способа зависит от диапазона изменения кристалличности в серии образцов, от характера кривой распределения интенсивности. При определениях СК измерения распределения интенсивности проводятся обычно с помощью приборов – дифрактометров.

3.1.2. Биомедицинское тестирование биоматериалов

Наиболее полное представление о существующих современных подходах и медико-биологических методах исследования новых материалов и изделий медицинского назначения дает коллективная монография ведущих специалистов России в данной области, подготовленная под редакцией руководителя Центра по экспериментальному исследованию гемосовместимых биоматериалов НИИ трансплантологии и искусственных органов Минздрава России профессора В. И. Севастьянова (Биосовместимость, 1999). Программа исследований нового биоматериала формируется с учетом длительности и характера контакта с живым организмом [1].

По характеру контакта материалы и изделия медицинского назначения подразделяются на три группы:

контактирующие с поверхностями покровных тканей (внешние протезы, электроды, изделия для ортодентии и ортопедии, контактные линзы, мочевыводящие катетеры, раневые покрытия);

не контактирующие непосредственно с организмом (внешние устройства) (системы для хранения и переливания крови, диализаторы, иммунносорбенты, системы дренирования, лапаро- и артроскопы, оксигенаторы);

имплантируемые изделия, контактирующие с тканью/костью (ортопедические шпильки, шовный материал, протезы), внутренней средой глаза (эндопротезы, интраокулярные линзы), кровью (артерио-венозные фистулы, протезы кровеносных сосудов, клапаны сердца).

По продолжительности контакта медицинские изделия подразделяются на три категории:

(А) ограниченное воздействие (до 24 ч),

(Б) длительное воздействие (от 24 ч до 30 сут),

(В) постоянный контакт (свыше 30 сут).

Перечень основных подходов к созданию медицинских материалов, основанных на существующих представлениях и гипотезах о механизме взаимодействия чужеродной поверхности с кровью и тканями организма, приведен в [табл. 3.4](#).

Таблица 3.4

Возможные эффекты взаимодействия полимерных материалов с биологическими средами

Длительность взаимодействия	Эффект
Непродолжительный контакт (от минут до нескольких часов)	Набухание Адсорбция ионов и белков Адгезия и разрушение клеточных элементов крови Активация факторов свертывания Локальные тромбозы Инициирование местной воспалительной реакции Инициирование активации системы комплемента Инициирование фибринолиза Инициирование эмболизации
Продолжительный контакт (от нескольких часов до дней)	Изменения в характере адсорбции белков Усиление реакции клеточных компонентов крови Развитие процессов коагуляции Развитие фибринолиза Развитие хронической воспалительной реакции Развитие процессов эмболизации
Длительный контакт (месяцы, годы)	Эмболизация Кальцификация Канцерогенез Биодеградация Капсуляция фиброзной тканью, рост паннуса

Санитарно-химические методы, включающие измерения pH-, УФ- и ИК-спектроскопии, позволяют понять природу реакции организма на имплантируемый материал. Рекомендовано также анализировать окисляемость и бромируемость водных вытяжек из полимеров для оценки стабильности материала и потенциальной миграции в среду продуктов синтеза полимера и технологических стабилизаторов и добавок. Важным моментом является изучение механо-физических свойств материала и изделий, включая топографию и микроструктуру поверхности, электрические, температурные, динамические и др. свойства. Следует анализировать также методы, приемлемые для переработки материала в специальные изделия, необходимость применения специальных технологических добавок и их природу, а также отношение материала к общепринятым методам стерилизации.

Токсикологические исследования биоматериалов включают биологические тесты *in vitro* и *in vivo* (раздражающий эффект, цитотоксичность, на острую токсичность, гемолитическое действие, биодеградацию, имплантацион-

ные тесты с последующим морфологическим анализом); иммунологические методы; мутагенность, канцерогенность, воздействие на репродуктивную функцию, перинатальное и постнатальное развитие.

Цитотоксичность материала, экстрактов и изделий на его основе исследуют *in vitro* на различных клетках. Последние проводят на различных типах клеток (фибробластах, моноцитах, лимфоцитах, макрофагах и др.) с целью оценки реакции клеток на инородный материал, например, жизнеспособности по интенсивности матричных процессов (включение ^3H -тимидина ядрами, окрашивание трипановым синим) и высвобождения клетками специфических компонентов и тканевых медиаторов, а также для того, чтобы получить количественные оценки. Данные тесты позволяют выявить прямое воздействие химических веществ, составляющих материал.

Тест на раздражение позволяет определить способность материала или его экстракта вызывать воспалительную реакцию при прямом контакте с тканью *in vivo*.

С помощью *имплантационного теста* оценивают местное (макро- и микроскопическое) патогенное воздействие имплантата на ткани.

Исследование общей (острой) токсичности направлено на определение летальной дозы материала или вытяжки (ЛД) или ЛД₅₀ и выявление возможного токсического эффекта материала при однократном или многократном воздействии в течение периода времени (менее 24 ч).

Субхроническая (не менее 90 сут) и хроническая токсичность (свыше 90 сут) определяется для материалов, предназначенных для длительного контакта с внутренней средой организма. В ходе эксперимента анализируют поведение животных, динамику их привесов, массу внутренних органов, формулу крови.

Сенсибилизационный тест применяют для выявления возможных проявлений аллергических реакций организма под воздействием веществ, экстрагируемых из материала.

В качестве дополнительных методов рекомендованы следующие тесты: на генотоксичность, эмбриотоксичность и канцерогенность.

Исследование гемосовместимых свойств материалов проводится в системах *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* по набору методов, характеризующих процессы взаимодействия материала с кровью, включая изменения свойств компонентов крови и собственно материала или изделия. Для оценки гемосовместимости новых полимерных материалов, исходя из многофакторности данного понятия, в настоящее время принята комплексная система методов, разработанная в рамках межправительственной (СССР – США) программы «Исследование и разработка искусственного сердца», а также международной рабочей группой «Взаимодействие синтетических полимеров с живыми системами» при Международном союзе по теоретической и прикладной химии (ИЮПАК). Данная система методов является составной частью международного стандарта ИСО 10 993 по оценке биологической безопасности медицинских материалов и изделий и предусматривает исследование физико-химических и физико-механических характеристик, а также два уровня оцен-

ки собственно гемосовместимых свойств тестируемых материалов. Первый уровень исследования включает экспресс-методы предварительной оценки гемосовместимых свойств (определение времени рекальцификации, оптической плотности супернатанта, количества адгезированных тромбоцитов). Второй уровень предусматривает исследование реакции высвобождения тромбоцитов, степени распластывания адгезированных тромбоцитов, активации системы комплемента, динамики адсорбции альбумина и кальция.

Тканевая реакция на имплантат является важным моментом в оценке биосовместимости имплантируемого материала. Эксперименты *in vivo* предусматривают имплантирование материала (в виде пленок, губок, волокон, пластин) подкожно, внутримышечно, внутрибрюшинно, а также в органы и сосуды на различные сроки в зависимости от конкретных задач. В ходе опытов оценивается общая реакция организма и местная тканей, а также структура и морфология внутренних органов, в которых возможна аккумуляция продуктов деструкции материала.

Испытания на склонность к кальцификации (то есть образование кальцийсодержащих отложений на поверхности или в объеме имплантируемых изделий) проводят доступными физико-химическими, радиоиммунными, биохимическими и гистологическими методами) *in vitro* (анализируют отсутствие накопления кальция в ходе инкубации материала в крови) и *in vivo* (по анализу отложений кальция (фосфатов) в течение 3–4 недель имплантации для биоткани и 4–6 недель – для других полимерных материалов).

Таким образом, для изучения биосовместимости новых материалов необходим комплексный подход с использованием различных методов изучения общих ответных реакций организма, морфологических и биохимических процессов в тканях, контактирующих с материалом, а также биодеструкции собственно материала и (или) медицинского изделия.

3.2. Методы переработки материалов для получения специализированных конструкций и изделий биомедицинского назначения

Широкая гамма материалов, пригодных для биомедицины, позволяет получать различные изделия и конструкции от механически непрочных систем в виде гелей и растворов, микрочастиц, порошков и пленок до механически прочных объемных конструкций. Одной из привлекательных характеристик полимеров является простота их обработки. Из полимерных материалов возможно получение широкого спектра изделий (пленок, мембран, объемных конструкций, волокон, пористых матриц, микрочастиц) различными способами, в том числе из образцов полимеров, находящихся в различных фазовых состояниях. Полимеры можно перерабатывать различными методами, прежде всего из расплавов, а также холодным прессованием, поливом из растворов, гель-технологий и др.

3.2.1. Получение гидрогелей

Гидрогели – это нерастворимые разбухающие в воде сетчатые структуры, имеющие возможные области применения для реконструкции мягких тканей и тканей органов, а также пригодные для доставки лекарственных систем и матриц для тканевой инженерии.

Гидрогели формируются в разнообразных реакциях как из мономеров, так и из больших макромолекул; они могут быть представлены одним типом мономеров и полувзаимопроникающими сетками, в которых один мономер полимеризуется внутри уже сформированной сетки. Варьирование типа гидрогеля позволяет иметь системы с различными свойствами. Механизмы формирования гелей различны; гидрогели образуются в результате физической и химической желатинизации.

Физическая желатинизация происходит, когда цепи полимера связываются посредством ионных взаимодействий, водородной связи, молекулярных переплетений или в силу характера водоотталкивания материала. Эти гели являются гетерогенными в силу сложности межполимерных взаимодействий.

Альтернативный процесс представляет собой химическую желатинизацию, где цепи гидрогеля ковалентно связаны. В этом процессе используются такие методы, как радиация – добавление химических сшивок и использование многофункциональных реактивных составов. Гидрогели, как правило, являются гетерогенными в силу колебаний плотности сшивающих связей. Примером химической желатинизации будет полимеризация метакрилата полиэтиленгликоля в присутствии инициатора (либо источника света, либо при нагревании). Реактивные группы могут располагаться в конце, в качестве подвешенных боковых групп, или на всем протяжении главной цепи мономера. Эти полимеризации управляются изменениями условий инициации, то есть концентрацией инициатора, интенсивностью иницирующего света или температурой.

Свойства гидрогелей (набухание, механические свойства, разрушаемость) важны для определения области их применения. Гидрогели из-за высокого содержания воды имеют низкие механические свойства. Распространенным способом контроля механических свойств гидрогелей является изменение плотности сшивания полимера. Механика гидрогеля зависит от условий полимеризации при формировании сети. Так, большое количество растворителя во время полимеризации может привести к большей циклизации в формирующейся сети геля; изменения pH, температуры или интенсивности света в ходе реакции гелеобразования также существенно влияют на свойства гидрогелей. В свою очередь, механические свойства гидрогеля определяют характер его набухания. *Набухание* – это мера содержания воды в сети геля; оно определяется как соотношение массы (или объема) сети в набухом состоянии к массе (или объему сети) в сухом состоянии. Способность геля поглощать воду (набухать) влияет на транспортировку и диффузию веществ внутри гидрогеля, что определяет его функциональные характеристики при эксплуатации. Набухание является также динамическим

процессом, так как в течение времени структура геля изменяется по ходу его разрушения. Разрушение (распад) гидрогелей происходит в результате различных процессов: в присутствии фермента, разрезающего главную цепь гидрогеля; в результате гидролитического распада (в присутствии воды). Способность контролировать распад гидрогеля является важной для применения, поскольку распад контролирует такие свойства, как размер ячейки гидрогеля, что важно для транспорта захваченных молекул и диффузии внеклеточных компонентов матрицы.

Известно множество типов гидрогелей, полученных как из природных, так и синтетических материалов (табл. 3.5). Наибольшее распространение для формирования гелей получили фибрин, коллаген, гиалуроновая кислота (ГК). Коллаген обычно сшивается с помощью глутарового альдегида, карбодиимида, фотоокисления. Так же как коллаген, гиалуроновая кислота модифицируется химически этерификацией, в результате которой уменьшается растворимость в воде и замедляется распад геля. Гидрогели гиалуроновой кислоты пригодны для получения микросфер, губок и волокон. Описаны различные методы превращения ГК в гидрогели: фотосшивание, альдегидное сшивание, карбодиимидное сшивание. Для преобразования в гидрогель мономеры фибрина агрегируют связыванием водородом. Фибрин используют в качестве клеящих составов и герметиков в виде пены, листов, частиц и клея. Альгинат (природный полисахарид, состоящий из α-D-маннуроновой кислоты и β-L-гулуруоновой кислоты), образует гели в присутствии двухвалентных катионов (типа Ca²⁺, Mg²⁺) в результате сшивания карбоксилатных групп гулуруонатных групп на главной цепи полимера. Альгинатные гели широко используются в качестве перевязочного материала.

Таблица 3.5

Материалы, пригодные для получения гидрогелей

Природные полимеры	Синтетические полимеры
Фибрин	Полиэтиленгликоль
Коллаген и желатин	Полиакриловая кислота
Гиалуроновая кислота	Поливиниловый спирт
Альгинат	Полипептиды
Агароза	Полифосфазен
Хитозан	Полиоксиэтилметакрилат

Полиэтиленгликоль – широко используемый синтетический полимер, который для образования гелей модифицируют акрилатными или метакрилатными группами в присутствии инициаторов. Многие гидрогели из других синтетических полимеров находят применение для получения матриц тканевой инженерии.

3.2.2. Переработка термопластичных полимеров

Наличие выраженного диапазона между температурой начала плавления (150–160 °С) и температурой начала разложения ($T_{\text{разл.}}$) (260–280 °С) у термопластичных полимеров является существенно важным технологическим свойством, так как делает возможным получение из них различных изделий общепринятыми термическими методами переработки полимерных материалов. Термопластичным полимерам может быть придана форма посредством вакуумного формования, компрессионного формования, выдавливания (экструзии), формования в пресс-формах.

Вакуумное формование схематически показано на [рис. 3.9](#). Лист полимера нагревается инфракрасной радиацией выше температуры стеклования полимера. Затем полимер вытягивается на шаблон посредством отрицательного давления или вакуума. Шаблоны или формы относительно просты для изготовления и относительно недороги. Однако существуют весьма строгие ограничения, касающиеся сложности производимой формы из расплава полимеров.

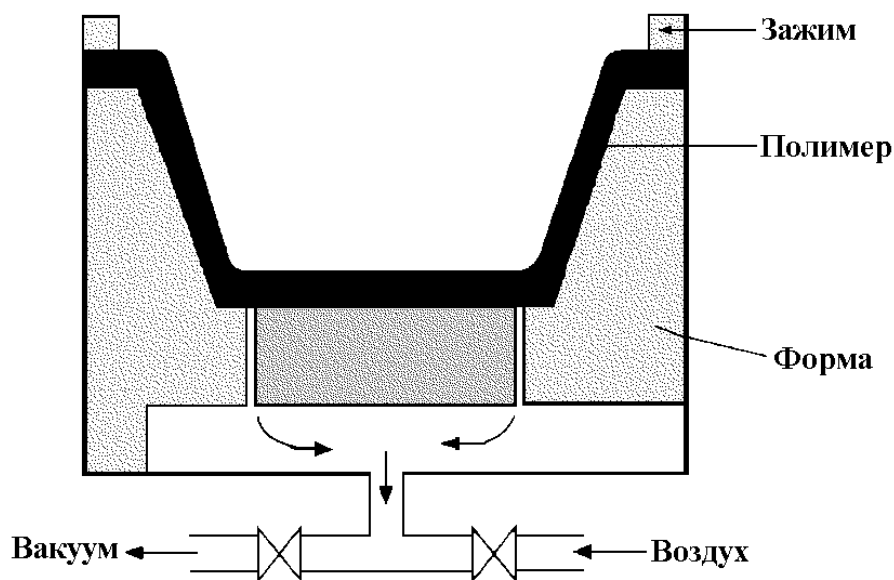


Рис. 3.9. Принцип вакуумного формования

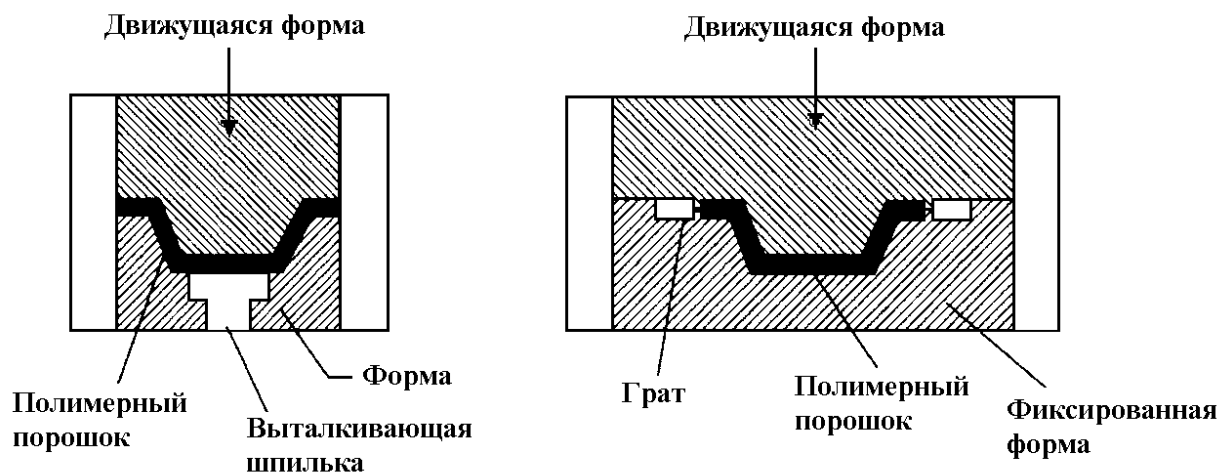


Рис. 3.10. Принцип компрессионного формования

Компрессионное формование схематично изображено на [рис. 3.10](#). Гранулы полимера нагреваются в форме заданной конфигурации. Как только температура является достаточной для превращения полимера в пластическую массу, две половины формы соединяются, и излишек полимера выдавливается между ними. Формы являются относительно простыми и дешевыми для изготовления, однако технология трудоемка и требует много времени по сравнению с пресс-формами.

Выдавливание (экструзия) – это технология, когда расплавленный полимер вдавливается в штамп и используется для производства деталей с фиксированной площадью сечения, в частности трубчатых конструкций и прутков. Формование в пресс-формах схематически изображено на [рис. 3.11](#). Технология включает Архимедов винт, заключенный в барабан, в который с одного конца подаются твердые гранулы полимера. По мере продвижения полимера в шнеке он расплавляется и продавливается в форму.

Одним из ключевых свойств термопластичных полимеров являются реологические характеристики расплавов, прежде всего вязкость при удлинении (*extensional viscosity*), толщина при удлинении и увеличение вязкости при удлинении (или текучести). Эти характеристики важны для стабилизации полимеров в процессах их переработки, включая такие процессы, как вытягивание из расплава (выдувание пленок, вытягивание и скручивание волокон, покрытия расплавами и т. п.). Полимеры, имеющие низкую прочность расплавов, не способны противостоять нагрузкам, имеющим место при термическом процессе, не стабильны и подвержены деструкции. Реологические характеристики расплавов полимеров различной структуры зависят от параметров обработки. По мере снижения вязкости расплава полимеров может значительно возрастать скорость обрыва («shear thinning»). Увеличение молекулярного веса полимера ведет к возрастанию сдвиговой вязкости («shear viscosity») и вязкости при удлинении («extensional viscosity»). Прочность расплава может быть повышена ветвлением линейных полимеров. Разветвленные композиты полимеров могут быть получены путем введения реагентов

в ходе экструзии, когда температура экструзии и время реакции достаточны для плавления полимера и выше температуры разложения 3-радикального индуктора, например, пероксида. Установлено, что при введении пероксида в расплавы отдельных полимеров инициируются конкурирующие реакции, приводящие к разрывам полимерной цепи и встраиванию в нее боковых цепей. Варьируя температуру экструзии и содержание 3-радикального индуктора, можно контролировать конечный молекулярный вес и степень разветвления полимеров. Установлено, что в результате ветвления линейных полимеров замедляются процессы старения изделий из них.

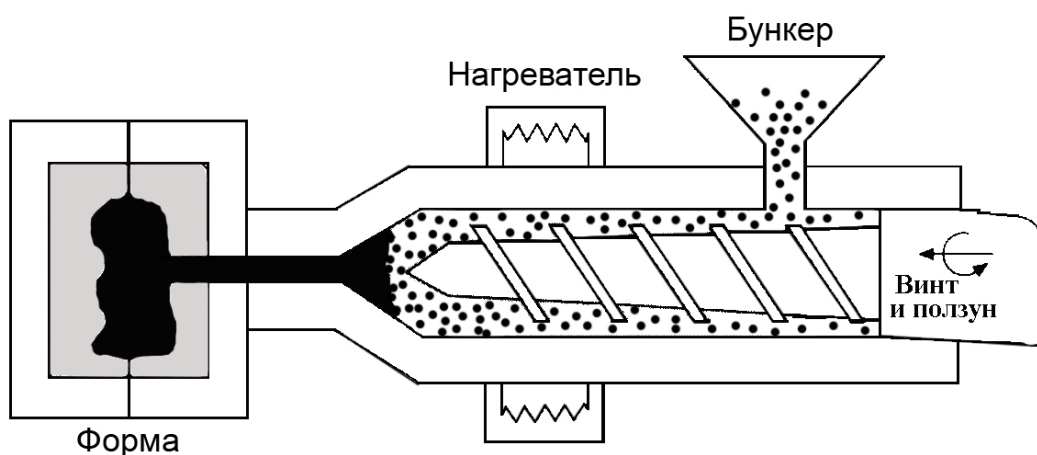


Рис. 3.11. Инжекторное литье

3.2.3. Переработка композитов керамики и полимеров

Основные требования, предъявляемые к процессам формования полимер-керамических смесей и отличающиеся от обычной технологии переработки пластических масс, заключаются в следующем: полимер-керамические смеси с содержанием полимерного связующего 10–20 % (30–60 объемн. %) с низкой вязкостью расплава должны обеспечивать формование изделий сложной формы при широком интервале температур выгорания полимерного связующего и получение бездефектных изделий после спекания. Полимерное связующее представляет собой многокомпонентную систему, в состав которой входят полимеры (термопласты, реактопласты или их смеси), смазки, пластификаторы, диспергаторы, поверхностно-активные вещества, пептизаторы и другие функциональные добавки. Большинство термопластов и многие реактопласты запатентованы в качестве компонентов полимерного связующего. В настоящее время к достижениям в области формования относятся разработанные способы оптимизации составов или новые способы получения и переработки полимер-керамических систем. Например, для равномерного распределения полимерного связующего, повышения текучести полимер-керамической массы и производительности процесса литья под давлением фирмой «Rayon Co., Ltd» (Англия) предложен следующий состав ор-

ганического связующего: на 100 массовых частей керамического порошка 3–30 массовых частей термопластичной смолы (полиэтилена и парафина – по 0,1–20 массовых частей) и пластификатора (например, дибутилфталата). Наряду с этими традиционными компонентами, связующие дополнительно могут содержать простые соединения (спирты, амины, карбоновые кислоты, полиамины, полиамиды и др.), а в качестве алкиленоксида – этиленоксид, пропиленоксид и (или) бутиленоксид. В качестве основных полимерных компонентов, связующих керамики, используют также полиуретан и алифатический поликарбонат.

Изделия, сформованные из полимер-керамической смеси на основе термопласта, покрывают слоем силиконовой, фторсодержащей полиамидной, полифениленсульфидной или другой стойкой к нагреванию смолы. Часть поверхности изделия оставляют непокрытой. Далее связующее и покрытие удаляют путем нагрева. Фирма «Toyota Dzidosya Co., Ltd» (Япония) разработала способ формования высокопрочных керамических изделий сложной конфигурации, большой толщины, исключая образование внутренних и поверхностных дефектов. Согласно этому способу смесь готовят из керамического порошка и органического связующего, формуют изделие, нагревают до удаления 90–95 % органического вещества, покрывают заготовку пленкой из силиконовой резины и прессуют под давлением 30–140 МПа. Затем изделие нагревают до 700 °С до удаления оставшегося связующего и пленки резины и спекают при 1500–1800 °С.

Способ изготовления тонкостенных изделий из керамики с толщиной стенки менее 1 мм разработан фирмой «Sin Nissoka-ko K. K.» (Япония). С помощью литьевой машины сначала отливают основу, например, из поликарбоната, не размягчающуюся при температуре 60–100 °С, поверх которой отливают тонкостенную формовку из смеси керамики и связующего, размягчающуюся при температуре 60–100 °С. Таким способом можно получать изделия с толщиной стенки около 0,1 мм. Качество керамических изделий во многом определяется эффективностью смешения и диспергирования компонентов органического связующего и керамического порошка.

Известен способ изготовления керамических пористых конструкций; фирма «Nippon Denco Co., Ltd» (Япония) получает такие изделия на основе пенополиуретана, представляющего собой систему однонаправленных пор, открытых с одной стороны. Пенополиуретановую форму многократно пропитывают суспензией керамического порошка с последующим прокаливанием и спеканием. Таким образом, вопросы формования полимер-керамических смесей технологически отработаны достаточно полно. Совершенствование технических решений в этой области направлено в основном на достижение оптимальных составов и методов формования изделий. Анализ и сопоставление приведенных составов смесей позволяет получить разнообразные конструкционные материалы и изделия из них.

3.2.4. Переработка полимеров из растворов

В связи с хорошей растворимостью ряда полимеров в неполярных растворителях существует возможность использования вязких полимерных растворов для изготовления пленок и мембран, а также монофиламентных и полижильных хирургических волокон. В ряде случаев, наряду с гибкими пленками, востребованы пористые двух- и трехмерные матриксы. Одним из способов получения пористых матриксов из полимерных материалов является изготовление пленок из двухкомпонентных смесей и последующее выщелачивание одного из компонентов смеси в растворе, обладающего растворимостью только для одного компонента. Альтернативой такому способу служит техника образования волоконных структур или трехкомпонентные смеси, состоящие из растворов полимеров и осадителей. Растворы полимеров пригодны также для формования волокон. Прочные ориентированные волокна из ряда полимеров (ПМК, ПГК, ПГА) с хард-эластическими свойствами. На первом этапе из плотных полимерных растворов получают волокна, которые далее подвергают последующему ориентированию методом закаливания и вытяжения при нагреве. Если ориентирование проводить сразу после получения нитей, процесс кристаллизации полимера и, следовательно, характеристики волокон можно контролировать. Варьируя температуру, при которой проводится вытягивание нитей, можно влиять на размер образующихся кристаллитов в изделии и, значит, прочность изделия.

Перспективным методом получения нетканых полимерных материалов, в том числе волокон и мембран, является метод электростатического формования (ЭСФ) – «electrospinning». Этот термин возник на базе словосочетания «electrostatic spinning» и вошел в научную литературу сравнительно недавно (1994 г.), хотя фундаментальная основа метода была заложена в 60-е годы прошлого столетия, когда было запатентовано несколько вариантов способов получения волокон с использованием электростатической силы. Принцип метода заключается в образовании филаментов в сильном электрическом поле, возникающем между двумя электродами противоположной зарядности, при этом один электрод помещается в раствор или расплав полимерного материала, второй размещается на приемном металлическом коллекторе (матрице). Типичная установка для электростатического формования (ЭСФ) состоит из трех основных частей: капилляра, в который с постоянной скоростью подается раствор полимера, металлической мишени и источника высокого напряжения ([рис. 3.12](#)).

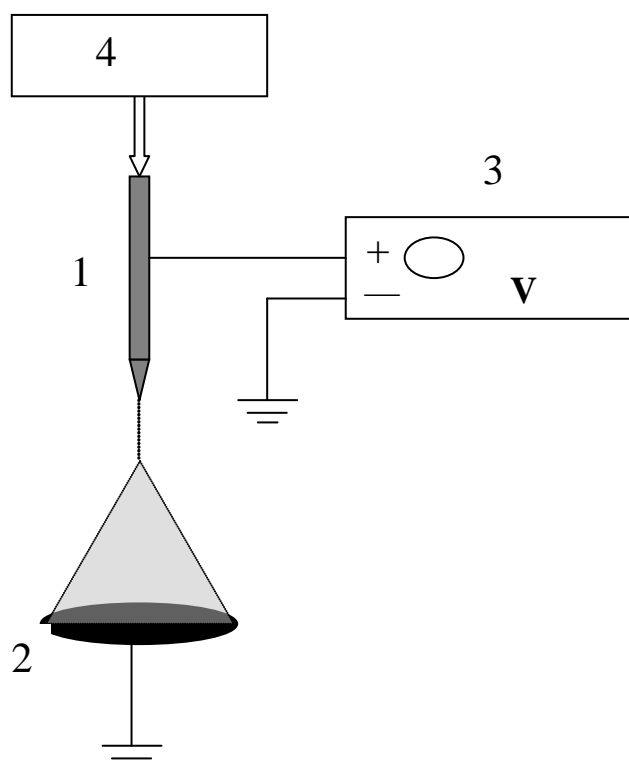


Рис. 3.12. Схема установки для электростатического прядения полимеров: 1 – капилляр; 2 – заземленная металлическая мишень; 3 – источник высокого напряжения; 4 – насос для подачи полимерного раствора [Волова, Гордеев]

Раствор полимера вытекает из капилляра и под действием электростатического поля формирует тонкую положительно заряженную струю, которая движется по направлению мишени. Поскольку отдельные части струи, обладая одинаковым зарядом, отталкивают друг друга, струя начинает вращаться, формируя конус в пространстве между концом иглы и мишенью, который в большинстве случаев можно наблюдать невооруженным глазом. В результате волокна ложатся на мишень в случайном порядке и формируют сетку изотропно ориентированных волокон.

Метод ЭСФ позволяет получать ультра- и нанотонкие волокна и пористые структуры на их основе из растворов и расплавов полимеров различного строения. Этот метод получил сильное развитие в последние годы в связи с потребностями новых биомедицинских технологий клеточной и тканевой инженерии. К настоящему моменту описаны различные варианты метода для формования волокон и мембран из полимеров различного типа (желатина, карбоксиметилцеллюлозы, полиэтиленоксида, полилактида, полиуретанов, поливинилового спирта, политриметилтерифталата, диметилформамида и др.).

ГЛАВА 4. ТКАНЕВАЯ РЕАКЦИЯ НА ИМПЛАНТАТЫ

4.1. Реакция организма на имплантацию материалов и процессы взаимодействия с ними

Получение фундаментальной основы для разработки и реализации новых материалов, устройств и технологий реконструктивной медицины требует комплексных исследований. Связано это с тем, что для понимания механизма взаимодействия имплантатов с тканями организма необходимы глубокие исследования закономерностей ответа организма на инородное тело, характера регенераторного процесса, с одной стороны, и изучение «судьбы» (включая кинетику биодеструкции и динамику прочностных свойств) имплантируемого материала – с другой. Имплантированный материал/изделие и живой организм при контакте подвержены взаимовлиянию, как правило, негативного характера. При этом характер и степень выраженности этого воздействия определяется как комплексом физико-химических свойств собственно материала, массой и геометрией имплантата, так и природой и силой ответных физиолого-биохимических реакций организма-хозяина [1; 2].

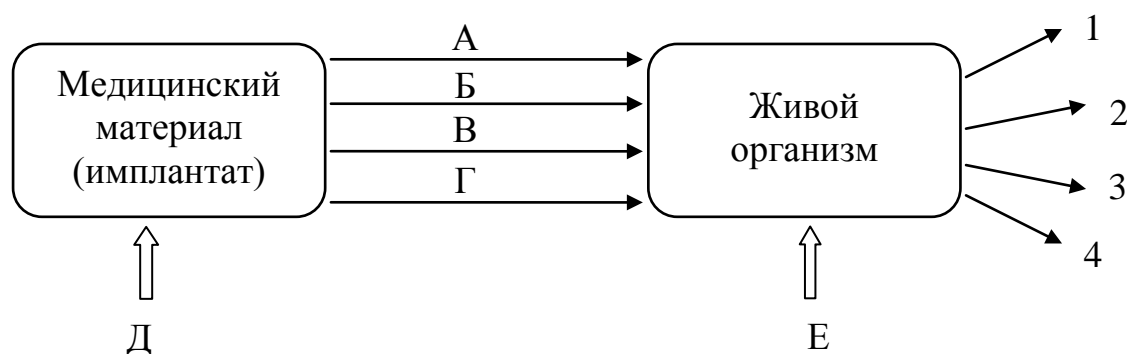


Рис 4.1. Схема реакции организма на имплантируемый материал: А – химические факторы: основные составляющие полимеры (вещества, переходящие в раствор). Б – механические факторы: конфигурация, размеры, характеристика поверхности. В – факторы температурно-электрического характера. Г – биологические факторы: действие организма и микроорганизмов. Д – физические характеристики: прочностные, температурные, механико-физические свойства. Е – габитус, пол, возраст, иммунные свойства, условия циркуляции крови, место имплантации. 1 – быстрая реакция всего организма (аллергия, острое отравление, высокая температура, нервно-паралитические реакции); 2 – замедленная реакция организма: реакция антигенов и антител, неострое отравление, тератогенные явления, аномальные рефлексy; 3 – быстрая реакция на участке имплантации: острое воспаление, распад и некроз ткани, активное вторжение и экскремирование инородного тела; 4 – замедленная локальная реакция: хроническое воспаление, образование и рост гранулемы, рост соединительной ткани, осаждение известковых отложений, сращение, образование злокачественной опухоли, тромбоз

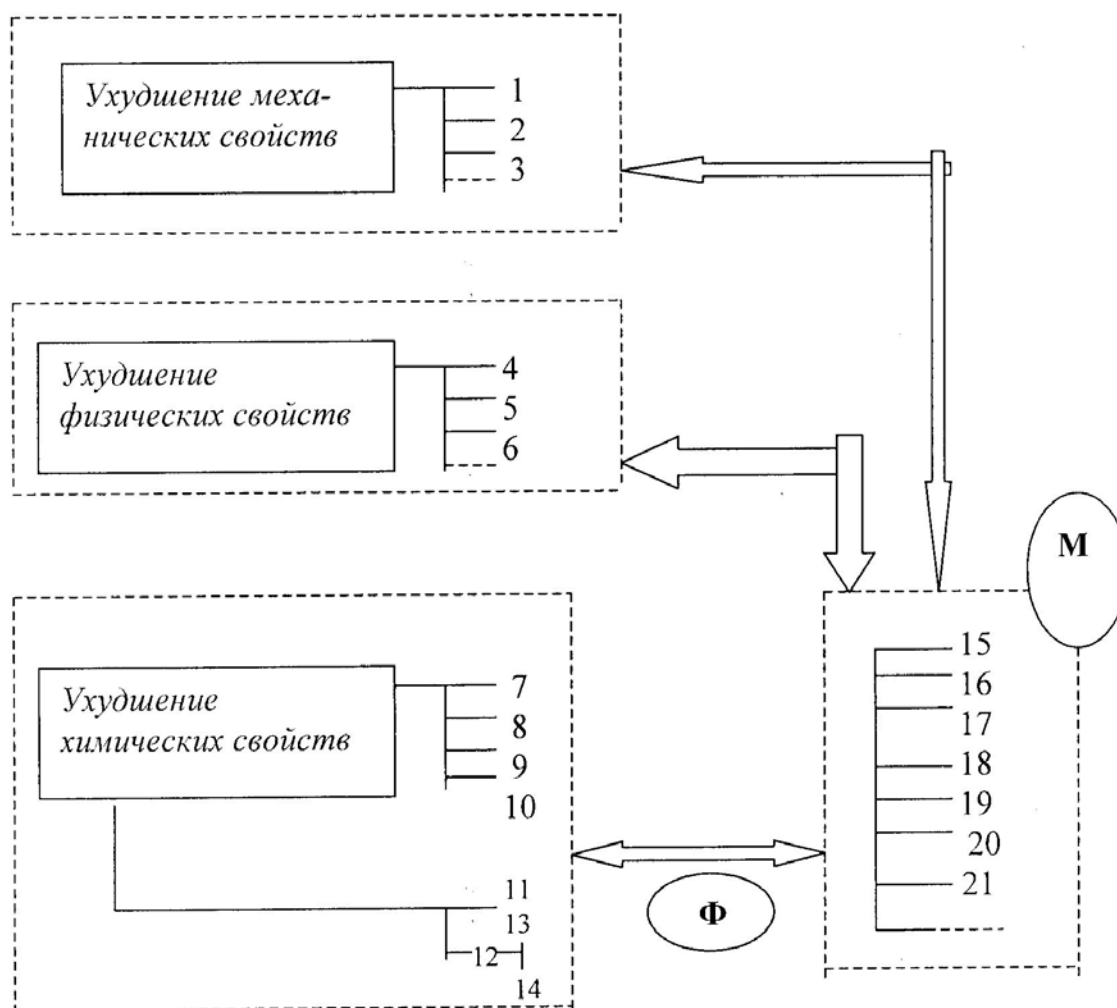


Рис. 4.2. Биодegradационные изменения биоматериала в организме: 1 – трение, 2 – ударная нагрузка, 3 – многократный изгиб, 4 – переход в раствор, 5 – адсорбция, 6 – известковые отложения, 7 – разложение основной макромолекулярной цепи, 8 – разложение боковых цепей, 9 – сшивание основных цепей, 10 – сшивание боковых цепей, 12 – нецепное разложение, 13 – статистическое разложение, 14 – органическое разложение, 15 – природа химических связей, 16 – влияние смежных групп и атомов (эффект заместителей), 17 – конформационные преобразования, 18 – кристалличность, степень сшивания, 19 – структура поверхности, 20 – конфигурация, 21 – отношение к внешней среде (гидрофобность, гидрофильность). Φ – ферментные реакции. M – характеристики материала

Имплантация в организм чужеродного материала неизбежно вызывает клеточную реакцию, расцениваемую обычно как асептическое воспаление. Эта реакция является защитной функцией тканей и направлена на их регенерацию (рис. 4.1).

Имплантат под воздействием организма, в свою очередь, также претерпевает различные изменения, причем биофизиологические факторы, влияющие на имплантируемый материал, весьма разнообразны (рис. 4.2).

После хирургического вмешательства и имплантации материала или

испытуемого изделия в месте имплантации развивается асептическое воспаление тканей, которое принято подразделять на несколько стадий: альтерации (повреждения), экссудации и пролиферации; последняя также является первой стадией репаративной регенерации [27] (рис. 4.3). Воспалительный процесс ведет к пролиферации фибробластов, которые продуцируют компоненты экстрацеллюлярного матрикса, включая коллагеновые волокна. Далее происходит процесс формирования фиброзной капсулы, которая изолирует инородное тело от окружающих его тканей. Интенсивность воспаления и длительность регенеративных процессов зависят от природы имплантируемого материала, степени его биосовместимости. Течение этих процессов имеет свои особенности в каждом конкретном случае. Поэтому новые биоматериалы медицинского назначения необходимо подвергать токсикологическим и морфологическим исследованиям в условиях *in vivo*. Характер клеточной и тканевой реакции на имплантат зависят от комплекса параметров, – химической структуры материала, стабильности (или нестабильности) в биологических средах, химико-биологических свойств продуктов разрушения материала, формы и массы имплантата, места введения в организм и пр.

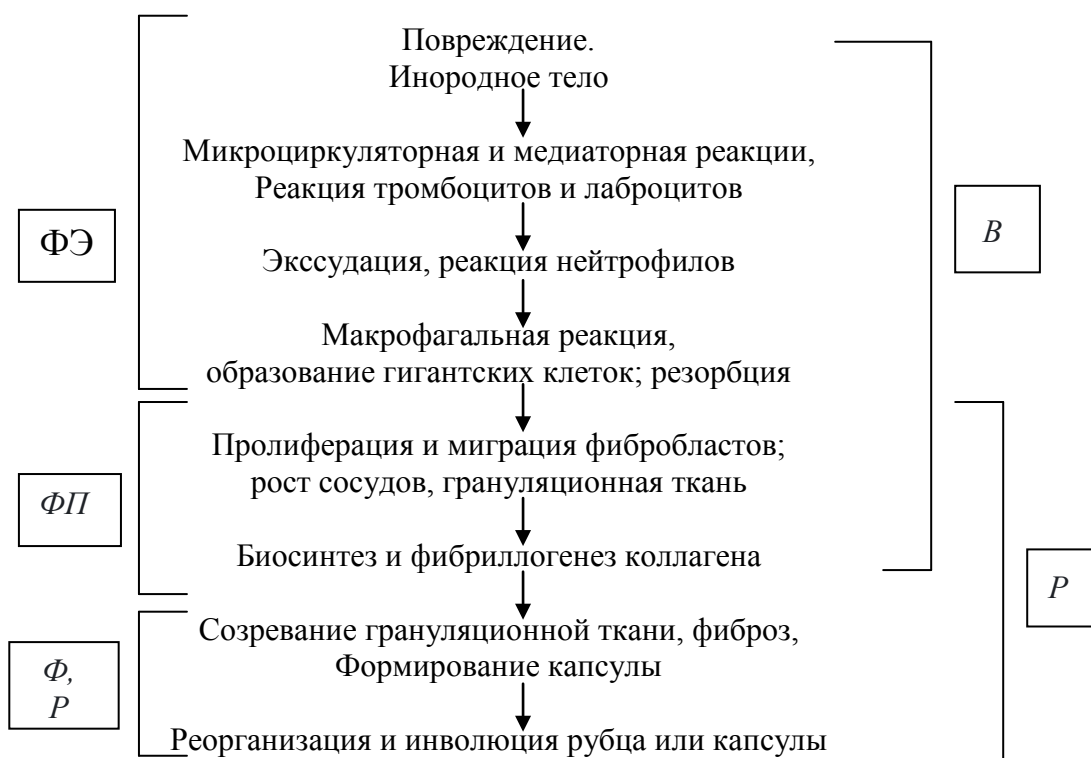


Рис. 4.3. Кинетика воспалительно-репаративной реакции тканей на имплантацию:
 ФЭ – фаза экссудации; ФП – фаза пролиферации; Ф, Р – фиброз, рубцевание;
 В – воспаление; Р – регенерация

Первые две стадии, экссудативную и пролиферативную, иногда подразделяют на нейтрофильную, макрофагальную и фибробластическую фазы.

Нейтрофильная фаза наступает в первые часы после хирургического вмешательства, олиморфоядерные лимфоциты (ПЯЛ) из сосудов мигрируют в сторону источника раздражения, окружая его, образуя через 6–12 ч лейкоцитарный вал. Время жизни ПЯЛ короткое; в течение суток миграция нейтрофильных лейкоцитов прекращается, они начинают распадаться. В месте острого воспаления накапливаются недоокисленные продукты, прежде всего, молочная кислота, развивается ацидоз тканей, происходит перекисное окисление липидов. В данной фазе продукты секреции и распада ПЯЛ активируют системы комплемента, свертывания и фибринолиза и вызывают дегрануляцию тучных клеток. Эти факторы стимулируют образование из эмигрировавших из сосудов моноцитов макрофагов и их хемотаксис. В адгезированных на поверхности имплантата клетках происходит активация ферментов. Далее основными клетками (рис 4.4) становятся макрофаги (макрофагальная стадия), которые внедряются в лейкоцитарный вал и фагоцитируют клеточный детрит, продукты распада тканей и имплантированного материала. Макрофаги окружают инородное тело и формируют нейтрофильно-макрофагальный → макрофагальный → макрофагально-фибробластический барьеры, которые предшествуют образованию грануляционной ткани. Макрофаги взаимодействуют с другими клетками через секретируемые медиаторы (к настоящему времени среди них выделено свыше 40). Макрофагам отводится одна из основных ролей в определении биосовместимости имплантируемых материалов.

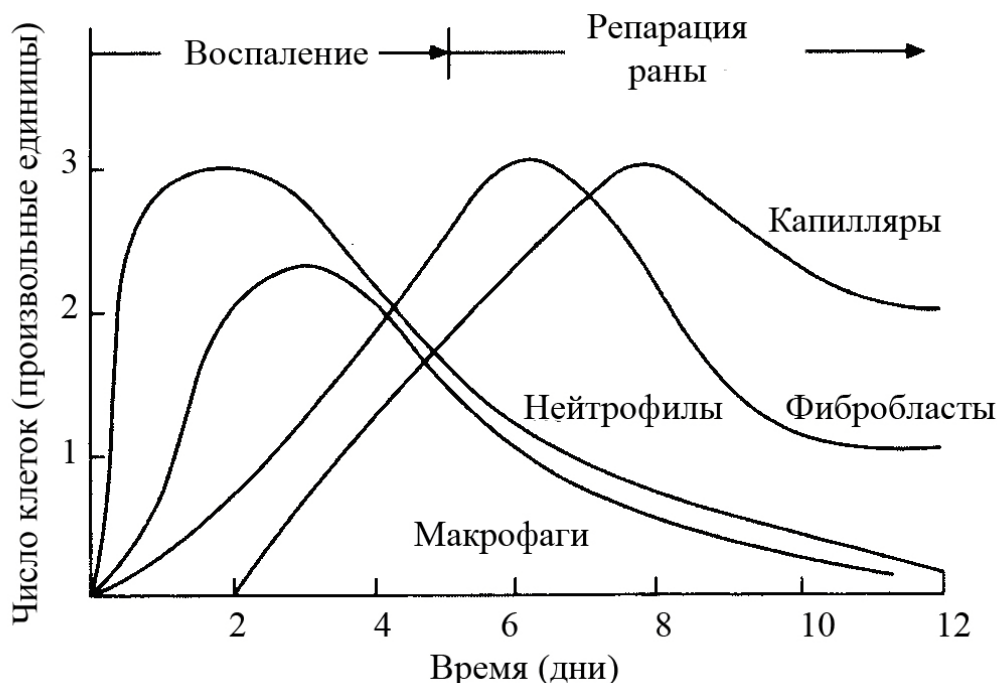


Рис. 4.4. Динамика соотношения клеточных популяций при заживлении раны

В течение пролиферативной (или фибробластической) фазы делящиеся фибробласты под влиянием хемотаксиса мигрируют к имплантату, окружая

его рядами. Фибробласты участвуют в образовании коллагеновых волокон, в результате чего спустя 5–10 суток от начала воспаления вокруг инородного тела образуется соединительнотканная капсула. Последняя изолирует инородное тело от окружающих тканей. Формирующаяся вокруг биосовместимых материалов капсула, как правило, тонкая, а вокруг гистотоксических материалов образуется толстая и плотная капсула. По мере накопления фибробластов и коллагена их рост тормозится в результате взаимодействия волокон и клеток; последнее сопровождается синтезом в клетках ингибиторов роста (кейлонов), разрушением фибробластов, а также превращением их в неактивные фиброциты и фиброкласты, которые фагоцитируют коллагеновые волокна. В результате этих процессов происходит перестройка (ремоделиция) и инволюция соединительной ткани с истончением капсулы. При имплантации биоактивных неразрушаемых материалов в ходе формирования капсулы реализуется стадия образования грануляционной ткани (5–10 суток), в ходе которой, помимо пролиферации, происходит активное образование капилляров, этому способствуют воспалительная реакция и тканевая гипоксия, усиливающие рост сосудов. Последующее созревание и фиброзная трансформация грануляционной ткани ведут к регрессии капилляров и сокращению соединительной ткани. Зрелая капсула, как правило, сравнительно небольшой толщины с доминирующими зрелыми фибробластами и фиброцитами, с преобладанием волокнистых элементов матрикса над клетками, сравнительно небольшим количеством сосудов, со сформированным узким макрофагальным барьером на границе капсулы и имплантата с включением гигантских клеток.

При имплантировании биодеструктивных материалов процессы эволюции капсулы вокруг имплантата имеют иной характер. Макрофагальная реакция, следующая после нейтрофильной, не ослабевает, а наоборот усиливается. Это имеет место потому, что макрофаги и гигантские клетки инородных тел фагоцитируют и резорбируют биодеструктивные материалы. Ведущая роль в образовании гигантских многоядерных клеток (ГКИТ) принадлежит макрофагам, фагоцитирующим материал имплантата. Установлено, что ГКИТ образуются на поверхности или вокруг частиц имплантированного материала в результате слияния адгезированных макрофагов, а также при делении ядер макрофагов без клеточного деления.

Реакция на инородное тело с временным развитием грануляционной ткани с последующим созреванием в фиброзную можно считать нормальной реакцией на относительно биосовместимый материал. Длительность этого процесса зависит от природы материала и кинетики его деструкции, и может протекать от нескольких дней и недель до нескольких лет и постепенно завершаться замещением имплантата соединительной тканью, которая в свою очередь подвержена частичной или полной инволюции. В итоге в месте имплантата формируется рубцовая ткань или полностью регенерированная исходная ткань. В случае неблагоприятного развития могут иметь место плохое кровоснабжение толстой и плотной фиброзной капсулы и аккумуляция токсичных продуктов обмена, возникновение опухолей, кальцификация и инфицирование.

Основными факторами, определяющими течение процессов воспаления и капсулообразования, являются химический состав, структура материала, форма имплантата, а также место его имплантирования. Однако, несмотря на очевидную важность данных исследований для оценки биосовместимости биодеструктивных материалов, пока еще очень мало данных, характеризующих динамику течения тканевых процессов, включая учет и описания участвующих в этих процессах типов клеток, а также длительности отдельных фаз.

В последние годы стали появляться результаты исследования отдельных факторов, определяющих картину воспаления и регенерации тканей в месте имплантации, хотя в целом картина протекания комплекса процессов в системе «имплантат – хозяин» нуждается в глубоких исследованиях. Показано, что низкомолекулярные и легко вымываемые продукты влияют на начальную стадию воспаления (лейкоцитарную), а механические нагрузки на имплантат определяют адгезию макрофагов и слияние их в ГКИТ. На примере материала «Satowhite[®]» установлено, что введение в качестве добавок в него антиоксидантов снижает первоначальную адгезию макрофагов и скорость их слияния в ГКИТ; а введение в состав «Methacrol[®]» противовспенивающего агента может увеличивать начальную плотность макрофагов. При изучении имплантатов из политетрафторэтилена показано, что на тканевую реакцию влияют пористость материала; а при исследовании полилактидов обнаружено влияние степени кристалличности на тканевую реакцию, у полиуретанов – поверхностного заряда. Тканевая реакция на акриловые полимеры, используемые в стоматологии, связана со степенью их полимеризации, а тканевая реакция на коллаген существенно зависит от его чистоты. В наибольшей степени реакции тканей изучена на имплантирование изделий из разрушающихся полиуретанов. По отношению ко многим новым полимерам и композитам – потенциальному источнику материалов для аллопластики, сведения, касающиеся их взаимодействия с тканями, крайне ограничены.

Еще в меньшей степени исследованы взаимодействия в системе «полимер – ткань» в количественном аспекте. Вместе с тем данные методы весьма информативны. При морфометрических исследованиях реакции тканей на имплантат и течения регенеративных процессов показательными являются: среднее значение соединительной капсулы (параметр отражает интенсивность соединительнотканной реакции в зоне имплантации), индекс фиброзы (характеристика удельного объема коллагеновых волокон в новообразованной соединительной ткани), рядность фибробластов (показатель активности продукционной реакции в месте имплантации), профильный размер фибробластов (показатель их зрелости), макрофагально-капсулярные отношения (показатель интенсивности хронического воспаления), сосудисто-капсулярные отношения (показатель интенсивности кровоснабжения в новообразованной ткани). Примером, наглядно иллюстрирующим результаты комплексности исследования клеточной и тканевой реакции на имплантацию полимерного материала, являются результаты, полученные в ходе тестирования полимера гидроксимасляной кислоты (полигидроксibuтирата, ПГБ) – наиболее распространенного и изученного представителя класса резорбируе-

мых, термопластичных полиэфиров микробиологического происхождения (полигидроксиалканоатов, ПГА) ([рис. 4.5](#), [табл. 4.1](#)). Исследования включали сравнительную оценку реакции тканей на имплантаты ПГБ в виде моножильных шовных нитей; в качестве материала сравнения были взяты хирургический шелк марки «Black silk braided» и кетгут марки «Cutgut 0,41101» (HELM PHARMACEUTICALS GMBH, Германия). Шовные нити использованы для ушивания мышечно-фасциальных хирургических разрезов бедренной мышцы лабораторных животных.

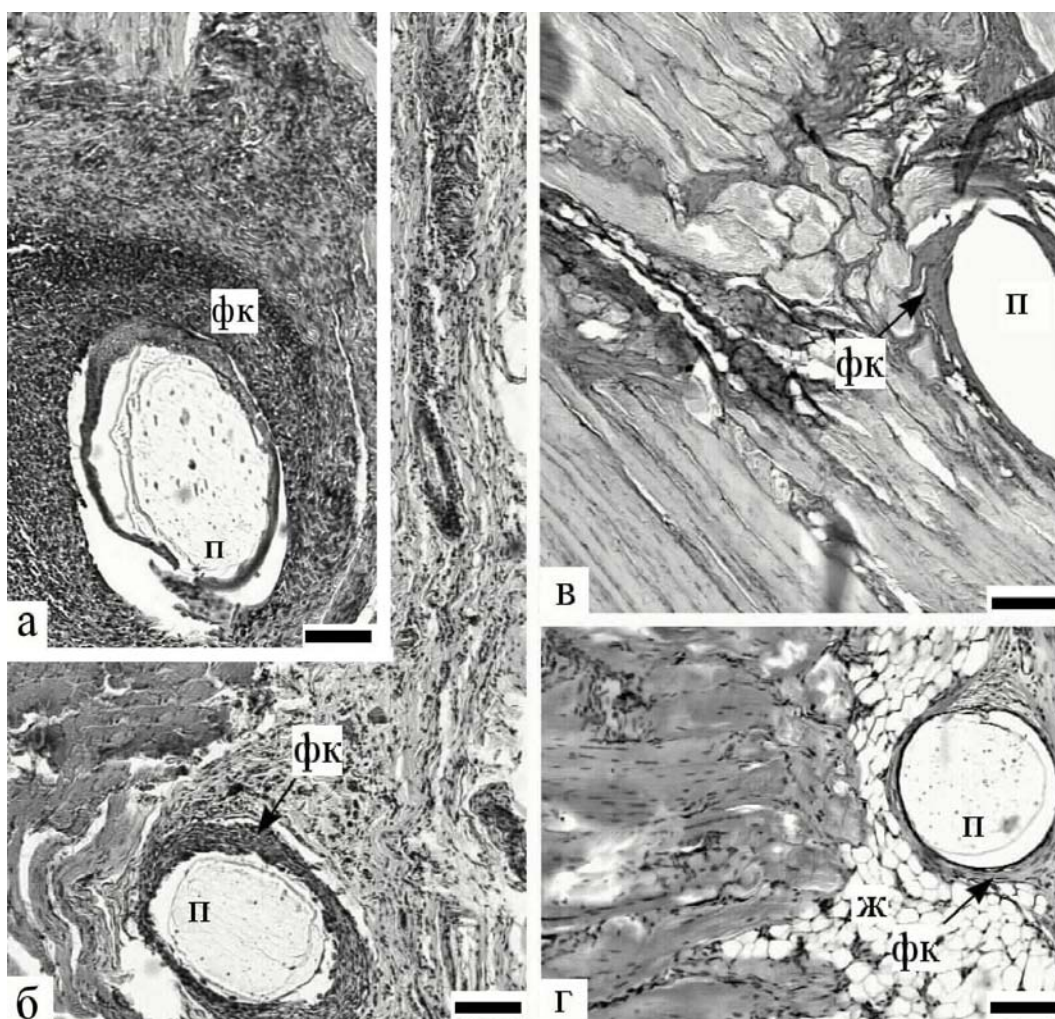


Рис. 4.5. Реакция тканей на имплантацию моножильных нитей, изготовленных из полимера гидроксимасляной кислоты (ПГБ) на сроках 4-я (а), 16-я (б) 24-я (в, г) недели после операции. Гематоксилин-эозин. Обозначения: п – полимер, фк – фиброзная капсула, ж – жировые клетки. Маркер – 0,01 мм (материалы и фото Е. Шишацкой)

Реакция тканей на оперативное вмешательство с последующей имплантацией экспериментального хирургического материала протекала по схеме, характерной для раневого процесса и реакции на инородное тело, и включала стадии посттравматического воспаления, новообразования соединительной ткани, формирования и перестройки рубца. Однако в ответе тканей выявлены отличия между исследуемыми шовными нитями из ПГБ и традиционным

шовным материалом. Эти различия выявлены на стадии посттравматического воспаления тканей и образования и реорганизации рубца; количественные данные, характеризующие ответ тканей, представлены в [табл. 4.1](#).

Микроскопическая картина в месте имплантации ПГБ на 7-е сутки после операции характеризовалась незначительным отеком тканей вокруг имплантированных нитей и единичными тонкими зонами некроза. Шовные нити были окружены преимущественно макрофагами и лимфоцитами, а также нейтрофилами и фибробластами. Отмечено начало формирования вокруг имплантатов фиброзных капсул. Реакция тканей вокруг экспериментальных нитей из ПГБ по силе воспаления была сопоставима с реакцией тканей на шелк и значительно менее выражена по сравнению с реакцией на кетгут.

Таблица 4.1

Морфометрические показатели реакции тканей на имплантацию шовного материала разного происхождения (Шишацкая) ($M^* \pm m$) [3]

Шовный материал	Время, недели	Толщина капсулы (ТК), мкм	Рядность фибробластов (РФ)	Количество макрофагов (поле/зр)
ПГБ	1	–	–	2,64±0,31
	2	116,98±6,46	9,07±0,58	6,36±0,42
	4	172,23±13,64	10,64±0,48	11,50±0,85
	8	161,20±5,93	9,50±0,57	13,56±0,87
	16	54,09±3,28	4,64±0,37	11,93±0,98
	24	48,02±5,25	3,50±0,32	10,50±0,85
Шелк	1	–	–	1,00±0,19
	2	126,99±2,70	13,29±0,75	1,36±0,14
	4	169,87±13,45	10,64±0,48	1,43±0,19
	8	173,17±5,46	11,43±0,81	1,14±0,19
	16	125,49±2,63	10,79±0,63	1,29±0,21
	24	132,54±3,84	9,71±0,37	1,21±0,23
Кетгут	1	–	–	5,21±0,66
	2	204,99±17,53	21,00±0,84	4,00±0,65
	4	422,25±6,51	38,79±1,01	5,64±0,70
	8	514,21±12,01	46,29±1,66	2,14±0,45
	16	342,00±9,68	21,76±0,84	2,43±0,45
	24	272,14±4,11	20,86±1,19	1,14±0,22

* – среднее из 15 измерений.

Через 2 недели после операции признаки воспаления уменьшились, незначительная отечность тканей вокруг всех имплантатов сохранялась; в зоне воспаления по-прежнему встречались лейкоцитарные клетки. В сформировавшихся вокруг имплантатов из ПГБ капсулах отмечено увеличение количества зрелых макрофагов секреторно-фагоцитарного типа, в среднем соответственно, до 6,36±0,42 в поле зрения. Для них характерно смещение складчатого ядра к одному из полюсов клетки, развитый комплекс Гольджи, довольно много митохондрий овальной или вытянутой формы. Значительная часть цитоплазмы макрофагов занята лизосомами и фагосомами; внешняя клеточ-

ная мембрана образует толстые короткие и пальцевидные выпячивания. Макрофаги сгруппированы, как правило, на внутренней стороне капсул, примыкающих к нитям. Среди окружающих тканей отмечены единичные гигантские клетки инородных тел с 4–6 ядрами. В капсуле вокруг кетгута в отличие от шелка также отмечено увеличение количества макрофагов (табл. 4.1). Через 4 недели после операции толщина фиброзных капсул вокруг имплантатов из ПГБ увеличилась до $172,23 \pm 13,64$ мкм. Это было сопоставимо с ТК вокруг шелка и в 2 раза меньше, чем ТК вокруг кетгута. Продолжало увеличиваться количество активных, с большим количеством выростов и клеточных лизосомальных структур макрофагов (до 11–12 в п/зр) и ГКИТ, а также активность КФ в них. Капсулы в основном были представлены фибробластами и коллагеновыми волокнами, которые начинали формироваться в пучки. Через 8 недель гистологическая картина тканей в зоне имплантации ПГБ оставалась практически без изменений, равно как и толщина капсул и их клеточный состав. Капсулы были пронизаны сосудами микроциркуляторного русла; в них преобладали коллагеновые волокна зрелого типа. В зоне, примыкающей к полимерным имплантатам из ПГБ, по-прежнему регистрировали большое количество активных макрофагов. В структуре ФК, окружающих имплантаты, идентифицированы активные фибробластические элементы и формирующиеся коллагеновые волокна. Средняя толщина капсул (ТК) вокруг ПГБ составила на этом сроке $161,20 \pm 5,93$ мкм; рядность фибробластов (РФ) – $9,50 \pm 0,57$. Это было сопоставимо с ТК вокруг шелка на этом сроке ($173,17 \pm 5,46$ мкм), однако увеличения количества макрофагальных клеток вокруг шелка не отмечено. В тканях, окружающих кетгут, по-прежнему отмечены лейкоцитарные клетки; толщина фиброзной капсулы составила $514,21 \pm 12,01$ мкм. Спустя 16 недель после операции вокруг экспериментальных имплантатов из ПГБ зафиксировано значительное истончение капсул до $54,09 \pm 3,28$ мкм при снижении РФ в них до $4,64 \pm 0,37$. Однако количество активных макрофагов в тканях, примыкающих к ПГБ-имплантатам, по-прежнему оставалось высоким. Отмечены макрофаги, расположенные непосредственно на полимерных волокнах; появились ГКИТ с 10–12 ядрами. Среди фибробластических элементов преобладали зрелые клетки. В периферических частях капсул наблюдали образование зрелой соединительной ткани в виде пучков коллагеновых волокон и прилегающих к ним цепочек фиброцитов. Здесь же определялись активные фагоцитирующие макрофаги и ГКИТ. Это позволяет предположить миграцию продуктов деструкции материала. Через 24 недели после операции отмечена дальнейшая инволюция фиброзных капсул вокруг экспериментальных полимерных имплантатов; ТК уменьшились до $48,02 \pm 5,25$ мкм. В капсулах преобладали зрелые коллагеновые волокна, в них по-прежнему присутствовали активные фагоцитирующие макрофаги. Дальнейшее наблюдение за состоянием тканей у животных, которым были имплантированы нити из ПГБ, не выявило неблагоприятных явлений в прилегающих тканях. Спустя 9 месяцев ТК вокруг нитей из ПГБ составляла 20–40 мкм. Имплантаты были окружены здоровыми тканями из вновь сформированных волокон, ориентированных вокруг нитей. Через 12

месяцев толщина фиброзных капсул не превышала 5–10 мкм. В непосредственной близости с нитями по-прежнему наблюдали значительное количество моно- и полиядерных макрофагальных клеток. Таким образом, установлено, что в течение 12-ти месяцев наблюдения в месте имплантации шовных волокон, изготовленных из ПГБ, неблагоприятных проявлений в виде гнойного воспаления, некроза, кальцификации и малигнизации фиброзных капсул не отмечено.

4.2. Кальцификация имплантатов

Кальцификация – это образование кальцийсодержащих отложений на поверхности или в объеме имплантатов. Это приводит к потере функциональных свойств протезов и необходимости реопераций. Данный процесс, однако, играет положительную роль при восстановительной хирургии костных тканей, когда процессу кальцификации подвергаются имплантированные конструкции (штифты, протезы суставов и др.). Негативные последствия этого процесса связаны с тем, что патологической кальцификации подвергаются искусственные материалы и изделия, используемые в сердечно-сосудистой хирургии, офтальмологии, урологии, при операциях на брюшной полости.

При исследовании причин и течения процесса кальцификации необходимо учитывать локализацию кальцийсодержащих отложений и их состав. Извлеченные после имплантации конструкции, подвергнутые кальцификации, изучают различными методами, включая физико-химические, радиоиммунологические, биохимические, гистологические, гистохимические, электронномикроскопические, радиоавтографические и др.

Локализация отложений бывает внутренней и внешней. В первом случае отложения располагаются внутри материала, например, для биотканей – внутри коллагенового волокна (внутрифибрилярно), а при внешней отложения формируются в межфибрилярном пространстве биоткани или на поверхности материалов. Существенную роль в месторасположении отложений играют механические нагрузки, которые испытывает имплантат. Как правило, фосфаты кальция обнаруживаются в местах интенсивных механических нагрузок независимо от типа биоматериала протеза. Это обусловлено, по-видимому, изменением энергетических характеристик поверхности при динамических нагрузках и появлением областей с возросшей внутренней энергией. При использовании для изготовления протезов материалов естественного происхождения возможно разрыхление структуры материала и повреждение самих волокон. Это сопровождается образованием так называемых «ловушек» для клеток или макрокомплексов, содержащих кальций, что стимулирует появление в последующем мест кристаллизации.

В ходе изучения состава кальцийсодержащих отложений необходимо учитывать соотношение органических и неорганических компонентов и роли

органической матрицы. Так, присутствие органических компонентов, прочно связанных с кристаллами гидроксиапатита, обнаружено с использованием трансмиссионной электронной микроскопии с применением декальцификации фиксированных срезов с последующей их окраской. Это позволило выявить, что органический материал в кальцинированных отложениях состоит из структур, воспроизводящих форму и ориентацию растворенного кристалла, называемых «теньями кристалла». Во многих исследованных, тканях эта «тень кристалла» обнаруживается в областях ранней кальцификации и в меньшей степени детектируется в районах полной кальцификации. Состав органических компонент зависит от типа минерализованных тканей, например, в хрящевой ткани присутствуют кислые группы, которые могут реагировать с кальцием, магнием, барием и другими катионами. Реакция периферической зоны «тени кристалла» коллоидным золотом при pH 2,0 указывает на наличие сульфатных групп.

Основу кальциевых отложений составляют фосфаты кальция. Анализ образцов полиуретанов («Авкотан» и «Биомер») после 168 дней имплантации показал, что они имеют следующий состав: остеокальцина 195 нг/мл; азота 5,8 %; фосфора 9,3 %; серы 0,41 %; кальция 18,15 %; карбоната 0,74 %. Молярное соотношение Ca/P, равное 1,88, свидетельствует о присутствии в отложениях гидроксиапатита (ГАП). Исследования имплантатов, изготовленных из различных материалов, подвергнутых кальцификации, имели практически одинаковый состав кальцинированных отложений на поверхности различных протезов из полимерных материалов и атеросклеротических бляшек в сосудах человека (остеокальцин, белки – альбумин и фибриноген, фосфолипиды), при этом некальцинированные участки не содержали остеокальцина. Основное отличие в составе отложений для кальцинированных биопротезов клапанов и минерализованных ревматически стенозированных митральных клапанов сердца человека заключалось в более высоком содержании кислых фосфатов (11 % по сравнению с 5,5 %), большей степенью растворимости отложений и более низким соотношением Ca/P. Все эти соли, за исключением монокальцийфосфата, плохо растворимы в воде. Однако продолжительное воздействие избытка воды на любой фосфат кальция приводит к образованию гидроксиапатита, если в состав системы входят только CaO, P₂O₅ и вода. Из полученных различными методами разновидностей ГАП (с отношением Ca/P от 1,3 до 2), многие не имеют стехиометрического состава, соответствующего идеальной формуле с молярным соотношением Ca:P = 5:3 (1,67). Установлено, что при продолжительной обработке водой ГАП с соотношением Ca/P больше или меньше 1,67, состав отложений изменяется,

и они превращаются в вещество, которому приписывают формулу Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂. Кинетика образования новой фазы определяется двумя стадиями: образованием зародышей и их ростом кристаллов кальциатов. Рассмотрение термодинамики для процессов приводит к следующим практически важным выводам: при низкой скорости образования зародышей и высокой скорости роста, что имеет место при небольших пересыщениях,

наблюдается мало крупных частиц, а при большой скорости образования зародышей и низкой скорости их роста (значительные пересыщения) образуется много мелких частиц.

Завершающим этапом в процессе кальцификации является переход аморфной фазы этих соединений кальция в кристаллическую. Методом рентгеновской дифракции установлено, что появлению кристаллического гидроксиапатита предшествует аморфная фаза. Химический анализ аморфной фазы показал, что она представляет собой гидратированный фосфат кальция $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot x(\text{H}_2\text{O})$ при отношении $\text{Ca}/\text{P} = 3/2$ по сравнению с отношением $5/3$ для кристаллического гидроксиапатита. Время жизни метастабильного аморфного предшественника в водном растворе зависит от содержания органических макромолекул и ионов, pH, вязкости, ионной силы раствора и температуры, причем процесс перехода в кристаллическую фазу происходит автокаталитически. Однако вопрос о предшественнике гидроксиапатита до сих пор остается открытым. Некоторые исследователи предшественником ГАп считают брушит, октакальциум фосфат, аморфный фосфат кальция.

Кальцификация биоматериалов представляет собой сложный и многообразный процесс. Поэтому для его исследования привлекают различные физические, биохимические, иммунологические методы, используют эксперименты как в условиях *in vivo*, так и в условиях *in vitro*.

Для исследования процесса кальцификации в условиях *in vivo* используют два метода, это имплантация протезов клапанов или сосудов интракардиально молодым животным (телята, овцы), и подкожная имплантация образцов биоматериалов мелким животным (крысы, кролики, мыши). Установлено, что биохимические и морфологические особенности образующихся кальцийсодержащих отложений в образцах биоматериалов, имплантируемых под кожу крысам и кроликам, аналогичны таковым для протезов сосудов или клапанов, имплантируемым ортотопически в экспериментальных или клинических условиях. Развитие кальцификации непосредственно в кровотоке изучают на крупных животных при сроках имплантации один – два года. Такие эксперименты длительны и дорогостоящи. Поэтому наибольшее распространение получили методы с использованием мелких животных (мыши, крысы, кролики). Образец биоматериала имплантируется под кожу на время, необходимое для достижения половины максимальной минерализации (для крыс – 3 недели, для кроликов – 6 недель). По истечении данного срока имплантаты удаляют и проводят анализ на количественное содержание кальция и фосфора, а также вычисляют отношение кальций/фосфор.

Для разделения роли гуморальных и клеточных факторов в процессе кальцификации имплантатов применяют модель подкожной имплантации исследуемых образцов в специальных камерах. Наличие камеры позволяет контролировать направление среза для морфологических исследований и исключает образование соединительно-тканной капсулы вокруг образцов. Для исследования клеточного состава воспалительного экссудата применяют конструкции из металлической сетки в виде цилиндра длиной 3,5 см и диаметром 1 см. Поры занимают от 35 % до 59 % от всей поверхности системы.

Диффузионные камеры с использованием пористых мембран из ПЭТФ (размер пор от 0,4 мкм до 12 мкм) разработаны для исследования остеогенеза деминерализованной костной ткани и для изучения влияния иммунной и воспалительной реакций на кальцификацию биологических протезов клапанов. Использование мембран с размером пор от 0,22 до 0,56 мкм позволяет исключить прямой контакт клеток окружающих тканей с поверхностью исследуемого образца для сравнительного анализа вклада клеточных и гуморальных факторов в механизм кальцификации. Такая модель эксперимента дает возможность исследовать ионный, белковый и ферментативный состав внутрикамерного экссудата, позволяет исследовать влияние различных лекарственных препаратов на процесс кальцификации в условиях *in vivo*.

Эксперименты *in vitro* по кальцификации биоматериалов и имплантатов привлекают для изучения механизма минерализации костей, хрящей, зубов, для оценки склонности биоматериалов к кальцификации и возможности минерализации органических матриц при образовании природных кристаллов. Информативность и достоверность результатов, получаемых методами *in vitro*, зависят от многих факторов (среда, в которой инкубируют образец; температура и pH; тип биоматериала и структуры поверхности имплантата и т. д.). Механизм зарождения и роста кристаллов исследуют в минеральных кальцийнасыщенных средах. Обычно модельные растворы содержат соли кальция и фосфора в концентрациях, близких к физиологическим. Исследуют влияние pH, температуры, примесей на образование фосфатов кальция, переход из аморфной фазы в кристаллическую. В минеральных растворах оценивают склонность биоматериалов к кальцификации. В частности, с использованием среды, состоящей из CaCl_2 (3 мМ), KH_2PO_4 (2,25 мМ) и KCl (55 мМ) (отношение Ca/P = 1,33), определяли содержание Ca и P и их соотношение для пленочных образцов полиуретанов, обработанных различными экстрагирующими растворами. Показано, что экстрагирующий раствор, удаляя примеси и непрореагировавшие реагенты из образцов, может нарушать гомогенность пленок и способствовать накоплению фосфатов кальция на поверхности. Наибольшая склонность к кальцификации отмечена у пленок после обработки 1 % раствором Тритона X-100. Однако использование чисто минеральных растворов исключает возможность изучения роли органических компонентов в кальцификации. Поэтому в данные среды необходимо добавлять органические компоненты: различные белки, протеоглики, фосфолипиды, органический эфирфосфат. Обычно подобные модельные растворы применяют для оценки роли того или иного органического компонента в механизме кальцификации. Оценку склонности биоматериалов к кальцификации, по нашему мнению, следует проводить в контролируемой по pH среде, в состав которой входят компоненты, играющие основную роль в кальцификации: из органических – белки и липиды; из неорганических – кальций и фосфаты.

Для анализа отложений фосфатов кальция на поверхности образцов биоматериалов естественного и искусственного происхождения привлекают также атомно-адсорбционную спектрофотометрию. С гладких полимерных

образцов адсорбированный слой удаляют механически, а затем растворяют в соляной кислоте. Пористые или волокнистые образцы отмывают непосредственно в разбавленной соляной кислоте. Образцы биоматериалов естественного происхождения, как правило, сжигают и определяют содержание кальция в золе. Одним из чувствительных количественных методов определения отложения кальция и фосфора на образцах биоматериалов является радиоизотопный метод с использованием ^{45}Ca и ^{32}P . Он позволяет регистрировать изменения активности изотопа в модельной среде и в образце.

На границе раздела фаз «биоматериал/среда» адсорбционные процессы сопровождаются процессами десорбции и обмена кальция и кальцийсодержащих комплексов. Исследования процессов десорбции и обмена на поверхности ряда полимеров (полиэтилентерефталата, полиуретанов и др.), проведенные радиоизотопным методом в модельных средах, содержащих органические компоненты (белок, жирная кислота) и хлорид кальция, показали, что для всех материалов характерно присутствие необратимо адсорбированного кальция и кальцийсодержащих комплексов. Результаты экспериментов *in vitro* по десорбции кальция и его комплексов выявили ведущую роль белковых и липидных компонентов в накоплении кальция на поверхности биоматериалов. Основное накопление кальция происходит при наличии в среде белка и избытка жирной кислоты, способствующей образованию адсорбированных комплексов, не участвующих в процессах обмена и десорбции.

На накопление кальция влияют физико-химические свойства материала, из которого изготовлен имплантат. С увеличением гидрофобности и шероховатости материала увеличивается количество адсорбированных белков, липидов и кальция. Преимущественная адсорбция происходит на гидрофобных поверхностях. Повышенная сорбция липидов наблюдается в блоксополимерах, в которых липидные и гидрокарбонатные сегменты связаны одновременно с областями гидрофильных и липофильных полимерных цепочек соответственно. Поверхностные свойства изделия влияют на избирательность к адсорбции и десорбции комплексов кальция.

В настоящее время существует два основных подхода к теоретическому обоснованию механизма кальцификации биоматериалов: клеточный и концентрационный. При этом клеткам отводится ведущая роль в процессе физиологической и патологической кальцификации. При таком подходе первичные стадии кальцификации связывают либо с наличием уже погибших клеток (как в случае с обработанными биологическими тканями), либо с гибелью клеток реципиента, адгезированных на биоматериале. Согласно этой теории кальцификация начинается с гибели клеток. Погибшие клетки являются

необходимым условием, приводящим к локальному изменению концентрации кальция, фосфатов, белков, липидов, ферментов, что вызывает отложение растворимых форм фосфатов кальция и при определенных условиях переход их в нерастворимые. К клеточной теории можно отнести и везикулярную теорию, наиболее популярную в настоящее время. В ней постулируется, что гибель клеток способствует появлению в среде фрагментов клеточных

мембран, образующих везикулы. Кристаллы фосфатов формируются внутри такой структуры. Места адсорбции этих структур на поверхности имплантата служат центрами последующей кальцификации. С гибелью клеток связано и появление в районе кальцификации обогащенных кальцием митохондрий.

Концентрационная теория пытается учесть и оценить роль концентрации ионов кальция и фосфатов в межклеточной жидкости, понять, каким образом происходит накопление солей фосфатов кальция из раствора и их кристаллизация. Этот подход появился значительно раньше клеточного. Обнаружение высокой концентрации щелочной фосфатазы в период ранней минерализации костей дало основание предложить так называемую фосфатазную теорию. Предполагалось, что гидролиз естественных ингибиторов кальцификации, пирофосфата и АТФ, локально повышает концентрацию фосфатов, провоцируя спонтанное зарождение кристаллов. Позднее, в силу ряда нерешенных проблем, эта теория потеряла свою популярность. Предложенные позже физико-химические теории связывали гетерогенные центры зарождения кристаллов ГАП с макромолекулярной стереоконфигурацией коллагена или рассматривали всевозможные трансформации предшественников кристаллического гидроксиапатита, такие как аморфный фосфат кальция, октакальций фосфат или брушит. В настоящее время широко апробируется теория, построенная на образовании комплексов кальций – фосфолипид – фосфат, причиной образования которых является аффинность кислых фосфолипидов к ионам кальция. Предполагается, что присутствие таких комплексов в метастабильном растворе кальция и фосфатов провоцирует осаждение нерастворимых гидроксиапатитов.

По-видимому, каждый из приведенных подходов к механизму кальцификации биоматериалов, позволяя объяснить некоторые особенности развития этого процесса, недооценивает роль гуморальных факторов. Эти факторы являются основополагающими при формировании на поверхности биоматериала слоя, содержащего органические компоненты. Свойства этого слоя определяют и реакцию клеток на границе раздела биоматериал – кровь, и в конечном счете развитие кальцификации.

ГЛАВА 5. БИОРАЗРУШАЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И МЕХАНИЗМЫ БИОДЕСТРУКЦИИ ИМПЛАНТАТОВ

Разработка и освоение новых материалов, обладающих помимо биосовместимости и функциональности, также и разрушаемостью *in vivo*, представляет собой специализированную проблему, существенно более сложную по сравнению с трудностями, возникающими в ходе конструирования материалов и систем долговременного и постоянного функционирования *in vivo*. Области применения резорбируемых материалов уже сегодня широки. Это является основой для совершенствования существующих технологий и методов лечения и развития принципиально новых.

Таблица 5.1

Марки изделий и области применения биорезорбируемых материалов [1]

Марка, материал	Область применения, фирма-производитель
«Absolock», полидиоксанон	Сшивающая скобка для кровеносных сосудов, Ethicon, Inc., США
«Alzamer», полиортоэфир	Матрица для доставки (бывш. Chronomer) лекарственных веществ, Alza, Inc., США
«Biodel», поли(бис(п-карбоксихенокси пропан ангидрид) себаценовой кислоты)	Матрица для доставки лекарственных веществ, Nova Pharmaceutical, Inc., США
«Biofix», полидиоксанон, армированный полигликолидом	Штифт для фиксации фрагментов кости, Bioscience, Ltd., Tampere, Финляндия
«Capronor», поликапролактон	Матрица для контрацептивного (стероидный) имплантата, Research Triangle Institute, Inc., США
«Dexon», полигликолид	Плетеные хирургические нити American Cyanamid Co., Inc., США
«Drylac», поли-L-лактид	Пористая повязка для оральной хирургии
«Ethipin», полидиоксанон	Штифт для фиксации костно-хрящевых фрагментов, Ethicon, Inc., США
«Lactomer», сополимер поли(L-лактид – 30 % – гликолид)	Сшивающие сосуд скобки, U.S. Surgical Corp., Inc., США
«Orthosorb», полилактид	Ориентированные материалы для восстановительной ортопедии, Johnson & Johnson, Inc., США
«Valtrac», полигликолид и сульфат бария.	Частично биodeградируемое анастомозное кольцо для абдоминальной хирургии, American Cyanamid Co., Inc., США
«Vicryl», сополимер поли(гликолид-10 % – L-лактид), или полиглактин 910	Плетеные хирургические нити Ethicon, Inc., США

Материалы и имплантаты временного действия, восполнив дефект ор-

гана или поврежденной ткани в живом организме и оказав при этом лечебный эффект, должны в строго заданные сроки подвергнуться биодеструкции с одновременным замещением новыми тканевыми структурами. Следовательно, два процесса, протекающие *in vivo* при имплантации, – деградация материала и восстановления дефекта ткани или органа, должны протекать с согласованными скоростями. Продукты деградации материала должны своевременно выводиться из организма, не оказывая на него отрицательного влияния. Насколько широки области применения резорбируемых материалов уже сегодня, видно из данных [табл. 5.1](#). Это является основой для совершенствования существующих технологий и методов лечения и развития принципиально новых.

5.1. Биоразрушаемые материалы медицинского назначения

5.1.1. Биоразрушаемые синтетические полимеры

Ряд синтетических полимеров подвергается действию жидкостей и при этом разбухают или растворяются. Молекулы жидкости диффундируют в толщу таких полимеров, раздвигая цепи и увеличивая объем. Это может возникать главным образом в местах трещин на поверхности, приводя к созданию локального растягивающего напряжения, что в свою очередь вызывает образование микротрещин или растрескивание под действием напряжений окружающей среды. Полимеры, производимые посредством конденсации, которая является реакцией с водой, в результате чего образуются связи –ОН, склонны к гидролизу. Кроме того, полимеры могут содержать побочные группы, способные к гидролизу. Скорость гидролиза зависит от *водопоглощения полимера* и часто ограничивается диффузией воды по полимеру. Диффузия воды в полимерах соотносится с их растворимостью, с температурой стеклования и со степенью кристалличности. Сложные полиэфиры, основанные на $(-R-COO-)_n$, подвержены *гидролизу*, их распад зависит от рН. Сложные эфиры гидролизуются с большей скоростью при кислотных и щелочных условиях, чем при нейтральном рН. Поскольку при гидролизе сложного эфира образуется карбоновая кислота, рН падает во время гидролиза, что ускоряет процесс распада.

Оксипроизводные монокарбоновых кислот считаются наиболее перспективными биodeградируемыми материалами. Цепи этих полимеров образованы повторяющимися остатками короткоцепочечных кислот, среди которых наиболее известные и распространенные – молочная (ПМК) и гликолевая (ПГК). Полимеры молочной кислоты часто используют в сочетании с полигликолевой кислотой, а также поли(ϵ -капролактоном) (ПКЛ). Полимеры на основе молочной и гликолевой кислот разрешены для использования в медицине и фармакологии Департаментом по контролю качества продуктов и

лекарств США (United States Food and Drug Administration – F.D.A.) с 1970 г. В медицинской практике эти полимеры нашли широкое применение в виде шовного материала, армирующих конструкций, сеток для герниопластики, в реконструктивной хирургии и регенеративной медицине для восстановления дефектов костной и хрящевой ткани как раневые покрытия.

Полигликолид (ПГК, английская аббревиатура – PGA) – продукт полимеризации $-(O-CO-CHR)-n$, где $R = H$. ПГК высокого молекулярного веса представляет собой твердый, кристаллический полимер, с температурой плавления порядка $228\text{ }^{\circ}\text{C}$; температура стеклования составляет $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Молекулярный вес существенно зависит от условий синтеза и переработки в изделия и может составлять от 2×10^4 до $1,45 \times 10^5$. ПГА получают посредством полимеризации с раскрытием кольца в присутствии в качестве катализаторов солей металлов. Молярная масса полимера зависит от температуры и концентрации катализатора. Полимер нерастворим в большинстве органических растворителей. Механическая прочность в сочетании с пластичностью делают этот полимер пригодным для изготовления различных конструкций – от нетканых, губчатых материалов до пластин и винтов, применяемых для фиксации костных отломков. Материал не обладает цитотоксическими свойствами, обеспечивает адгезию и поддерживает пролиферацию клеток. Однако механическая прочность имплантированных изделий из ПГК сохраняется в течение непродолжительного периода, от 20 до 30 суток со значительной потерей массы изделия за этот период – до 40–50 %.

Полилактиды (ПЛК, в англоязычной аббревиатуре – PLA) образованы повторяющимися остатками $-(O-CO-CHR)-n$, где $R = CH_3$. Замена H^+ на CH_3 приводит к образованию более сложного гидрофобного полиэфира и вызывает более низкое водопоглощение и более низкие скорости гидролиза. Наличие $R = CH_3$, дает в результате хиральный центр и образует формы D и L, а также рацемические формы, где имеет место произвольное расположение хиральных центров. Обе формы полилактида (D и L) могут кристаллизоваться в отличие от рацемической формы, которая не кристаллизуется. Мономер ПЛА – молочную кислоту (лактид) получают химическим синтезом (из лактона, хлорпропионовой кислоты, а также перекристаллизацией толуола) или микробиологической ферментацией сахаров, которые предварительно получают гидролизом и экстракцией из природного сырья (кукурузы, крахмала и т. д.). Мономеры молочной кислоты далее химическим способом подвергают полимеризации в ПЛА. По химическим, физическим и биологическим свойствам полилактид близок к полигликолиду. ПЛК уступает многим синтетическим полимерам по теплостойкости (при нагревании свыше $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ изделия из него деформируются) и, как следствие этого, не могут быть подвергнуты стерилизации с применением тепловых методов. Полилактид относится к резорбируемым полимерам, для него характерны высокие скорости разрушения в биологических средах. Поэтому время его резорбции *in vivo* исчисляется небольшим периодом (10–12 суток). Разрушение часто является автокаталитическим. Разрушение толстых участков может происходить быстрее, чем тонких участков, из-за накопления молочной кислоты и локализо-

ванного низкого рН (3,2–3,4), сопровождающего разрушение внутри толщи полимера. Это может приводить к быстрому выходу молочной кислоты и олигомеров полилактида, вызывая токсическую реакцию со стороны окружающих имплантат тканей. Быстрое уменьшение молекулярного веса полимера при разрушении приводит к заметному снижению прочности изделий.

Смеси полилактида с полигликолидом имеют лучшие характеристики по теплостойкости, сроку биоразрушения и механической прочности. В зависимости от соотношения молочной и гликолевой кислот в полимере его свойства существенно варьируют. В организме эти полиэфиры деградируют в основном путем неферментативного гидролиза. На биодеградацию полимеров на основе лактида и гликолида в значительной степени влияет значение рН. Процесс биодеградации полимеров подавляется в кислотной и ускоряется в щелочной среде. Гидролитическая деградация изделий из этих полимеров контролируется не только диффузией воды, проникающей в поры изделия, но и релизом водорастворимых кислотных олигомерных побочных продуктов разрушения полимеров. Примечательно, что деградация ПЛК и сополимеров ПЛ/ГК быстрее происходит в объеме, чем в поверхностном слое, как результат автокаталитического эффекта, что негативно отражается на прочностных характеристиках изделий.

ПЛК, ПГК и ПЛ/ПГ являются наиболее широко применяемыми биоразрушаемыми полимерами; они разрешены и уже в течение ряда лет применяются в клинической практике (табл. 5.1). Однако они не свободны от ряда существенных недостатков, среди которых следующие: непредсказуемая деградация в условиях организма, которая зависит от ряда параметров, например плотности и размера, формы и пористости полимерного изделия; изменение рН окружающих тканей при биодеградации; недостаточная механическая прочность. Это ограничивает их применение и использование в качестве биомедицинского материала широкого назначения.

Природные биоразрушаемые полимеры. В последние десятилетия непрерывно растет интерес к биодеградируемым *природным* (биологическим) полимерам (альгинатам, коллагену, желатину, хитозанам, фиброинам шелка) и полиэфирам бактериального происхождения – полигидроксиалканоятам (ПГА), синтезируемых микроорганизмами. К недостаткам природных биополимеров относят высокую стоимость их получения, сложность обработки, недостаточную механическую прочность. Довольно широкое применение в медицине нашли распространенные природные полисахариды *хитозан* и *альгинат*, которые по структурным характеристикам сходны с гликозаминогликанами. *Гликозаминогликаны* – это гидратные составляющие ВКМ, находятся в соединительной ткани в виде комплексов с белками и связаны с ними слабыми и прочными межмолекулярными взаимодействиями. В медицинской практике эти полисахариды в виде пленок, губок и гидрогелей используют как раневые, ожоговые и заживляющие покрытия, в системах доставки клеток, лекарственных веществ и различных факторов роста, в качестве шовных материалов и тканевых адгезивов.

Собственно хитин и его производные, а также в сочетании с другими природными материалами (желатином, гепарином, альгинатом) используют достаточно широко. Недостатком хитозанов является известная хрупкость и изменение структуры при стерилизации различными методами, включая радиационный.

Среди полисахаридов внимание привлекает *хитозан*, получаемый гидролизом хитина, который выделяют из панцирей ракообразных. Доступность хитозанов, способность к биodeградации и биосовместимость позволяют использовать их в качестве перевязочного материала, закрытия ожоговых поверхностей, а также в клеточной и тканевой инженерии в качестве матриц для выращивания клеток.

Природный линейный полисахарид *альгинат*, получаемый из морских водорослей или биотехнологической ферментацией, одобрен Департаментом по контролю качества продуктов и лекарств США (United States Food and Drug Administration – F.D.A.) в качестве ранозаживляющего материала. Альгинаты в виде волокон (смесь альгината натрия и кальция) и пленок используют для первичной обработки ран и ожогов. Способность альгинатов полимеризоваться и формировать гели в присутствии двухвалентных металлов (кальция, магния и др.) используют в качестве матриц для культивирования клеток (хондроцитов, стромальных клеток костного мозга) и различных факторов (например, нейротрофического фактора головного мозга).

Альгинаты с высоким содержанием гиалуроновой кислоты – распространенный матрикс для депонирования (методом механического захвата или включения в гели) и доставки алло-, ксено- и генетически модифицированных клеток и тканей, а также лекарственных средств. Альгинат, стабилизированный полилизинном, используют для иммобилизации островковых клеток поджелудочной железы (гибридная поджелудочная железа), генетически измененных фибробластов, гематopoэтических клеток костного мозга, паратериоидных клеток, различных клеток, выделяющих моноклональные антитела, комплексных биомолекул (антибиотики, гормоны, вакцины, ферменты и другое). Известны примеры использования пористых альгинатных губок для восстановления нервной проводимости в экспериментах на крысах с модельными периферийными и спинальными травмами. Однако вследствие потери альгинатным гелем ионных сшивок свойства альгинатных матриц со временем изменяются (ухудшаются).

Гиалуроновая кислота (ГК) – гликозаминогликан, естественный компонент межклеточного вещества мягких тканей позвоночных, представляет собой один из перспективных материалов в восстановительной хирургии и тканевой инженерии. Одна молекула гиалуроновой кислоты способна связывать до 1000 молекул воды. Этот гликозаминогликан используется в медицине как вискоэластик при офтальмологических операциях, при болезнях суставов в ортопедии, как барьерные мембраны, ожоговые покрытия, а также в косметологии. Установлено, что экзогенная ГК ингибирует пролиферацию фибробластов, и относительно высокая концентрация ГК во внеклеточном пространстве в первую фазу регенерации тканей частично ограничивает от-

ложения внеклеточного матрикса и коллагена, что предполагает роль ГК в предотвращении фиброза и формировании рубцовой ткани. Гиалуроновая кислота и композиты на ее основе используют в абдоминальной хирургии в качестве барьерного и противовоспалительного средства. При взаимодействии ГК с фосфатным буферным раствором получен барьер «Sergracoat», который предотвращает повреждение серозы, воспаление и формирование спаек в животных моделях. Пленочные матриксы, полученные из полиэфиров ГК, также положительно оценены для культивирования человеческих остеобластов, таким образом, ГК можно использовать в клеточных технологиях.

Распространенным в медицине природным полимерным материалом является *коллаген*. Этот фибриллярный белок является одним из основных компонентов соединительной, костной и хрящевой тканей, а также соединительной ткани, входящей в состав сухожилий. Молекула коллагена имеет стержневидную форму и состоит из трех так называемых α -цепей, формирующих правозакрученную тройную спираль. Около 30 % аминокислотных звеньев коллагена приходится на глицин. В состав его цепей входит также значительное число (~21 %) звеньев гидроксилсодержащих аминокислот – 3- и 4-гидроксипролина и 5-гидроксилизина. Недостатком коллагена является нерегулируемое время биодegradации и ограниченный срок функционирования (не более месяца) в условиях живого организма. В настоящее время разработаны методы получения больших количеств коллагена медицинской чистоты. В результате многолетних исследований и дискуссий было принято решение, что достоверного уровня ограничений к имплантационному введению медицинского коллагена животного происхождения (например, продукта марки «Collagen™» фирмы Collagen Corporation) не выявлено, несмотря на известные случаи отрицательной реакции на коллагеновые имплантаты. Это послужило основанием для расширения областей применения коллагена в медицине. Области применения коллагена – это создание эндопротезов мягких тканей, компоненты материалов для лечения поражений кожного покрова, в том числе обладающих гемостатическим действием, эндопротезирование жидкостных протоков и эндопротезов компонентов органов зрения, основы шовных волокон. Известны примеры положительной оценки коллагена и для создания имплантатов артериальных сосудов, эндопротезов связок и компонентов нервной системы.

Для улучшения свойств имплантируемых материалов на основе коллагена и придания им большей механической прочности предложено получать композиты коллагена с керамиками и синтетическими полимерами (полиэтиленом, поливиниловым спиртом, полисилоксанами). Композиты коллагена и гидроксиапатита рассматриваются в качестве остеозамещающего материала для восстановления дефектов костной ткани в челюстно-лицевой хирургии и стоматологии.

Белки группы фибрина представляют определенный интерес для медицины. Фибрин-мономер участвует в процессе тромбообразования и образуется при отщеплении от гликопротеина крови фибриногена двух низкомолекулярных пептидов ($M_v = 2000$ и 2500 Да) под действием фермента тромбина.

Фибрин-мономер агрегируется под действием фермента фибринолигазы в нерастворимый сгусток фибрин-полимера, который становится основой белого тромба. Фибрин может быть использован в виде фибрин-полимерного сгустка для покрытия на пораженных участках кожного покрова, в качестве тканевого адгезива в офтальмологии, сосудистой и лицевой хирургии, в виде порошка в качестве гемостатического агента для обработки ран, в составе пломбирующих композиций для заполнения дефектов костей, в виде фибриновой пены в качестве гемостатического и пломбирующего средства, в виде пленки в качестве покрытия для кожных поражений. На основе фибрина разработан специализированный материал «Bioplast», содержащий от 20 до 50 % глицерина, обладающий повышенной механической прочностью (прочность при сжатии до 76 МПа, прочность при разрыве до 83 МПа, прочность при изгибе до 35 МПа). Поэтому данный материал используют в качестве пластификатора, исходного материала при операциях на суставах; в офтальмологии при отслаивании сетчатки; для закрытия перфораций.

Желатин – денатурированная форма коллагена, в настоящее время находит применение в качестве матриц для выращивания клеток *in vitro* применительно к задачам клеточной и тканевой инженерии. Показано, что матрицы из желатина пригодны для успешного выращивания клеток разного происхождения.

Полигидроксиалканоаты (ПГА, англоязычная аббревиатура – PHA) обладают многими свойствами, которые являются привлекательными для биомедицинских сфер применения. В отличие от полилактидов, ПГА имеют ряд весьма существенных преимуществ:

высокая биосовместимость ПГА, в частности, полигидроксибутирата, связана с тем, что мономеры, образующие этот полимер, – гидроксимасляная кислота – это естественный метаболит клеток и тканей организма;

ПГА не гидролизуются в жидких средах, так как деградация ПГА является биологической и происходит клеточным и гуморальным путями; образующиеся при этом мономеры гидроксимасляной кислоты не вызывают резкого закисления тканей и, следовательно, выраженной воспалительной реакции;

скорости биорезорбции ПГА значительно ниже, чем полилактидов и полигликолидов, изделия из ПГА в зависимости от формы и места имплантации *in vivo* могут функционировать до 2–3 лет, более того, скоростью деградации ПГА можно управлять;

ПГА получают методом прямой ферментации, их производство не требует серии технологических этапов (синтез мономеров, полимеризация, добавление пластификаторов и модифицирующих компонентов);

сырьем для синтеза ПГА могут быть сахара, органические кислоты, спирты, смеси CO_2 и H_2 , продукты гидролиза растительного сырья, промышленные отходы производства сахара, пальмового масла, водородсодержащие продукты переработки бурых углей и гидролизного лигнина;

ПГА – это семейство полимеров различной химической структуры, образованных мономерами с длиной C-цепи от C_4 до C_{12} и выше, от высоко-

кристаллических термопластов до резиноподобных эластомеров;

свойствами ПГА (кристалличность, механическая прочность, температурные характеристики, скорости биораспада) можно управлять, варьируя в процессе ферментации состав среды и задавая ту или иную химическую структуру;

ПГА подвергаются переработке из различных фазовых состояний (порошки, растворы, гели, расплавы) общепринятыми методами.

С этими полимерами связаны большие надежды, так как помимо термопластичности (аналогично полипропилену и полиэтилену) ПГА обладают антиоксидантными и оптическими свойствами, пьезоэлектрическим эффектом и характеризуются высокой биосовместимостью. Помимо полигидроксibuтирата перспективны сополимерные ПГА, которые в зависимости от набора и соотношения мономеров имеют различные базовые свойства (степень кристалличности, температуру плавления, пластичность, механическую прочность и др.). Интерес к ПГА растет с конца 1980-х годов. Это новый класс биоразрушаемых и биосовместимых полиэфиров, физико-химические свойства которых в зависимости от состава могут существенно варьировать. Сферы применения ПГА в медицине потенциально широки и могут включать изготовление медицинского инструментария и вспомогательных средств (нетканые и одноразовые изделия, шовные и перевязочные материалы), фармакологию (контролируемые системы доставки лекарственных средств), восстановительную хирургию и трансплантологию.

Таким образом, круг материалов, создаваемых для применения в медицине, расширяется.

5.2. Биодеструкция имплантируемых материалов и конструкций *in vivo*

Круг резорбируемых материалов, используемых в настоящее время в медицине, весьма широк и включает шовные материалы, пленочные и мембранные материалы для закрытия раневых поверхностей, крепежные элементы для соединения костных отломков, гели, грануляты, пеноматериалы для заполнения послеоперационных полостей в мягких тканях и др. В зависимости от природы и химических свойств материалов механизмы их деградации в биологических средах различны. Структура материала, прежде всего, способность (или неспособность) набухать в жидкостях, обеспечивая проникновение и диффузию последних в материал, тип функциональных групп и связей, подвергающихся (или не способных) к гидролизу, определяют механизм и пути разрушения материала (имплантата). Помимо способности набухать в жидкостях и обеспечивать проникновение воды в массу материала, продукты гидролиза последнего также должны растворяться в биологических жидкостях.

Истинная биологическая деградация материала реализуется гумораль-

ным и/или клеточным путями под воздействием специфических гидролизующих ферментов (гидролаз, деполимераз) или в результате фагоцитоза материала специализированными клетками (макрофагами или гигантскими клетками инородных тел, ГКИТ). Процесс резорбции полимерных материалов может включать несколько последовательных стадий: адсорбцию ферментов и/или клеток на поверхности и начало взаимодействия с материалом; выщелачивание более доступной аморфной фазы материала, деструкцию кристаллической решетки упорядоченной фазы, разрыв полимерной цепи и фрагментирование полимера на тетра-, ди- и мономеры; далее – биохимическое превращение мономеров с образованием конечных продуктов, выводимых из организма.

Гидрофильные материалы, как правило, имеют ограниченные сроки функционирования *in vivo*, так как в результате воздействия биологических сред быстро разрушаются. Сорбционные свойства по отношению к воде и коэффициенты диффузии водяных паров у материалов, применяемых в медицине, существенно различаются, это в значительной мере определяет срок их «службы». Материалы, обладающие высокой стабильностью при имплантации, то есть не разрушаемые, например полидиметилсилоксан и полипропилен, имеют следующие значения сорбции воды и коэффициентов диффузии, соответственно, 0,07 и 0,007 г H₂O/100 г полимера и 70000 и 240 см² · с⁻¹. У широко применяемых полимеров с высокой скоростью биodeградации полигликолида и сополимеров полилактида и полигликолида сорбция воды составляет на несколько порядков выше, 8 г H₂O/100 г полимера, а коэффициент диффузии паров воды существенно ниже, на уровне 5–7 см² · с⁻¹. Как оказалось, варьируя соотношение лактида и гликолида в сополимере, можно регулировать скорость биоразрушения материала; с увеличением доли лактида в сополимере скорость резорбции возрастает. Другие полимерные материалы (сегментированные полиуретаны, полиметилметакрилат, полиэтилентерефталат и др.) занимают промежуточное положение.

Процесс разрушения имплантированного материала (изделия), если таковые растворяются в воде и других жидких средах, начинается с простого растворения. Этот процесс складывается из нескольких последовательных этапов: диффузии среды в массу материала (имплантата), сольватации макромолекул материала молекулами растворителя, десорбции сольватированных макромолекул из массы материала в окружающую изделие жидкую среду. В процессе растворения материала изменяется надмолекулярная структура материала; если растворяются (вымываются) в среду аморфные зоны, кристалличность материала возрастает. Водорастворимые сахара, ряд белков и полимеров (полиакрилаты, винилпироллидон) используют в качестве матрикса для депонирования лекарственных систем.

Многие полимерные материалы, содержащие в своей структуре гидролизующие группы, разрушаются в биологических средах в результате гидролитических процессов. Полимеры, получаемые посредством конденсации и содержащие -ОН связи, склонны к гидролизу. Гидролизующие группы

в полимерах весьма разнообразны – это карбонатная, амидная, ангидридная, уретановая, мочевиная и др. Сложные полимеры, содержащие $(-R-COON)_n$, также подвержены гидролизу. Скорость гидролитических процессов зависит от активной реакции среды, она возрастает при щелочных и кислотных условиях. В результате гидролиза полиэфиров, содержащих кислотные группы, рН среды понижается, что положительно влияет на скорость биодеградации.

Механизм распада биорезорбируемых полимеров заключается в расщеплении цепи. Полимеры претерпевают гидролиз, и цепи разрезают пополам. Средний молекулярный вес полимера поэтому делится примерно пополам при расщеплении цепи. Механические свойства полимера пропорциональны квадратному корню молекулярного веса, поэтому уменьшаются очень быстро, когда полимер распадается. Отдельные резорбируемые полимеры, как установлено, вызывают воспалительную реакцию из-за кислотных побочных продуктов распада.

Соленость среды также влияет на скорость биоразрушения полимеров. К гидролизуемым материалам относятся полимеры, которые получают из α -оксикислот, содержащие в своей структуре повторяющиеся звенья $-(O-CO-CHR)_n$. Гидролитический процесс также характерен для эфирных связей многих полимеров липидной и белковой природы. Процесс гидролиза линейных полимеров реализуется в результате разрыва основной цепи; у разветвленных полимеров реакция гидролиза сопровождается отрывом боковых ветвей. Это процесс сопровождается повышением гидрофильности материала. К таким довольно быстро деградируемым в биологических жидкостях полимерам относятся полимеры гидроксикарбоновых кислот (молочной, гликолевой); сополимеры капролактона; полимеры, содержащие в цепи ангидридные (полиангидриды) и уретановые (полиуретаны) группы.

Биологический гидролиз полимеров происходит под воздействием ферментов крови и тканей, или ферментов, экскретируемых клетками. Ферментативный гидролиз полимеров свойствен материалам, в структуру которых входят фрагменты, являющиеся естественными субстратами для гидролаз.

Нельзя не отметить, что процесс взаимодействия материала и организма очень сложен и складывается из комплекса разнообразных реакций. Это аспект медицинского материаловедения к настоящему времени изучен весьма фрагментарно и требует специализированных исследований для каждого конкретного типа материала и области применения. Кинетика разрушения материала в биологических средах, безусловно, зависит от многих факторов, включая способ переработки материала в изделие, формы и массы имплантата, а также места введения в организм. Важным моментом при этом является механизм разрушения материала, так как разрушение материала может протекать в поверхностном слое, постепенно углубляясь внутрь материала, по мере его разрушения с поверхности или во всем объеме материала. В по-

следнем случае прочностные характеристики имплантата ухудшаются существенно быстрее по сравнению с медленным разрушением с поверхности. Первый тип процесса биодegradации наиболее распространен, и на него оказывают влияние форма изделия, развитость и свойства поверхности. Дegradация полимера во всем объеме наблюдается в том случае, когда материал гидрофилен и подвержен значительному набуханию в жидкостях.

Биодegradации в поверхностном слое предшествует стадия проникновения в него за счет диффузии окружающей жидкости. В результате стадии неклочной биодegradации на поверхности наблюдается эрозия, которая заключается в появлении углублений неправильной формы. При поверхностной дegradации полимеров разрушению (эрозии) подвергаются наиболее гидрофильные и аморфные области; по мере развития дефектов на поверхности изделия в его толще формируются поры, углубления, трещины. Образующиеся при этом водорастворимые продукты разрушения полимера диффундируют в жидкость и подвергаются в ней ферментативному гидролизу растворимыми ферментами. Этот процесс называется этапом неклочной биодegradации. На [рис. 5.1](#) представлены результаты электронно-микроскопических исследований структуры полимерных имплантатов из ПГА в виде монофильных волокон, имплантированных лабораторным животным на разных сроках наблюдения. Спустя 90 суток после имплантации существенных изменений поверхности нитей, несмотря на достоверное уменьшение их массы, не наблюдается ([рис. 5.1, а 2](#)). На более поздних сроках (120 и 180 суток) после удаления с поверхности имплантатов адгезированных макрофагов обнаружены локальные дефекты ([рис. 5.1, а 3, 4](#)), возможно, явившиеся результатом лизосомальной деятельности полиядерных макрофагов. При этом за 180 сут абсолютная прочность нитей снижалась до 5,5–6,0 Н, то есть всего на 33–37 % от исходных значений. Как следует из [рис. 5.1, б](#), структура нитей в объеме на длительном сроке не изменилась; крупных дефектов в виде узур, трещин и каналов на срезах нитей не видно. Приведенный пример наглядно иллюстрирует последствия биодegradации полимерного имплантата, реализуемого по типу разрушения с поверхности.

Однако если в ходе поверхностной дegradации имплантата происходит формирование на поверхности выступающих фрагментов материала размером 20–30 мкм или поступление их в окружающую среду, то создаются условия для клеточного этапа биодegradации материала. Большую роль в этом процессе играют специализированные клетки макрофагального ряда, среди них – лизосомальные макрофаги, которые выделяют внеклеточные ферменты, гидролизующие материал, и фагоцитарные макрофаги, способные к захвату частичек материала и его внутриклеточной утилизации. На [рис. 5.2](#) представлены электронные микрофотографии, иллюстрирующие макрофагальную инфильтрацию вокруг ПГА через две недели после имплантации.

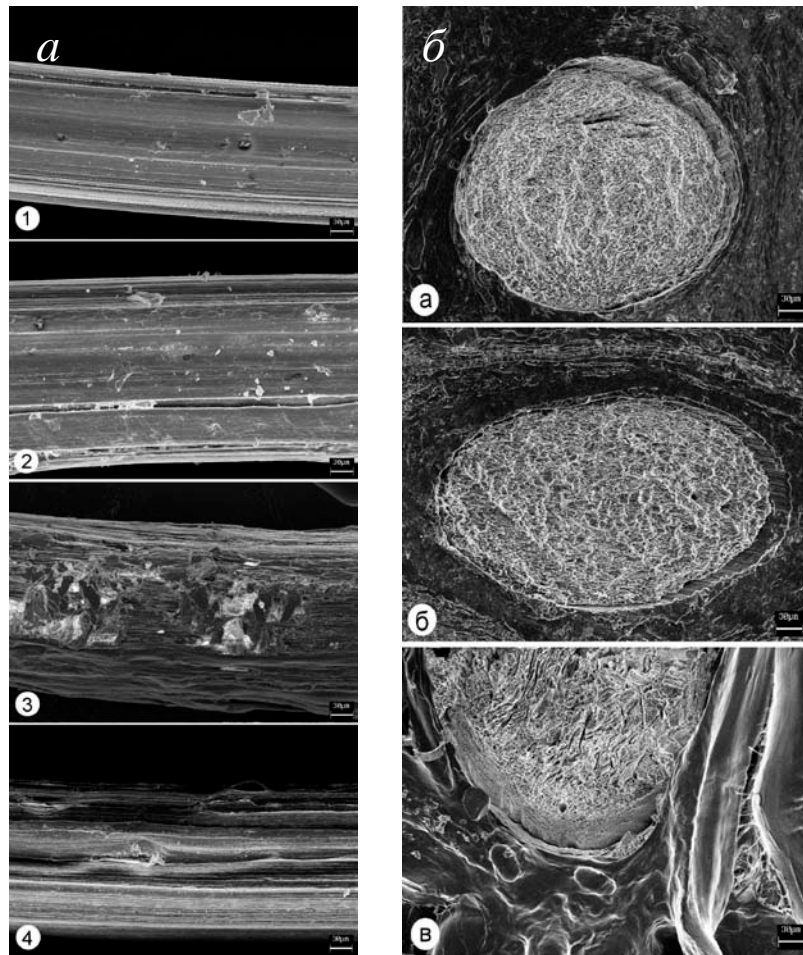


Рис. 5.1. Морфология деградирующих волокон из ПГА *in vivo*: *a* – РЭМ снимки поверхности через 90, 120 и 180 суток (2, 3, 4); 1 – исходный образец; *б* – РЭМ снимки срезов внутренней структуры волокон на разных сроках: 14, 120, 180 суток после имплантации (*a, б, в*). Маркер 30 μm (материалы и фото Е. Шишацкой)

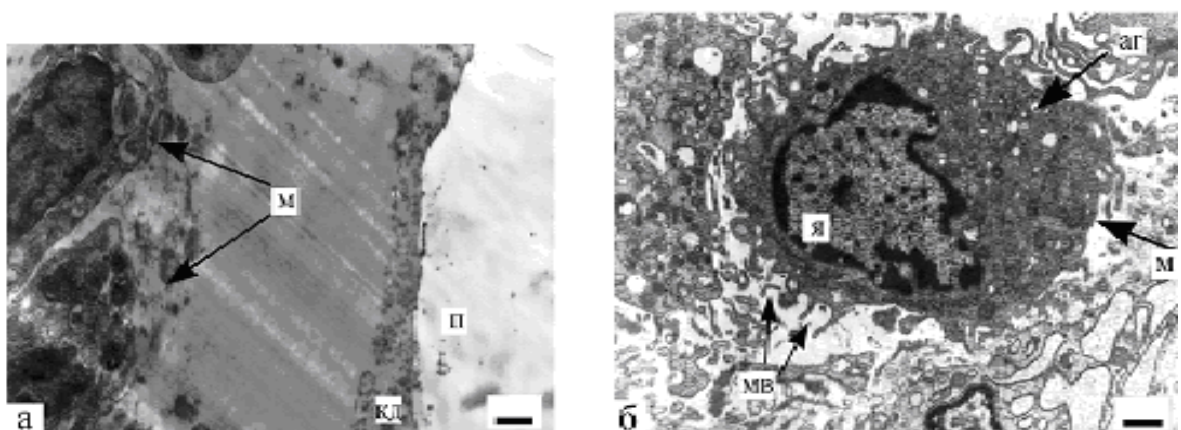


Рис. 5.2. Ультратонкие срезы участков тканей вокруг имплантата из ПГА через 2 недели: *a* – участок, прилегающий к полимеру: кд – клеточный детрит, м – макрофаги, п – полимер; *б* – зрелый макрофаг: я – ядро, аг – аппарат Гольджи, мв – микроворсинки. Маркер 1 μm (материалы и фото Е. Шишацкой)

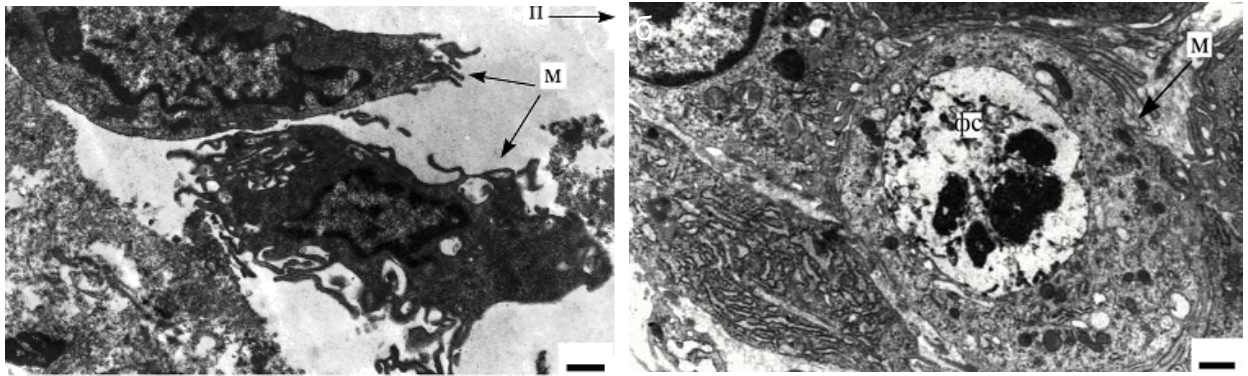


Рис. 5.3. Ультратонкие срезы тканей вокруг ПГА-имплантата: *а* – активные макрофаги (м), распластанные на полимере (п) через 16 недель после имплантации; *б* – активный фагоцитирующий макрофаг (м) с крупной фагосомой (фг) (24 недели после имплантации). Маркер 1 мкм (материалы и фото Е. Шишацкой)

На [рис. 5.3](#) видно, что спустя 16 недель после операции вокруг экспериментальных имплантатов из ПГА присутствует большое количество активных макрофагов в тканях, примыкающих к имплантатам, включая распластанные макрофаги непосредственно на полимере ([рис. 5.3, а](#)) и фагоцитирующие макрофаги с крупными внутриклеточными фагосомами ([рис. 5.3, б](#)).

Процесс разрушения материалов имплантатов временного действия сопровождается образованием растворимых продуктов деградации различной химической структуры (высоко- и низкомолекулярных, мономеров и более простых по структуре соединений), которые поступают в тканевую жидкость и кровь и транспортируются по организму. Возможны ситуации, когда образуемые продукты могут подвергаться дальнейшим химическим превращениям – окислению, восстановлению, вступают в реакции ацилирования, присоединения и т. п. Это характерно для этиленгликоля, выделяющегося при биодеструкции отдельных марок полиэфируретанов и полиэтилентерефталата, так как при этом происходит образование муравьиной и щавелевой кислот. При деградации полилактоидов высвобождаемые мономеры молочной кислоты вызывают значительное закисление тканей, до 3,4. Это сопровождается воспалительной реакцией тканей и неприятными и болевыми ощущениями пациентов, несмотря на то, что молочная кислота присутствует в организме. В идеале продукты деградации полимерного имплантата должны быть абсолютно безвредными для организма и выводиться из него через выделительную систему. Так, высокая биосовместимость полимера гидроксимасляной кислоты (полигидроксибутирата) связана с тем, что продукт деградации этого полимера – масляная кислота, является естественным метаболитом клеток и тканей. По современным представлениям, процесс биодеструкции полигидроксибутирата представляется следующим образом: на первом этапе происходит процесс выщелачивания более доступной для фер-

ментов аморфной фазы полимера, а далее под воздействием деполимеризующих ферментов начинается процесс разрыва эфирных связей кристаллических полимерных цепей с образованием тетра-, ди- и мономеров гидроксимасляной кислоты. Последняя под воздействием НАД-зависимой гидроксibuтиратдегидрогеназы превращается в ацетоацетат. Ацетоацетат вступает в трансферазную реакцию с сукцинил-КоА, катализируемую тиофоразой (ацетоацетат сукцинил-КоА КоА-трансферазой), в результате которой образуется ацетоацетил-КоА. Под действием кетотиолазы ацетоацетил-КоА превращается в ацетил-КоА, который поступает на энергетические и анаболические нужды клеток и тканей. Конечные продукты биодegradации полигидроксibuтирата – диоксид углерода и вода.

Биоразрушаемые полимерные материалы являются в настоящее время наиболее востребованными для многих областей биомедицинских применений, поэтому разработка новых типов полимер, изучение кинетики их деструкции и механизма взаимодействия в системе с живым организмом весьма актуальны.

ГЛАВА 6. БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ В КУЛЬТУРЕ. МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Изучение механизмов регенерации тканей и органов, поиск новых технологий, которые могли бы восстановить утраченную функцию органа или системы, привели к появлению новых направлений, возникших на стыке биотехнологии и медицины – *тканевой инженерии* (регенеративной медицины и органогенеза). Эти науки изучают создание органов и тканей *de novo*. В их основе лежит принцип использования функционирующих клеток, трансплантируемых в места дефектов. Будущее медицины сегодня напрямую связывают с развитием клеточных технологий, которые позволяют, не меняя поврежденный орган, «обновлять» его клеточный состав. Такое «обновление» структурно-функциональных элементов органа позволяет решать те же задачи, что и органная трансплантация. Вместе с тем эта технология намного расширяет возможности трансплантационного лечения, делая его доступным для широкого круга разных категорий пациентов. Основой для развития новейших реконструктивных технологий являются функционирующие клетки, способные в зависимости от микроокружения формировать ткани разных типов. Список болезней, лечения которых возможно с применением клеточных технологии, быстро растет.

6.1. История развития клеточных технологий

В начале прошлого века была доказана возможность выделения клеток из тканей животных и культивирования их вне организма, то есть *in vitro*. Освоение и реализация методов культивирования в таких клетках вирусов было вторым этапом развития клеточных технологий. Начало следующего этапа относят к моменту, когда была доказана реальная возможность получения в клетках животных больших количеств вирусного материала. В результате освоения этих методов стало возможным клонировать в клетках специфические гены и получать их экспрессию, а также организовывать получения клеточных популяций в культуре из одной клетки.

Клеточные технологии включают различные подходы и методы, среди которых назовем получение клеток, свободных от микробной контаминации; возможность роста и развития клеток, выделенных из различных тканей и органов; совершенные методы оценки состояния клеток в культуре их динамики, в том числе в условиях проточной культуры.

Научной основой для разработки этих методик стало представление о клетке как главном структурном элементе живых организмов животного и растительного происхождения. Клоду Бернару принадлежит идея возмож-

ности выделения клеток из тканей животных и затем создания условий для роста и воспроизводства их *in vitro*. Он предположил, что отдельная клетка аналогично живым организмам способна сохранять постоянство внутренних условий вне зависимости от изменений в окружающей среде. В 1885 г. была показана возможность сохранения вне организма живых тканей на практике. У. Ру удалось сохранить в жизнеспособном состоянии оболочку куриного эмбриона в теплом физиологическом растворе. В 1897 г. Лёб (Loeb) поддерживал в жизнеспособном состоянии клетки крови и соединительной ткани в пробирках с сывороткой и плазмой крови, а спустя год Льюнгрен продемонстрировал возможность поддержания эксплантатов кожи человека в жизнеспособном состоянии в кислой среде с сохранением способности к реимплантации. Несколько позднее, в 1903 г., Джолли с использованием техники висячей капли наблюдал деление клетки, содержащей лейкоциты саламандры. В 1906 г. Биб и Эвинг подтвердили эту возможность при пересадке лимфосаркомной ткани собаки. Росс Харрисон усовершенствовал методику «висячей капли», для этого он использовал небольшие кусочки ткани, отторгнутые от медуллярного сосуда лягушки и внедренные в ее лимфатический тромб, и выдерживал их в виде капли на нижней стороне покровного стекла, расположенного поверх углубления в предметном стекле. Ему удалось наблюдать с помощью такой «камеры» рост нервных клеток в течение нескольких недель. Барроуз в аналогичных экспериментах в 1910 г. вместо лимфатического тромба использовал тромб плазмы курицы. Алексис Каррель в 1913 г. применил плазму крови, обогащенную экстрактом эмбриона, что ускоряло рост тканей. Эта работа опубликована под броским заголовком – культивирование «бессмертных» клеток. С 1917 г. были начаты эксперименты, ориентированные на инкубацию клеток сердца куриной эмбриона; пересев клеток продолжил Эблинг. Хирург Каррель, весьма сведущий в вопросах асептики, внес существенный вклад в развитие методов поддержания стерильности при культивировании клеток животных *in vitro*. Даже при отсутствии антибиотиков он добился успеха в пересадке клеток, используя хирургическую технику для отторжения отдельных колоний и переноса их в новые условия роста.

Существенное внимание исследователями того периода было уделено совершенствованию рецептов культуральных сред. Так, Тирод модифицировал раствор Рингера и вместо куриной сыворотки и эмбрионального экстракта стал использовать коагулят фибрина. Для наблюдения за делящимися клетками животных Канти в 1928 г. разработал метод кинофотомикрографии. В этот период был разработан метод трипсинизации клеток, необходимый для посева клеток и длительного поддержания культуры.

Впервые клоны клеток в культуре из одиночной клетки были получены Эрлом с сотрудниками в 1948 г. Игл в середине прошлого столетия активно исследовал пищевые потребности клеток в культуре. Клетки, выделенные из раковых опухолей или трансформированные в ходе культивирования, характеризуются «бессмертностью» и коррелируют с гетеропloidностью. Первые суспензионные культуры клеток животных, как правило, основывались на

клетках злокачественных тканей. Это – клетки HeLa, выделенные из раковой опухоли шейки матки человека. Перевиваемая линия карциномы шейки матки была выделена еще в 1952 г. Джемс с сотрудниками, она используется и в настоящее время во многих лабораториях мира.

Следующий этап в развитии методов культивирования диплоидных клеток человека связан с выявлением того, что они являются генетически стабильными и свободными от всех известных латентных и онкогенных вирусов. Поэтому линии диплоидных клеток человека разрешено применять для получения продуктов, предназначенных для людей. Эта догма остается действующей и в настоящее время, хотя новейшие открытия показали присутствие в клетках, выделенных из нормальных тканей, потенциальных онкогенов, идентичных тем, которые найдены в таких известных онкогенных вирусах, как вирус саркомы Рауса и вирус саркомы Молони.

Список типов клеток, которые введены в культуру, достаточно велик. Это элементы соединительной ткани человека (фибробласты), скелетные ткани (кость и хрящи), скелетные, сердечные и гладкие мышцы, эпителиальные ткани (печень, легкие, почки и др.), клетки нервной системы, эндокринные клетки (надпочечники, гипофиз, клетки островков Лангерганса), меланоциты и различные опухолевые клетки. Популяция клеток, однако, не всегда гомогенна и обладает фиксированным фенотипом. Некоторые культуры, например кератиноциты эпидермиса, содержат стволовые клетки, клетки-предшественники и кератинизированные чешуйчатые клетки. В такой культуре происходит постоянное обновление за счет стволовых клеток, пролиферация и созревание клеток-предшественников, а также необратимая дифференцировка, сопровождающаяся «слущиванием» чешуйчатых клеток в культуральную среду.

6.1.1. Источники клеток

Наиболее важным элементом успеха клеточных технологий и тканевой инженерии является наличие необходимого количества функционально активных клеток, способных дифференцироваться, поддерживать соответствующий фенотип и выполнять конкретные биологические функции. Клетки в ходе дифференцировки должны продуцировать внеклеточный матрикс (в его основе белки, в частности, коллаген) соответствующей организации и структуры, выделять цитокины и другие сигнальные молекулы, а также взаимодействовать с соседними клетками или тканями. В связи с этим возникает первая задача тканевой инженерии – поиск и наличие стабильного и доступного источника функционально активных клеток. Источником клеток в принципе могут быть ткани организма и внутренние органы. Возможно использовать соответствующие клетки от пациента, нуждающегося в реконструктивной терапии, или от близкого родственника, то есть использовать *аутогенные* клетки. Например, для реконструкции сустава конкретного лица можно использовать хондроциты, ему же и принадлежащие. Возможно применение

неспецифических типов клеток, например, фибробластов кожи для конструирования тканеинженерных клапанов сердца.

В клеточных технологиях реконструктивной медицины потенциально могут быть использованы различные типы клеток различного происхождения, в том числе первичные клетки и стволовые клетки.

Первичные клетки – это зрелые клетки определенной ткани. Такие клетки могут быть выделены из организма-донора в процессе хирургического вмешательства. Первичные клетки, взятые от донора для имплантации ему же в качестве реципиента, – это наиболее желаемые клетки, так как они обладают максимально возможной иммунологической совместимостью. Однако первичные клетки, как правило, являются дифференцированными неделящимися клетками, то есть не способными делиться, или их потенциал к размножению и росту низок. При культивировании таких клеток *in vitro* возможно проявление тенденции некоторых типов клеток к дедифференцировке при их культивации, в результате которой клетки теряют соответствующий фенотип. Так, хондроциты при ведении в культуру вне организма весьма часто продуцируют фиброзный, а не прозрачный хрящ. Эти негативные тенденции и проявления, присущие первичным клеткам, показали необходимость поиска альтернативных источников клеток для развития технологий клеточной инженерии. Такой альтернативой стали стволовые клетки.

Стволовые клетки – недифференцированные клетки, способные делиться, самообновляться и дифференцироваться в один или более типы специализированных клеток. Различают «взрослые» стволовые клетки и «эмбриональные» стволовые клетки. Главное направление современных исследований стволовых клеток – нахождение факторов стимуляции и условий выращивания для дифференцировки стволовых клеток в необходимые типы клеток. Для получения конкретного типа тканей прежде всего необходимо произвести подбор наиболее подходящей стволовой клетки для формирования необходимой ткани.

С наращиванием знаний в области изучения стволовых клеток происходит определенный пересмотр определения стволовых клеток как «недифференцированных клеток». Это связано с тем, что иногда имеет место дедифференцировка и трансдифференцировка некоторых зрелых клеток. В связи с этим предложено определение «стволовые клетки» сделать более широким и применимым к биологической функции, которую имеет определенный диапазон типов клеток, включая дифференцированные клетки, а не одна структура.

Стволовые клетки могут быть выделены из эмбрионов, зародышей, пуповинной крови, околоплодной жидкости или взрослой ткани (липосата, нозального эпителия, костного мозга), при этом диапазон типов клеток, в которые они могут дифференцироваться, колеблется. Эмбриональные стволовые клетки являются наиболее полипотентными, они могут стать самыми различными типами клеток при соответствующих условиях культивирования. Применительно к задачам тканевой инженерии стволовые клетки в принципе могут быть неистощимым источником клеток и тканей разных типов ([табл. 6.1](#)).

Таблица 6.1

Сравнение клеток эмбриональных стволовых клеток (ES) и «взрослых» клеток; области применения для регенерации тканей [5]

Эмбриональные стволовые клетки		Взрослые стволовые клетки костного мозга (МСК)
Деление <i>in vitro</i>	Бесконечное	Неясно. Вероятно, деление клеток в популяции заканчивается примерно через 50 удвоений клеток
Стабильность	Кариотип может изменяться при продолжительном культивировании	Может измениться локализация клеток; возраст или заболевание влияют на численность клеток и их дифференцировку
Доступность	Несколько стабильных клеточных линий. Постоянство этих линий окончательно не подтверждено	Несколько клеточных линий, но, как правило, требуется аспирация ткани. Разные методы забора образца и разная доступность клеток могут повлиять на результат
Трехмерные взаимодействия	Как правило, растут в виде агрегатов и дифференцируются в виде EB	Как правило, монослойные культуры
Восстановление <i>in vivo</i>	Несколько исследований на животных. Существующие клеточные линии не могут применяться для лечения людей	Продемонстрировано на многих животных, аутогенных и аллогенных трансплантатах у человека

«Взрослые» стволовые клетки – это часть клеток, образовавшихся в результате дифференцировки клеток эмбриона, которые остались не до конца дифференцированными. Ранее считалось, что эти клетки имеют только *олигодифференцировку (монопотентность)*, но в настоящее время известно, что они могут проявлять значительную степень пластичности. Доказано, что такие *взрослые стволовые клетки* делятся надвое. Одна из образовавшихся при этом клеток дифференцируется и превращается в клетку, необходимую ткани для восстановления целостности (например, в случае травмы) или замещения клеток, умерших «естественной смертью» – в результате апоптоза. Вторая клетка остается недифференцированной. Это дает организму возможность замещения поврежденных клеток или поддержания необходимого количества клеток определенных типов, например, красных и белых клеток крови. Каждый человек несет в себе свой собственный запас стволовых клеток в различных участках ткани, включая костный мозг, мозг, печень и кожу, а также кровеносную систему. Поэтому такие клетки можно выделять из организма пациента и использовать для создания тканеинженерного конструктора для последующей имплантации в случае необходимости замены или восстановления органа. Для использования взрослых стволовых клеток необходимы знания о том, где и какие клетки нужно взять для обеспечения их последующего роста вне организма и дифференцировки в необходимую ткань. Наиболее универсальным типом взрослых стволовых клеток и наиболее используемыми в исследованиях и практических применениях являются

мезенхимальные стволовые клетки (МСК), способные дифференцироваться в клетки нескольких типов: жировые, костные и хрящевые. На процесс и направление дифференцировки МСК оказывают влияние состав культивационной среды, а также физические факторы. Например, для превращения в клетки жировой ткани мезенхимальные стволовые клетки должны контактировать друг с другом; при слишком высокой плотности в культуре невозможно добиться их трансформации в костные клетки даже при наличии в среде всех необходимых питательных веществ и ростовых факторов.

Следует отметить, что не все типы взрослых стволовых клеток доступны для манипуляций. Представляется проблематичным в техническом плане получение стволовых клеток мозга. Возможны также ситуации редкой встречаемости некоторых типов клеток (известно, что в костном мозге на 100 тыс. клеток приходится только одна стволовая клетка), но даже эта единственная клетка может не подойти из-за возраста пациента или имеющихся у него заболеваний. Подобные обстоятельства вносят существенные ограничения в процесс использования взрослых стволовых клеток.

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) обладают гораздо большей пластичностью, чем взрослые, так как способны превращаться в клетки любого типа. Более ранние, *тотипотентные* ЭСК дифференцируются в любую из 250 линий специализированных клеток органов. Необходимо подчеркнуть, что ЭСК *in vitro* не продуцируют клеток трофобласта, плаценты, то есть потенци генома ЭСК меньше зиготы. Соответственно биологический статус ЭСК меньше статуса раннего зародыша. *Плюрипотентные* ЭСК дают более ограниченный спектр фенотипов. Например, мезенхимальные стволовые клетки (МСК), локализованные в опорно-сосудистом каркасе органов, дифференцируются в культуре только в клетки хряща, кости, кардиомиоциты и миоциты. *Монопотентные* стволовые клетки (мышц, жировой ткани, периферических нервов) созревают до одного преобладающего фенотипа клеток. Стволовые региональные клетки взрослого организма наделены *мультипотентностью* – пластичной плюрипотентностью, которая сильно варьирует в контексте органа-реципиента.

Впервые стволовые клетки мышиноного эмбриона были выделены и введены в культуру в 1950-х годах. Клетки были получены из клеток половых зачатков 12-дневного мышиноного эмбриона, которые впоследствии у взрослого животного должны были превратиться в мышинные яйцеклетки или сперматозоиды. В 1981 г. был найден другой источник эмбриональных стволовых клеток, обладающих абсолютной дифференцировочной пластичностью, – клетки четырехдневного мышиноного эмбриона. В конце 1990-х стало возможным выделение эмбриональных стволовых клеток из первичных половых клеток и пятидневных эмбрионов человека. Впоследствии плюрипотентные стволовые клетки были выделены из человеческой плаценты, полученной в результате нормальных родов, а также пуповинной крови. В зависимости от состава питательной среды такие клетки могут трансформироваться в клетки различных тканей. Эмбриональные стволовые клетки, несмотря на проявления этического беспокойства в некоторых кругах и имеющие место дискус-

сии, являются в настоящее время наиболее приемлемым источником для клеточных технологий и тканевой инженерии. Эмбриональные стволовые клетки мышей (ES) были описаны впервые спустя два десятилетия после их выделения из внутренней клеточной массы развивающегося *бластоциста* (ранняя стадия развития эмбриона) и выращены в лаборатории. Доказано, что клетки ES являются тотипотентными, то есть они способны дифференцироваться во все виды, включая клетки зародышевой линии (*герминальные*) и *трофобласт*. Показано, что в культуре *in vitro* клетки ES бесконечно делятся без дифференцировки, сохраняя способность дифференцироваться во все зрелые соматические фенотипы при получении в составе культивационной среды соответствующих факторов дифференцировки.

Выделение эмбриональных стволовых клеток – это крупный прорыв в биологии развития, во-первых, представляющий собой модель для изучения процессов раннего эмбрионального развития и клеточной дифференцировки, и, во-вторых, это открыло путь для практического использования и становления клеточных технологий и тканевой инженерии.

С помощью ЭСК разрабатываются эффективные технологии лечения многих наследственных заболеваний, которые не удалось решить методами молекулярной генетики, включая средства генной терапии. Прежде всего, в целях экстренной помощи (острая недостаточность органа) обоснованы и допустимы трансплантации аллогенных стволовых клеток, которые в определенных условиях микроокружения способны дать ростки донорской ткани в органе-реципиенте в количестве, достаточном для компенсации генетического дефекта. Доказано, что лишь 3–5 % генетически нормальных клеток достаточно, чтобы восстановить утраченную биохимическую функцию поврежденной печени, скелетной мышцы, эндокринной железы.

Эмбриональные стволовые клетки человека имеют ряд существенных отличий от клеток ES мышей, культивируемых *in vitro*. Во-первых, клетки ES человека растут медленнее, обычно образуя плоские, а не сферические колонии, и легче мышинных разделяются на одиночные клетки. Во-вторых, клетки ES человека не реагируют на ингибиторный фактор лейкоза (LIF), поэтому для сохранения недифференцированного состояния им требуется подсадка мышинных эмбриональных фибробластов (MEF) и присутствие основного фактора роста фибробластов. В-третьих, клеткам ES человека для роста и дифференцировки необходимы специфичные субстраты.

Стволовые клетки, полученные из взрослых организмов и эмбрионов, имея определенные различия, обладают большим терапевтическим потенциалом ([табл. 6.1](#)). Дифференцировка клеток ES, как правило, начинается с формирования четких клеточных агрегатов или *эмбриоидных тел* (EB). Эмбриоидные тела состоят из клеток трех основных зародышевых слоев: эктодермы, энтодермы и мезодермы. В течение всего лишь нескольких дней EB могут вырастать и вовлекать многие тысячи клеток, являясь богатым источником клеток-предшественников всех зародышевых слоев. *Клетки-предшественники* (иногда называемые *трансусливающими клетками*) «ориентированы» на формирование конкретного типа клетки. Они сохраняют

способность к бесконечному делению и помогают созданию основополагающих структуры и функции тканей.

Технология культивирования стволовых клеток и состав используемых сред оказывают определяющее влияние на клеточную дифференцировку. Варьируя условия культивирования стволовых клеток и меняя набор индукторов и факторов дифференцировки, можно получать культуры с конкретным фенотипом. В качестве факторов дифференцировки и индукции клеток используют цитокины, факторы роста, аминокислоты, белки, активные ионы и др. Применяют для этого также совместное выращивание стволовых клеток с целевым типом клеток или тканей, используемых в качестве своеобразного «шаблона» дифференцировки. Известны также методы *сортировки клеток*, в частности, сортировка клеток с флуоресцентной меткой. При использовании этих подходов из стволовых клеток, главным образом, *in vitro*, возможно получение фактически всех типов клеток организма.

Стволовые клетки поддаются также генетической модификации, в особенности клетки ES; на их основе созданы *трансгенные* (с измененным генотипом) и *нокаутные* (не несущие данного гена) животные. Это позволяет провести более подробное исследование генома и специфических функций отдельных генов.

6.2. Техника ведения клеточных культур

Нормальная функция большинства клеток и тканей зависит, кроме растворимых в цитоплазме факторов, от пространственного взаимодействия с соседними клетками и с субстратом или внеклеточным матриксом (ВМ). Взаимодействия клетки с клеткой и клетки с ВМ координируются несколькими семействами мембранных белков, называемых *молекулами адгезии*. Они имеют основополагающее значение для адгезии клеток, помогая определять трехмерную клеточную структуру, а также участвовать в передаче сигналов клеткам, в регуляции отбора клеток, их росте и дифференцировке, а также иммунного распознавания и воспалительных процессов. Следовательно, обобщение функции и трехмерных взаимодействий клеток важно для создания жизнеспособных конструкторов при замене ткани *in vivo*.

Различают два основных типа культуры клеток: *первичную культуру* и *культуру стабильных клеточных линий*. *Первичные культуры* получают непосредственно из тканей животных и человека; культивированию подлежат маленькие кусочки тканей или отдельные клетки, полученные после обработки тканей ферментами (например, трипсином и коллагеназой). Недостатком первичных культур является то, что они стареют физиологически, при этом клетки утрачивают способность к делению и некоторые фенотипические признаки. Преимущество первичных культур в сохранении многих первоначальных характеристик в течение всего ограниченного срока жизни. *Стабильные клеточные линии* могут поддерживаться в культуре в те-

чение ограниченного числа клеточных делений или неопределенно долгий срок. Многие из таких линий получают из опухолевых тканей пациентов, при этом некоторые из клеточных линий становятся бессмертными (*иммortalизованными*) при внедрении в клетку онкогенных вирусов. Эти клеточные линии могут продуцировать неограниченное число клеток, но клетки сохраняют очень мало специфичных для ткани характеристик.

Для роста клеток, полученных из тканей, требуется прикрепление к субстрату, в то время как клетки, полученные из крови, растут во взвеси. Клетки во взвеси (*в суспензионной культуре*) имеют округлую форму, в то время как клетки, прикрепленные к субстрату (*матриксу*), морфологически гетерогенны в зависимости от происхождения. После прикрепления клеток к матриксу (*адгезии*) они начинают делиться и размножаться, образуя плотный непрерывный слой, покрывающий матрикс. Большинство клеток, в особенности первичные клетки, контактируя с соседними клетками, прекращают рост, однако опухолевые клетки обычно имеют тенденцию к трехмерному росту с образованием множества слоев. Клетки в культуре, занимающие 70–80 % матрикса, в идеале можно обрабатывать трипсином, и затем пересевать часть клеток в новый флакон со свежей культуральной средой, то есть получать субкультуры.

6.2.1. Питательные культуральные среды

Культуры клеток животных и человека предъявляют определенные требования к жидкой (питательная среда), газообразной (концентрация газов) и твердой (поверхность субстрата) фазе. Для роста *in vitro* клеткам необходимы ростовые субстраты и факторы роста и дифференцировки. Основная культуральная среда содержит аминокислоты, глюкозу, витамины, жирные кислоты и некоторые белки, неорганические соли. Культуральная среда должна иметь заданные значения активной реакции; большинство клеток в культуре растут при pH в пределах от 7,2 до 7,4. Клетки растут в гумидной среде (в составе которой 5 % CO₂). Буферная система на основе бикарбоната в сочетании с атмосферным 5 % CO₂ поддерживает оптимальное среднее значение pH. К основной (или минимальной среде) обычно добавляется 10–15 %-ная эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС), обогащенная белками и факторами роста. Во избежание заражения клеток бактериями и грибами в культуре клеток необходимо использовать сочетание антибиотиков и/или антигрибковых препаратов. Клетки выращиваются во влажном термостате при 37 °C (оптимальная температура) в атмосфере, содержащей 5 % CO₂ при поддержании условий строгой стерильности.

Для приготовления питательных сред обычно используют солевые растворы Эрла и Хенкса. Эти растворы, как и фосфатносолевой буфер Дульбекко и Фогта, применяют также для орошения и промывки клеток при пассировании культур, выделении клеточных линий и других манипуляциях с культурами клеток. Важным условием культивирования является осмотическое

давление. Для стабилизации pH используют бикарбонатный буфер. Растворы могут содержать малое количество бикарбонатного буфера (раствор Хенкса), они предназначены для поддержания pH в плотно закрытых сосудах. В других (растворе Эрла) бикарбоната больше, их применяют в системах с повышенным парциальным давлением CO_2 . Если культуры ведутся вне CO_2 -инкубатора, где pH поддерживать труднее, необходимы альтернативные буферные системы. Широко применяемым буфером является HEPES 4-(2-оксиэтил)1-пиперазинэтансульфоновая кислота. HEPES легко растворим в воде, не связывает двухвалентные катионы, не цитотоксичен до концентрации 0,05M. Используется в концентрациях 0,01 и 0,03 M.

Наиболее применяемыми для ведения клеточных культур являются среды Игла (MEM, минимальная среда) и ВМЕ (основная среда). Чаще используется MEM. Она содержит минеральные вещества, аминокислоты (13 незаменимых), 6 водорастворимых витаминов, холин и инозит, выполняющие роль углеводородного субстрата. MEM используется только с сывороткой, так как в ней отсутствуют биотин, витамин B12, ионы железа и микроэлементы; ее основой служит раствор Эрла. Среда Дульбекко DME или DMEM (двойная модификация среды Игла) используется при культивировании клеток различных типов, в том числе нетрансформированных клеток и гибридом.

Среда Искова IMDM является модификацией среды Дульбекко, в нее добавлены незаменимые аминокислоты, биотин, витамин B12, селенит натрия; введен HEPES и уменьшены концентрации NaCl и NaHCO_3 . Эта среда бессывороточная, обычно используется для культивирования лимфоцитов и кроветворных клеток. Среда МакКоя 5A и серия сред RPMI. Среда МакКоя 5A разработана в 1958 г. для поддержания клонального роста клеток карциномы Уолкера 256 в присутствии сыворотки, а затем уже других первичных культур и различных клеточных линий. Обычно производится в модификации Ивката и Грейса (RPMI) и предназначена для культивирования лейкоцитов в присутствии сыворотки, часто применяется и для культивирования гибридом. Концентрация CO_2 в атмосфере при культивировании 5 %. Среда 199 разработана в 1950 г. для культивирования фрагментов сердца из эмбриона цыпленка. Для среды характерны широкий спектр питательных веществ и невысокая их концентрация. Используется без добавок как поддерживающая для первичных клеток, а с сывороткой как ростовая среда для быстро размножающихся клеток. Нормальные, сохраняющие специфические функции клетки на стандартных средах не размножаются (если не трансформированы). Для оптимального роста клеток обычно добавляют 5–20 % фетальной (эмбриональной) сыворотки.

Сыворотка представляет собой чрезвычайно сложную смесь мелких и крупных молекул, способных как вызывать, так и тормозить рост клеток. К главным функциям сыворотки относятся: обеспечение гормональными факторами, стимулирующими рост клеток и их функции; обеспечение фактора-

ми прикрепления и распластывания клеток; обеспечение транспортными белками, переносящими гормоны, минеральные вещества, липиды и т. д. Белки сыворотки, прямо и специфически участвующие в стимуляции клеточного деления, называются «факторы роста». Большинство ростовых факторов присутствуют в сыворотке в концентрации нескольких нанограммов на миллилитр и ниже. Некоторые из этих факторов специфичны для клеток на определенной стадии дифференцировки, действие других не ограничено каким-либо одним типом клеток. Один и тот же тип клеток может быть стимулирован различными ростовыми факторами. Например, фибробласты размножаются в ответ на фактор роста фибробластов, фактор роста эпидермиса, фактор роста, синтезируемый тромбоцитами и соматомедины. Все эти вещества являются *митогенами* (стимулируют митоз). Другим важным фактором роста практически для всех типов клеток является гормон инсулин; применяют также глюкокортикоиды (гидрокортизон, дексаметазон), стероиды (эстрадиол, тестостерон, прогестерон) и гормоны щитовидной железы (трийодтиронин). Гормоны стимулируют или подавляют рост в зависимости от типа клеток и их плотности. Глюкокортикоиды, например, влияют на пролиферацию клеток, изменяя их чувствительность к факторам роста.

Известны бессывороточные среды для размножения клеток, они, как правило, узкоспециализированы и предназначены для определенного типа клеток. К базовой среде добавляется инсулин, трансферрин, гидрокортизон или его аналог дексаметазон и т. д. Бессывороточные среды имеют определенные преимущества: улучшение воспроизводимости результатов опыта вследствие большей стабильности состава среды; снижение риска заражения культуры вирусами, грибами, микоплазмой; облегчение очистки продуктов клеточного метаболизма; снижение влияния дополнительных белков на результаты биологических исследований; отсутствие цитотоксичности сыворотки.

Многие клетки млекопитающих, прежде чем приступить к пролиферации и образовать клеточный монослой, должны прикрепиться к субстрату и распластаться на нем. В связи с этим встает вопрос о подходящем материале. В качестве субстрата в настоящее время используют несколько материалов. *Стекло* – лучше всего пирекс (алюмоборосиликатное стекло), так как натрийсиликатное стекло может подщелачивать среду и его необходимо кипятить в слабой кислоте перед употреблением. С каждым использованием пригодность такого стекла падает. *Пластик* – чаще всего используют полистирол, поликарбонат, поливинилхлорид, тефлон и др. *Металлы* – подходит как нержавеющая сталь, так и титан, поскольку эти вещества химически инертны и обладают высоким отрицательным поверхностным зарядом. Клетки прикрепляются за счет электростатических взаимодействий, поэтому поверхность культуральных сосудов должна быть смачиваемой и отрицательно заряженной. Этого можно достичь химической обработкой окисляющими агентами или физическими воздействиями (высоковольтным разрядом,

ультрафиолетовым светом, бомбардировкой высокоэнергетическими электронами). Фирмы, производящие пластиковую посуду, используют эти методы. Некоторые исследователи, несмотря на это, предпочитают даже новую посуду перед посадкой клеток обрабатывать смесью концентрированной серной кислоты и бихромата калия (хромовая смесь), после чего следует тщательная промывка. Иногда поверхность сосуда покрывают веществом, облегчающим прикрепление клеток. Наиболее часто для этого используют коллаген и полиаминокислоты.

6.3. Клеточные технологии и тканевая инженерия

Тканевая инженерия – это междисциплинарная область, объединяющая в единое целое потенциал и методологию наук о жизни и медицины с основами инженерных дисциплин. Основные объекты тканевой инженерии – это клетки и матриксы. Целью тканевой инженерии является конструирование вне организма живых функциональных компонентов, которые могут быть использованы для регенерации поврежденных тканей и/или органов. Хотя эта область считается относительно новой, первый документированный доклад об инжиниринге тканей появился в 1933 г., когда опухолевые клетки были помещены в полимерную мембрану и имплантированы свинье. Тканевая инженерия ориентирована на создание конструкций, обеспечивающих восстановление, укрепление и улучшение функций поврежденных органов и тканей. Материалы, применяемые в тканевой инженерии для создания биоимплантатов, должны обладать спектром специальных свойств и придавать тканеинженерным конструкциям характеристики, присущие живым тканям, – это 1) способность к самовосстановлению; 2) способность поддерживать кровоснабжение; 3) способность изменять строение и свойства в ответ на факторы окружающей среды, включая механическую нагрузку. Имплантаты, как правило, имеют ограниченный срок службы, поэтому для обеспечения возможности долгосрочного их функционирования при реконструкции дефекта органа или ткани тканеинженерные матриксы должны выполнять не столько функцию замены поврежденной ткани, сколько обеспечивать возможности для ее регенерации.

Развитие тканевой инженерии за последнее десятилетие стало результатом нескольких различных факторов: расширения знаний и доступности стволовых клеток, геномики, протеомики, появления новых биоматериалов в качестве потенциальных шаблонов для выращивания тканей, совершенствования конструкций биореакторов для выращивания клеток *in vitro*, расширения понимания процессов заживления ран. Однако, несмотря на то, что исследования в области тканевой инженерии развиваются очень быстро, нельзя не отметить, что в области коммерциализации тканеинженерных продуктов и в области их клинического применения успехи не столь впечатляющие.

Основными проблемами на пути практического применения продуктов тканевой инженерии являются сложности разработки эффективных процессов их применения, гарантирующих жизнеспособность и удовлетворяющих необходимым нормативным требованиям. Тем не менее прогресс в этой области очевиден, и количество людей, использующих результаты продуктов и технологий тканевой инженерии, растет.

Используемый в тканевой инженерии междисциплинарный подход направлен в первую очередь на создание новых биоконпозиционных материалов для восстановления утраченных функций отдельных тканей или органов в целом. Основные принципы данного подхода заключаются в разработке и применении при имплантации в поврежденный орган или ткань носителей из биodeградирующихся материалов, которые используют в сочетании с донорскими клетками и/или с биоактивными веществами. На первом этапе получают донорские, например, мезенхимальные клетки костного мозга (или используют клетки из банка клеточных культур), далее клетки культивируют *in vitro* на подложке (каркасе, матриксе) (scaffold) из биodeградируемого и биосовместимого материала и затем конструкцию имплантируют в место дефекта костной ткани (рис. 6.1). Техника получения биоактивных имплантатов и биоискусственных органов включает: 1) изготовление биосовместимых и биоабсорбируемых конструкций (инкубаторов) (scaffolds) для культивирования аутологических клеток пациента или клеток, взятых из банка, 2) выращивание клеток и формирование тканей *in vitro* и 3) последующую имплантацию полученных конструкций пациенту.

Для успешной индукции тканегаза в месте имплантации необходимо создать высокую начальную концентрацию клеток (до 10^7 – 10^8). Простое введение суспензии клеток зачастую оказывается малоэффективным, поэтому возникает серьезная проблема поиска адекватного носителя для закрепления трансплантируемых клеток в организм реципиента. Наиболее ответственным этапом использования культивированных клеток является трансплантация их в зону повреждения, которая зависит от того, какая часть клеток попадет в зону дефекта; адгезируются ли культивированные клетки на носителе, сохранят ли они активное функциональное состояние. При этом одной из сложных проблем является выбор адекватного носителя для клеток, так как для реализации своих потенциалов культивируемые клетки должны определенное время находиться в фиксированном к носителю состоянии. Это может быть связано с гистогенетическим свойством данных клеток проявлять свои пролиферативные свойства будучи организованными в сложные трехмерные структуры.

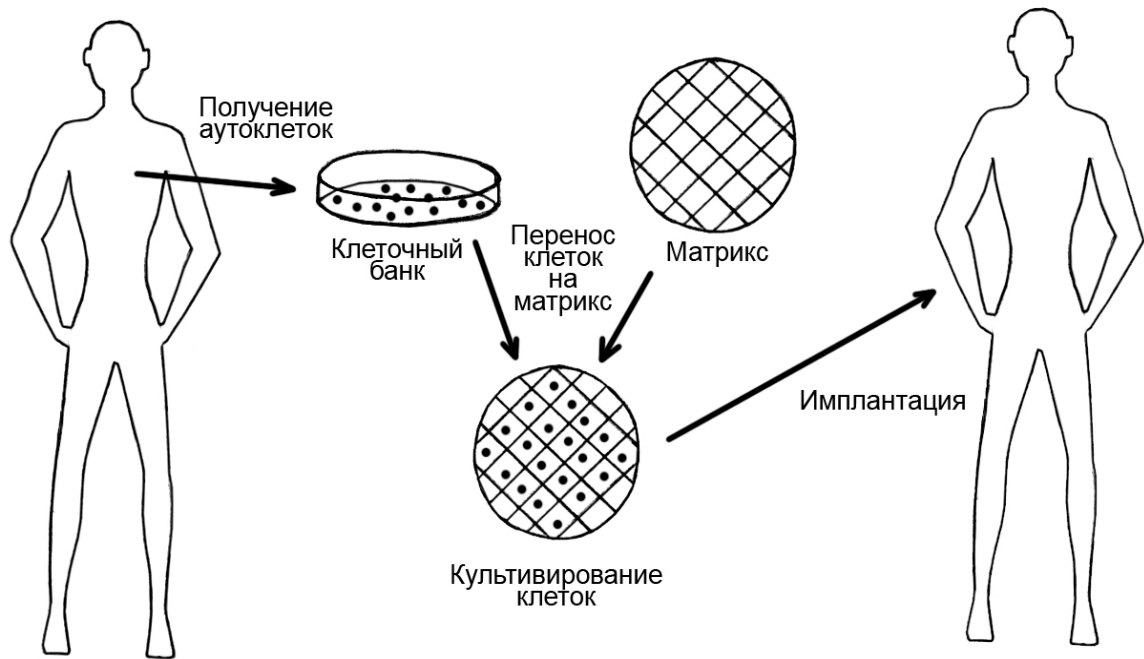


Рис. 6.1. Методология клеточной и тканевой инженерии

Проблема, стоящая перед тканевой инженерией, заключается в том, чтобы оптимизировать выделение, размножение и дифференцировку клеток, сконструировать каркасы (матрицы) или системы доставки, способствующие поддержанию и координации роста трехмерных тканей в лаборатории. Одна из идеальных стратегий тканевой инженерии заключается в заборе стволовых клеток у пациента, дальнейшем размножении их в клеточной культуре и высеве этих клеток на матрицы. Стволовые клетки могут дать начало множеству типов специализированных зрелых клеток в результате процесса, называемого дифференцировкой, если на них воздействовать конкретными биологическими стимулами. Матрицы (каркасы) должны выступать в качестве шаблона и стимула для размножения и дифференцировки стволовых клеток в специализированные клетки, генерирующие специфическую новую ткань. Ткань может быть либо выращена на матриксах, которые после имплантации в организм хозяина постепенно (по мере роста новой ткани) полностью исчезнут (резорбируются), при этом в месте дефекта останется только новая ткань. Возможно также имплантировать «биокомпозит», состоящий из матрикса с уже частично сформированной новой тканью. Так или иначе после имплантации тканеинженерная конструкция должна сохранить свою структуру и функции в течение периода времени, необходимого для восстановления нормально функционирующей ткани в месте дефекта и интегрировать с окружающими тканями.

6.3.1. Биоматериалы для клеточных матриц

Идеальные матрицы, удовлетворяющие всем необходимым свойствам, к сожалению, пока не созданы, их еще предстоит разработать. При конструировании разрабатываемый матрикс следует оценивать, исходя из таких критериев.

Во-первых, для того, чтобы выполнить свою функцию (регенерировать поврежденную ткань), матрикс (каркас будущих тканей) должен иметь структуру, которая действует как шаблон или матрица для роста ткани в трех измерениях и стимулирует новый рост в форме, заданной каркасом. Конструкцией шаблона является структура, копирующая структуру ткани организма-хозяина.

Во-вторых, для того, чтобы позволить ткани расти в трех измерениях, шаблон должен быть сетью больших пор (макропор). Поры должны быть соединены друг с другом, а отверстия между порами должны иметь диаметр более 100 мкм. Взаимосвязанная сеть пор необходима для того, чтобы обеспечить клеткам способность мигрировать по матриксу и способствовать росту ткани на протяжении всего шаблона. В условиях культуры клеток *in vitro* и роста ткани сеть пор должна обеспечивать доставку компонентов среды ко всем клеткам, снабжая их нужными питательными веществами. После того как тканеинженерная конструкция (матрикс+клетки) будет имплантирована, динамика материала матрикса должна обеспечить формирование развитой по всему объему системы взаимосоединенных пор. Это необходимо для того, чтобы во всем объеме матрикса циркулировали кровь и тканевая жидкость для обеспечения клеток и тканей питательными веществами. В конечном счете идеальные матрицы должны стимулировать рост кровеносных сосудов (*ангиогенез*) внутри сети пор. Так, минимальный диаметр отверстия для ангиогенеза и для вращивания кости в случаях применения инжиниринга костной ткани составляет порядка 100 мкм.

В-третьих, для создания оптимального матрикса, помимо необходимой конфигурации и пористости, следует обеспечить требуемые структуру и свойства поверхности. Функционирующие клетки должны прикрепляться к субстрату (матриксу), чтобы далее формировать свой внеклеточный матрикс. Поверхностная текстура пор нанометрического масштаба или шероховатость поверхности в нанометрическом масштабе влияют на функциональную активность клеток.

В-четвертых, необходимое свойство идеальных матриц – это способность к биоразрушению. Продукты разрушения (распада) материала матрикса должны представлять собой нетоксичные продукты, которые выводятся из организма или метаболизируются в нем. Скорость распада матрикса должна быть контролируемой и соответствовать скорости образования новой ткани в месте дефекта. Разрушаемые полимеры и гидрогели – наиболее часто используемые материалы для изготовления резорбируемых матриц.

В-пятых, идеальные каркасы также должны активировать клетки ткани для саморегенерации, так как они должны функционировать в качестве сис-

темы доставки и контролируемого выхода веществ, активирующих клетки. В материал матрикса можно включать биологически активные соединения, факторы роста клеток, лекарственные препараты.

В-шестых, механические свойства матрикса должны соответствовать механическим свойствам ткани организма-хозяина. Структура и прочность рассасывающихся каркасов должны также сохраняться до тех пор, пока не будет регенерировано достаточно ткани организма-хозяина.

Матрикса для тканевой инженерии должны производиться в соответствии с требованиями, предусмотренными Международной организацией стандартов (ИСО), а также конкретных государственных и отраслевых стандартов. Целесообразно при разработке матриксов использовать материалы, которые уже сертифицированы и допущены к применению в клинике.

Основными характеристиками биологически совместимых *матрикса* для создания тканеинженерных конструкций должны быть: отсутствие цитотоксичности, поддержание адгезии, фиксации, пролиферации и дифференцировки, помещенных на ее поверхность клеток, отсутствие воспалительной реакции на материал и иммунного ответа, достаточная механическая прочность в соответствии с назначением, биорезорбируемость обычными метаболическими путями. Все необходимые свойства матрикса определяются свойствами исходного материала и технологией его переработки. Поэтому ключевой проблемой для успеха создания эффективных биоконструкций является наличие адекватного биodeградирующего и биосовместимого материала. Одной из сложных проблем является выбор адекватного носителя для культуры клеток. Быстрая деградация носителя-подложки способствует вымыванию клеток вместе с транссудатом из раны, поэтому тканезамещающие имплантаты должны иметь пролонгированный срок биodeградации.

Матрикса могут быть получены из *биологических тканей* посредством удаления клеточных компонентов таким образом, чтобы сохранилась его трехмерная структура, по возможности со всеми факторами роста. Для изготовления матриксов используют биостабильные и биodeградируемые материалы неорганической и органической природы (металлы/сплавы, полимеры, керамику, гидроксиапатиты, композитные материалы, кораллы, коллаген, желатин, эластин, фибронектин, альгинат, хитозан и др.). Формирование матриксов из биodeградируемых полимеров особенно привлекательно. В связи с тем, что имплантируемый матрикс из биodeградируемого материала с функционирующими клетками действует как временный каркас, способствующий формированию зрелой ткани, использование биodeградируемых матриксов является предпочтительным. При использовании не разрушаемых матриксов могут иметь место осложнения, связанные с длительным присутствием чужеродного материала.

Биоразрушаемые полимеры – наиболее популярный материал для матриксов в силу комплекса позитивных моментов. Во-первых, полимеры легко обрабатываются в форме трехмерных шаблонов с морфологией пор, подходящей для тканевой инженерии. Во-вторых, полимеры могут быть механически прочными, включая прочность на растяжение, высокую ударную

вязкость. При этом механические свойства легко контролировать путем изменения молекулярного веса (длины цепи) полимера. В-третьих, ряд биоразрушаемых полимеров успешно применяют в клинике много лет (барьерные сетки, рассасываемый шовный материал). Ряд их имеет соответствующие сертификаты для применения в клинике. Среди применяемых и активно разрабатываемых в настоящее время биоматериалов – алифатические полиэферы, полиамиды, сегментированные полиэфируретаны, полимеры молочной и гликолевой кислот, силикон, полиэтилентерефталат и, с недавних пор, полигидроксиалканоаты (ПГА). Одними из первых материалов для тканевой инженерии стали биodeградируемые синтетические биоматериалы на основе полимеров монокарбоновых кислот – молочной и гликолевой (полигликолиды, полилактиды и продукты их сополимеризации). Было проведено тестирование биосовместимости этих материалов с различными типами клеток и установлено, что они могут служить матрицей для создания тканеинженерных конструкций мышечной, хрящевой, костной и эпителиальной ткани. Для этих целей применимы также и другие полимеры. Например, *полилактон* – полупрозрачный полимер с температурой плавления менее 60 °С, медленно (до трех лет) деградирующий в биологических средах. Из этого полимера возможно получение пластичных и механически прочных конструкций; коммерческий препарат, применяемый в здравоохранении, «Monocryl» фирмы («Ethicon Inc.»). *Полипропиленфумарат* – прочный, пластичный полимер, сохраняющий прочность *in vivo* до 200 дней; биорезорбция происходит ферментативным путем. Весьма важно, что при этом не изменяется pH окружающих тканей (в отличие от описанных выше материалов). Недостатком этого материала является образование выраженной фиброзной капсулы в ответ на имплантацию изделий из него. Производные моноангидридов полиметилена с рядом соединений изучаются в настоящее время; показано, что эти материалы биологически резорбируются поверхностной эрозией в течение 28 недель и обладают высокой механической прочностью (до 60 МПа). Особо перспективными для тканевой инженерии представляются ПГА, из которых возможно получение матриц для культивирования клеток различных типов. Принципиальная пригодность полимерных пленок из полигидроксибутирата (ПГБ) для культивирования животных клеток была показана еще в конце 80-х – начале 90-х гг. XX в; в настоящее время эти полимеры активно изучаются для конструирования тканеинженерных матриц различных типов. На сегодняшний день матрицы на основе полилактидов и полигликолидов легли в основу создания ряда тканеинженерных органных конструкций: кожи, кости, хряща, сухожилий, мышц и др. Другие представители семейства полиэфиров, разрабатываемые сегодня, возможно, также займут надлежащее место при конструировании матриц для тканевой инженерии, которая в настоящее время остро нуждается в биосовместимых и резорбируемых материалах.

Биоактивные керамические каркасы имеют высокую прочность на сжатие и высокий модуль Юнга, но низкую жесткость, то есть являются хрупкими материалами. Окись алюминия и синтетический гидроксиапатит –

это керамические материалы, которые наиболее часто используются в биомедицине. Окись алюминия – это биоинертный керамический материал, поэтому он не является идеальным для использования в качестве каркасов для регенерации тканей. Гидроксиапатиты и трикальций-фосфатные материалы пригодны для формирования трехмерных пористых матриц, что необходимо для тканевой инженерии. Показано, что керамические материалы в виде пористых структур пригодны для выращивания остеобластических клеток, такие матрицы выпускаются серийно – это «Endobon®» (фирма «Мерк», Германия), «Interpore®» («Интерпор Интернэшнел, Ирвин», США).

Природный материал *коралл* после удаления органической составляющей активно исследуется в качестве материала для тканеинженерных конструкций, предназначенных для восстановления тканей, прежде всего, костной. Размер пор в типичных коралловых конгломератах находится в пределах от 200 до 300 мкм, при этом поры соединены между собой таким образом, что строение коралла напоминает строение губчатой кости.

Биоактивное стекло используют для получения объемных пористых матриц. В силу аморфного строения этот материал формирует связь с костью значительно быстрее биокерамических материалов. Аморфная структура, как известно, быстрее кристаллической подвергается разрушению в биологических средах; поэтому гидроксиапатит формируется быстрее на стеклянном, чем на синтетическом гидроксиапатите. Биоактивные виды стекла могут производиться двумя путями: традиционной плавкой-обработкой и посредством процесса золь-гель. Биоактивные виды стекла, полученные посредством превращения золь-гель, имеют пористое строение в нанометрическом диапазоне, при этом в результате технологического процесса они формируют развитую площадь поверхности, равную $150\text{--}600\text{ м}^2 \times \text{г}^{-1}$, что на два порядка выше, чем у стекла, получаемого плавкой. Поэтому разрушение матрикса *in vivo* происходит быстрее, чем у видов стекла, полученных в результате плавки, при одинаковом составе. На поверхности материала имеется множество силаноловых групп, выступающих в качестве зон образования активных центров для формирования слоев гидроксиапатита, что также делает виды стекла, полученные процессом золь-гель, более биологически активными. Скорость растворения каркасов из биоактивного стекла можно контролировать посредством изменения степени пористости материала.

Композиты, применяемые для конструирования матриц, как правило, базируются на полимерных и керамических материалах. Для этих целей наиболее часто применяют сополимеры полигликолидов/полилактидов и поликапролактоновых резорбируемых полимеров. С недавних пор для этих целей активно исследуются ПГА. Для придания дополнительной прочности, а также биоактивности матриксу, к полимерной матрице добавляют наполнители в виде биоактивной керамики (синтетический гидроксиапатит, трикальцийфосфат, коралл, волластонит). Придание матриксу одновременно двух необходимых свойств, – механической прочности и биоразрушаемости, – трудно достижимая задача, поэтому поиск идеальных материалов для идеальных матриц продолжается.

Матрикс (scaffolds) должны обладать многофункциональностью, достаточной механической прочностью и эластичностью, биосовместимостью на белковом и клеточном уровне, способностью прикрепляемости клеток, стимулировать пролиферацию и дифференциацию клеток, способностью к неоваскуляризации и возможностью стерилизации без изменения медико-технических свойств. Применение таких биоконструкций, дополнительно нагруженных лекарственными препаратами (антибиотиками, гормонами, витаминами, белковыми факторами и др.), является революционным направлением в реконструктивной хирургии и в трансплантологии и имеет огромные перспективы. Для биodeградируемых матриксов наиболее важное свойство – регулируемое время биodeградации. Матрикс должен деградировать на биологически безопасные соединения со скоростью роста новой функционирующей ткани и полностью замещаться тканью того или иного органа.

Матрикс можно разделить на две категории: *имплантаты* и *экстракорпоральные системы*. *Импантируемые матриксы* подразделяют на *закрытые* (иммуноизолирующие) и *открытые* системы. Основным элементом закрытого матрикса является микропористая полупроницаемая мембрана, ограничивающая взаимодействие импантированных клеток с внутренней средой организма «хозяина».

Открытые системы служат субстратом для формирования тканей из клеточного материала *in vitro*, а после имплантации новая ткань структурно интегрирует с тканями «хозяина». Аутотрансплантация позволяет избежать трудностей, связанных с иммуногенными реакциями и отторжением, а также допускает интеграцию имплантата с тканью пациента. Главные особенности «открытых» матриксов – пористость и способность порообразования при контакте с биологическими средами; контролируемое время биорезорбции в организме с постепенным замещением новой тканью в месте дефекта. Открытые матриксы получают в виде двухмерных пленок, мембран, а также трехмерных структур в виде пористых губок, гелей, плотных и пористых объемных конструкций.

Двухмерные матриксы (2D). К матриксам такого типа относятся *мембраны, пленки и сетки*; это наиболее простой тип открытых систем. Плоская поверхность пленок представляется приемлемым субстратом для культивирования клеточных культур *in vitro*. Достоинства таких систем заключаются в относительной простоте изготовления и применения. Так, пористые сетчатые матриксы получают различными методами. Это плетение волокон, формование окунанием в раствор, выщелачивание частиц соли, газовое вспенивание, сушка замораживанием и экструзия. Получение двухмерных матриксов в виде плотных пленок и мембран требует предварительного растворения полимера. Для этого необходимы знания закономерностей растворения полимеров и «поведения» растворных систем. С использованием *техники испарения растворителя* из полимерных растворных систем возможно получение разнообразных пленочных матриксов с различными характеристиками поверхности ([рис. 6.2, а](#)). Матриксы в виде пленок получают методом полива разогретого до 35 °С растворов полимера на обезжиренную поверхность

предварительно нагретых до такой же температуры стекол, тефлона, полированного металла; высушивают пленки в беспылевом боксе при комнатной температуре в течение нескольких суток.

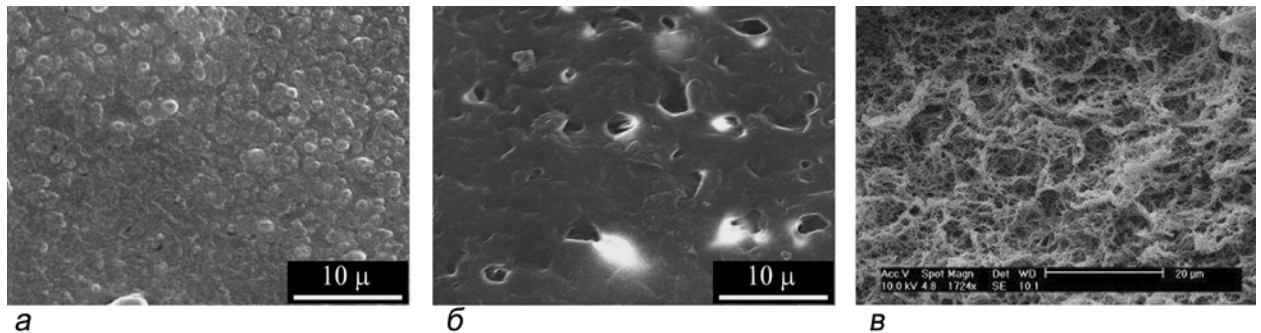


Рис. 6.2. Электронные микрофотографии двумерных матриц из полигидроксибутирата: гибкая плотная пленка (а), маркер 10 мкм; мембрана, полученная с применением техники выщелачивания (б), маркер 10 мкм; мембрана, полученная осаждением трехкомпонентной системы «ППГБ-хлороформ-тетрагидрофуран» (в), маркер 20 мкм (материалы и фото Е. Шишацкой)

Свойства поверхности и пористость матриц играют большую роль для прикрепления и пролиферации клеток. Требования к размерам пор специфичны в зависимости от типа культивируемых клеток. Например, при культивировании остеобластов маленькие поры могут вызвать состояние гипоксии, а также остеохондрозные состояния при костеобразовании, в то время как более крупные размеры пор обеспечивают нормальное протекание остеогенеза и способствуют васкуляризации имплантата. От размера пор в матрице зависят диффузионные свойства конструкции, определяющие отток продуктов обмена клеток и снабжение их питательными компонентами. Один из способов получения пористых матриц из полимеров – это получение двухкомпонентных смесей и последующее выщелачивание в растворе одного из компонентов, обладающего растворимостью в данной системе. Применение многокомпонентных растворных систем полимеров позволяет получать гамму пористых материалов с пористостью до 90 % при размере пор от 100 до 350 нм. Альтернативой такому способу является использование техники образования волоконных структур. Обычно, используя полимерные материалы, получают пористые микротрубочки или ультратонкие волокна. Как правило, для этого к раствору или расплаву полимеров добавляют частицы хлорида натрия размером от 80 до 200 мкм в соотношении 1:2 по массе. Из смеси формируют изделия, которые потом промывают водой. В качестве подложки при формировании волоконподобных трубочек используют, например, тефлон. При использовании техники выщелачивания («leaching»), как правило, применяют кристаллы хлорида натрия или сахарозы, которые обладают высокой растворимостью. Варьируя концентрацию последних, можно задавать общую пористость матриц и размеры пор (рис. 6.2, б). Возможно также применение трехкомпонентных смесей, состоящих из растворов полимеров и осад-

телей. На базе изучения растворимости полигидроксибутирата в ряде растворителей (хлороформе, дихлорэтаноле, тетрагидроэтаноле и диоксане), исследованных свойств полимерных растворов, включая поведение растворов при их взаимодействии с другими жидкостями, не являющимися растворителями для ПГА: тетрагидрофуран (ТГФ), диметилформамид (ДМФ), этанол, вода, найдены оптимальные концентрации каждого осадителя и показана пригодность таких трехкомпонентных систем для получения высокопористых полимерных матриц с размером пор меньше 5–10 мкм (рис. 6.2, в).

Свойства поверхности пленочных матриц, как правило, оценивают на базе измерения краевых углов смачивания водой (θ , град), которые позволяют вычислить следующие характеристики: свободную поверхностную энергию (γ_S), свободную энергию межфазовой поверхности (γ_{SL}) и величину сил сцепления (W_{SL}) (эрг/см²), используя известные уравнения Де Жена [3].

Свободную поверхностную энергию полимерных пленок (эрг/см²) находят из уравнения 1:

$$\gamma_S = \gamma_L(1 + \cos \theta)^2 / 4, \quad (6.1)$$

где γ_L – свободное поверхностное натяжение воды, равное 72,8 эрг/см².

Свободную энергию межфазовой поверхности «полимер – вода» (γ_{SL} , эрг/см²) по уравнению:

$$\gamma_{SL} = \gamma_S + \gamma_L - W_{SL}, \quad (6.2)$$

где: γ_{SL} – критерий остаточной межфазовой энергии; γ_S и γ_L соответственно свободная энергия поверхности пленки и воды.

Силу сцепления, характеризующую прочность адгезионного шва между фазами, вычисляют из зависимости:

$$W_{SL} \approx 2\sqrt{\gamma_S \times \gamma_L} \quad (\text{эрг/см}^2). \quad (6.3)$$

Для повышения адгезионных свойств поверхности по отношению к клеткам, улучшения газодинамических свойств изделий и повышения их проницаемости для субстратов и продуктов обмена клеток применяют различные подходы, включая обработку изделий физическими факторами или химическими реагентами. Химическая модификация включает изменение функциональных групп на поверхности полимерного материала, что повышает гидрофильность и обеспечивает лучшую прикрепляемость и лучший рост клеток. Известны положительные примеры иммобилизации на поверхности пленочных матриц коллагена, прививание хитозана, хитозана/полисахаридов или гиалуроновой кислоты. Возможна обработка поверхности пленочных матриц раствором NaOH или липазами, так как в результате происходящих в ходе обработки матриц гидролитических процессов увеличивается гидрофильность поверхности.

Сравнительно новым направлением модификации поверхности матриксов является воздействие на изделия физических факторов. Один из подходов, применяемых для модификации поверхности матриксов, заключается в обработке газовой плазмой. Так, при обработке полимерных пленок аммиачной плазмой происходит включение в структуру пленки до 8 % азота, что сокращает контактные краевые углы на 20–30°, делая поверхность более гидрофильной. Пленки марки «Methanomer[®]», полученные из раствора полимера в хлороформе (производитель фирма «Merck»), подвергали плазменной обработке с использованием аммиака. Пленки имели толщину около 40 мкм и пористую поверхность. Плазменная обработка вела к образованию на поверхности аминогрупп, что существенно меняло структуру поверхности. В зависимости от длительности обработки плазмой контактные краевые углы пленок увеличились от 17 до 60°. Это, в свою очередь, влияло на смачиваемость поверхности, следовательно, ее сродство к адсорбируемым клеткам. Подобный дизайн весьма перспективен для разработки конструкций, поддерживающих рост клеток тканей и органов *in vitro* для реконструктивной хирургии.

Известны также работы, в которых для улучшения свойств поверхности пленочных матриксов применяют лазерную обработку. Обработка материалов лазером имеет преимущества в сравнении с другими методами, так как позволяет прицельно модифицировать поверхности без разрушения материала и образования токсичных продуктов. Полагают, что в областях, обработанных лазером, увеличивается прочность адгезионного шва между фазами, возрастает гидрофильность и, следовательно, повышаются адгезионные свойства поверхности, к которой прикрепляется большее количество клеток. Для модификации поверхности гидрофобных пленок из полигидроксибутирата проведена лазерная обработка поверхности. В связи с тем, что пленки и мембраны, изготовленные из ПГА, как и из ряда других полимеров, прозрачны в видимой и ближней ИК спектральных областях, для их обработки пригодны лазеры, генерирующие излучение с длиной волны, лежащей в дальней ИК (например, CO₂-лазер) или ультрафиолетовых спектральных областях (например, лазер на самоограниченных переходах с рабочим элементом Au). Был использован CO₂-лазер, мощность которого варьировала в диапазоне от 3,0 до 30,0 Вт. Получена серия пленок с измененной поверхностью, от выраженных шероховатостей до сквозных перфораций (рис. 6.3). Выявлено, что оптимальными параметрами лазерного излучения являются следующие: $P_{\text{имп}} = 18,46$ Вт и $t = 3$ мс. Поверхность полимерных пленок, обработанная в таком режиме, максимально гидрофильна.

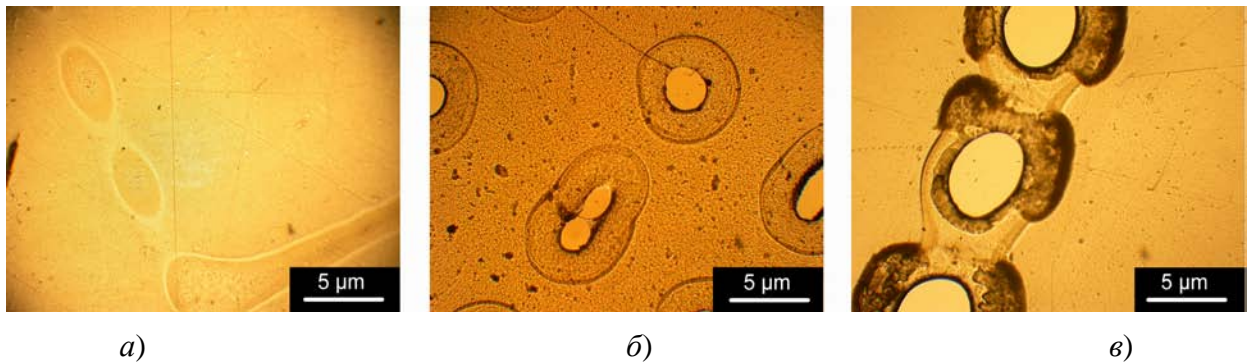


Рис. 6.3. Топография поверхности пленочных матриц из полигидроксибутирата, обработанных лазером с различной мощностью (P) излучения (оптическая микроскопия): $P = 6,15$ Вт (а); $P = 8$ Вт (б); $P = 9$ Вт (в) (материалы и фото Е. Шишацкой)

Получение пористых матриц возможно вспениванием раствора полимера. Этого можно добиться при помощи обдувающих реагентов, впрыска газа, суперкритического газирования жидкости или сушки замораживанием. Полимеры, которые можно газировать суперкритическими жидкостями, должны иметь высокую аморфную фракцию. Гранулы полимера переводят в пластическое состояние благодаря применению газа, в частности азота или двуокиси углерода, под высоким давлением; растворение газа в полимерной матрице приводит к уменьшению вязкости, что позволяет обработать аморфные биоразрушаемые полимеры в температурном диапазоне 30–40 °С; при этом, однако, в среднем между собой соединяется не более 10–30 % пор.

Следующий метод получения матрикса с развитой пористой структурой заключается в сушке замораживанием. Полимер растворяется в растворителе и замораживается в жидком азоте под контролем направления роста кристаллов льда. Замерзший раствор после этого высушивается лиофилизацией (то есть при пониженном давлении); происходит сублимация (возгонка) льда, создавая поры, ориентированные макроскопически в направлении замораживания. Сырые материалы после этого спекаются, что обеспечивает прочность каркаса. Метод обеспечивает образование в матриксе больших ориентированных пор при общей пористости матрикса свыше 90 % (табл. 6.2).

Нельзя не отметить, что полимерные матриксы, вполне эффективные для восстановления дефектов кожи и мягких тканей, оказываются мало пригодными для реконструкции медленно регенерирующей костной ткани.

Объемные матриксы (3D) представляют собой более сложные системы в виде губок, гелей, объемных конструкций.

При конструировании матриц в виде *гелей* необходимо контролировать ряд параметров с целью придания матриксу свойств, необходимых для успешного выращивания клеток. В ходе образования геля следует контролировать параметры процесса для обеспечения необходимой целостности и прочности геля, биосовместимости, требуемых адгезионных характеристик по отношению к клеткам, заданных скоростей биораспада, соответствующих диффузионных характеристик.

Таблица 6.2

Пористость и средний размер пор материалов, используемых для изготовления матриц для тканевой инженерии

Тип материала	Метод изготовления	Размер пор, нм	Пористость, %
Коллаген	"Freeze-drying"*	11–105 и 14–134	80–90
Шелк	"Salt-leaching"*	50 (–20 °C), 15 (–80 °C)	84–98
Полилактид	"Salt-leaching"	600	58–80
Полилактид/гликолактид/ПВА	"Salt-leaching"	200–300	90
Полимерные губки	Полимерная эмульсия*	40–100	80
ГАП/хитозан/желатин	"Freeze-drying"	300–500	87
Коллаген/ГАП	"Freeze-drying"	30–100	85
Полилактид/гликолид/коллаген/ГАП	"Salt-leaching"	355–425	47–87

Примечания: * – техника "Freeze-drying" подразумевает сушку при низких температурах (лиофильная сушка), "Salt-leaching" – для создания пористости используют кристаллы NaCl с последующим вымыванием в дистиллированной воде, "Полимерная эмульсия" – полимер в растворителе, с последующим формированием матрикса и испарением растворителя.

Материалы и процессы желатинизации гидрогелей рассмотрены ранее. Общей особенностью гидрогелей является способность к желатинизации; это позволяет клеткам, субстратам и метаболитам перемещаться в такой системе и формировать из нее заданную конфигурацию. Имеющаяся возможность смешивания в растворе компонентов для гелеобразования, клеток и необходимых факторов роста способна обеспечивать минимально инвазивную доставку клеток и образование геля в живом организме.

Особенностью применения гидрогелей в тканевой инженерии в качестве матрикса (каркаса клеток) является необходимость выполнения грузонесущей и/или объемно-сохраняющей функции. Помимо этого, может возникнуть необходимость, чтобы каркасы передавали механические стимулы клеткам по мере необходимости для их дифференцировки и последующего роста тканей. Для ряда случаев применения, предусматривающих грузонесущую функцию, например дефекты кости, относительно низкие механические свойства гидрогелей могут оказаться проблематичными.

Свойства гидрогелей, связанные с транспортировкой веществ и клеток, очень важны для тканевой инженерии, поскольку «строительные леса» для новообразующихся тканей должны обеспечивать соответствующую транспортировку питательных веществ, отвод метаболитов, газов по тканевым каркасам. Диффузия питательных веществ внутрь матрикса, а продуктов обмена – наружу, зависит как от свойств материала матрикса, так и от типа и свойств транспортируемых молекул. Пористость структуры геля зависит от свойств используемых материалов и от условий желатинизации. На процессе диффузии веществ и клеток может также сказываться заряд или другие взаимодействия между цепями полимера и диффундирующими молекулами. Диффузия белков, например, альбумина, может не происходить так же сво-

бодно в плотно сшитых гелях, как диффузия более мелких молекул, например глюкозы и кислорода. Гидрогели могут также содержать поры, достаточно большие для миграции клеток; могут служить основой для растворения и распада с течением времени и образования пор, в которые потом могут мигрировать клетки.

Гидрогели должны быть биосовместимыми по отношению к клеткам, а также тканям, куда впоследствии они будут имплантированы. Для того чтобы внутри гидрогелевых каркасов из пролиферирующих клеток формировались ткани, гидрогель должен способствовать миграции клеток в объем матрикса, их последующему прикреплению, делению и дифференцировке. Гидрогели, образованные из природных белков (например, коллагена), могут способствовать клеточному прикреплению и делению клеток. Гиалуроновая кислота также обеспечивает реализацию многих клеточных функций. Однако многие гидрогели не имеют клеточных рецепторов и по природе своей являются гидрофобными, и в результате этого прикрепление клеток к гидрогелю затруднено. Отсутствие узнавания и связывания с клеточными рецепторами было преодолено путем модификации полимеров, в частности таких, как альгинат и полиэтиленгликоль, прививанием различных приклеивающихся пептидов и белков. Распространенная пептидная последовательность, используемая для этого, – аргинил-глицил-аспарагиновая кислота, способная специфически связываться с клеточными рецепторами. Факторы роста, или пептиды, полученные из факторов роста, могут также взаимодействовать с матриксами или высвобождаться из клеток с последующим расщеплением, способствуя миграции, делению или дифференцировке клеток.

К настоящему моменту исследованы гидрогели в качестве матриксов функционирующих клеток и роста тканей в целях разработки широкого диапазона тканей, включая хрящи, кости, печень, нейроны, мышцы и жировую ткань. В целом гидрогели не обладают механическими свойствами тканей, например, костной, и, как правило, используются в инжиниринге мягких тканей, где не предусматривается нагрузка. Среди других направлений применения гидрогелей – использование коллагена для инжиниринга кровеносных сосудов, в качестве матрикса для шванновских клеток при пересадке нервов, фибробластов для формирования кожных лоскутов.

Губки представляют собой твердотельные высокопористые системы (80–95 % пор). В зависимости от способа изготовления и назначения размер пор в губке может варьировать. Например, для иммобилизации фибробластов и гепатоцитов поры должны быть порядка 20 мкм, для регенерации кожи – 20–150 мкм, для регенерации костной ткани – 100–150 мкм. Для изготовления губок используют как синтетические, так и природные биodeградируемые полимерные материалы. Среди биodeградируемых материалов широко используют полимеры и сополимеры молочной и гликолевой кислот, полилактон, полипропилен фумарат, моноангидриды, полиортоэфир. Материалы природного происхождения включают коллаген, желатин, хитозан, альгинат и его производные, а также ПГА. Среди методов изготовления следует выделить методы выщелачивания, вспенивания, разделения фаз. С помощью

данных методов можно получать высокопористые губки (до 95 % пор) с диаметром пор 50–200 мкм.

Трехмерные матрицы из композиции «коллаген/ПГА» были получены на базе гемостатической коллагеновой губки (ОАО «Лужский 3-д Белкозин») и сополимера гидроксибутирата с гидроксивалератом (ПГБ/ПГВ) (рис. 6.4). Содержание полимера и коллагена в полученном композитном матриксе составило 4:1 (по массе). Влагопоглощение матрикса (СФБ и среды RPMI-1640) составило соответственно 94 и 97 %. Композитная матрица имеет преимущество также перед исходной коллагеновой губкой в длительности эксплуатации. Несмотря на то, что коллаген плохо растворяется в воде, через сутки экспозиции в среде RPMI-1640 при 37 °С коллагеновая матрица теряла форму, но через неделю происходило частичное растворение 21–27 % исходной массы. Матрица из композита коллаген/ПГА сохраняла форму и массу изделия длительное (до 14 суток) время. При засеве клетками показаны высокие адгезионные свойства и способность поддержания пролиферации длительное время (несколько месяцев при имплантации матрицы животным).

Тканые и нетканые матрицы на основе волокон изготавливаются также из биodeградируемых синтетических полимеров, таких как полимолочная кислота, и природных полимеров – коллагена, альгината, и представляют собой своеобразную сеть с регулярной или беспорядочной ориентацией волокон. В отличие от губчатых матриксов, которые более устойчивы к компрессионным нагрузкам, матрицы на основе волокон устойчивы к растяжению. Открытые пористые матрицы используют в качестве тканьиндуцирующих имплантатов, матриксов для культивирования клеток *in vitro*, таких как хондроциты, гепатоциты, остеобласты, фибробласты, мышечные клетки, эпителиальные клетки, стволовые клетки.

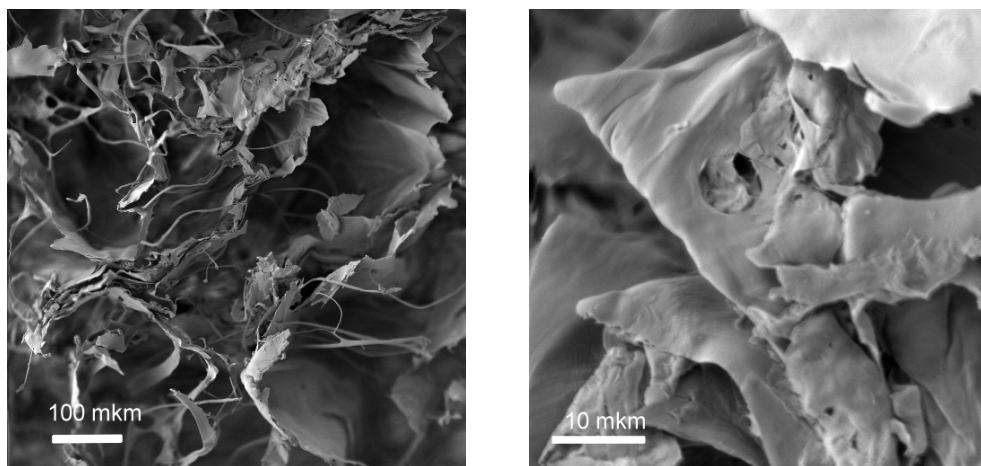


Рис. 6.4. Электронная микрофотография композитного трехмерного матрикса, полученного из коллагеновой губки, модифицированной полигидроксибутиратом (материалы и фото Е. Шишацкой)

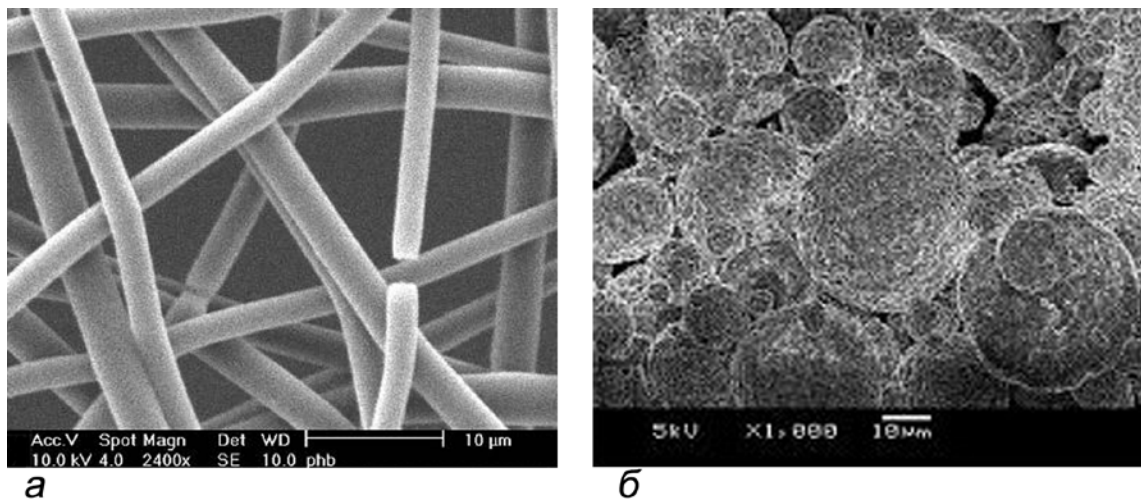


Рис. 6.5. Электронная микрофотография матриц, полученных из полигидроксibuтирата: ультратонкие волокна (а), маркер 10 мкм; микрочастиц (б), маркер 10 мкм (материалы и фото Е. Шишацкой)

К перспективным новым методам получения матриц (ультратонких волокон, мембран и микро- и наночастиц) относят методы нанотехнологии, включая технику микроинкапсулирования и электростатического формования (ЭСФ). В зависимости от типа и молекулярной массы полимеров, плотности используемого раствора и условий формования можно получать ультратонкие волокна различного диаметра и различной структуры. Примечательно, что метод ЭСФ позволяет получать ультратонкие волокна и пористые структуры на их основе из растворов и расплавов полимеров различного строения. Метод получил развитие в настоящее время в связи с потребностями новых биомедицинских технологий клеточной и тканевой инженерии. Первый пример использования метода ЭСФ для получения ультратонких волокон из ПГА реализован на примере сополимера ПГБ/ПГВ. Выявлены оптимальные условия, позволяющие получать волокна хорошего качества диаметром от 1 до 5 мкм ([рис 6.5, а](#)).

Активно разрабатываемые в последние годы методы микроинкапсулирования позволяют получать микро- и наноразмерные частицы, которые в силу высочайшей развитости поверхности и возможности имплантирования подкожно и внутримышечно имеют огромные перспективы не только для разработки систем контролируемой доставки лекарственных средств, но и в качестве матриц для выращивания клеток. Исследование применимости ПГА для этих целей показало возможность получения микрочастиц хорошего качества и различного диаметра. При этом выявлено влияние техники изготовления (типа эмульсии и способа диспергирования, температуры среды) на выход микросфер, их структуру и размер. С применением технологии испарения растворителя из двух- и трехкомпонентной эмульсий на основе ПГА отработана процедура стабильного получения микросфер ([рис. 6.6, б](#)). Показана высокая биосовместимость микрочастиц в культурах клеток, а также при инъекционном введении *in vivo*.

Керамические матрицы. Собственно кальций-фосфатные материалы

и композиты керамик с полимерами весьма широко применяют в качестве костнопластического материала в реконструктивной хирургии. Объемные композитные матрицы, полученные на основе керамик и высокомолекулярных соединений, перспективны также для технологий клеточной и тканевой инженерии.

Известный метод получения высокопористых керамических материалов заключается в производстве шаблона, например, из полиуретанового пеноматериала, который погружают в керамические взвеси под вакуумом. Последнее обеспечивает возможность проникновения взвеси в поры пеноматериала. Далее в ходе температурной обработки (1350 °С) органические компоненты выжигаются, а керамические пеноматериалы спекаются, в результате формируются матрицы с соединенными друг с другом порами диаметром до 300 мкм. Применяется также способ получения пористых каркасов из гидроксипатита спеканием частиц равного размера. Образованные конгломераты можно прессовать с помощью холодного прессования. По мере увеличения температуры спекания диаметр пор уменьшается, а механические свойства композита усиливаются. Пористость керамических матриц можно увеличить путем добавления наполнителей, например, парафина, сахарозы, желатина, полиметилметакрилата в порошки керамики. При спекании порошковой смесовой взвеси наполнитель выгорает, оставляя поры. Однако этот метод, как правило, уменьшает прочность на сжатие ниже прочности на сжатие губчатой кости.

Вполне успешен механо-физический метод получения композитов керамик с полимерами для последующего формования из них объемных матриц. Из гомогенной смеси биоразрушаемого полигидроксипропаната и биологического гидроксипатита методом прямого холодного прессования под давлением порядка 120 кгс/см² можно формовать объемные матрицы различной конфигурации с различным содержанием компонентов. Для взаимодействия компонентов сформованные образцы обрабатывают нагреванием при 100–130 °С в течение 25 минут. Метод позволяет также получать пористые матрицы. Для этого к порошкообразной смеси полимера и керамического материала перед формованием необходимо добавить кристаллический наполнитель, который из сформованного матрикса далее вымывают кипячением последних в воде (рис. 6.6).

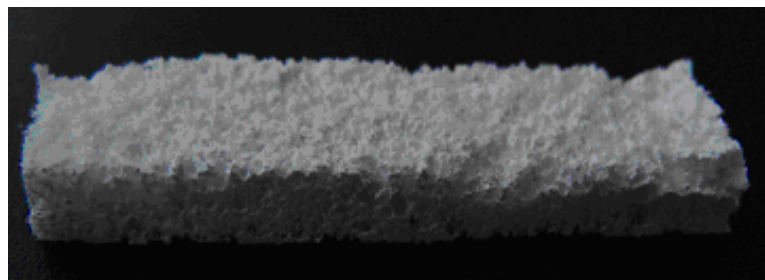


Рис. 6.6. Пористый объемный матрикс, полученный из композита ПГБ/ГАП (матрикс и фото Е. И. Шишацкой)

Матрицы, получаемые из гидроксиапатита, не удовлетворяют всем критериям идеальных каркасов, потому что ГАП и продукты его разрушения не индуцируют активность остеогенных клеток (принято считать, что ГАП обладает только остеокондуктивными свойствами и не обладает остеоиндукцией). Модифицировать гидроксиапатит можно посредством введения в его состав малых концентраций (менее 20 частей на миллион) гидратированного кремния ($\text{Si}(\text{OH})_4$), продукты которого (SiO_2) способны замещаться в синтетическом ГАП на окись кальция (CaO). Эксперименты *in vivo* показали, что процесс костеобразования на гранулах гидроксиапатита с замещенным кремнием протекает значительно активнее по сравнению с чистым гидроксиапатитом. Такие матрицы более приемлемы для инжиниринга тканей. Новым направлением создания биоактивных матриц является введение в их состав биологически активных соединений, стимуляторов тканеобразования. Для реконструктивного остеогенеза таковыми рассматриваются морфогенетические белки костной ткани.

Матрицы из биоактивного стекла. Для создания матриц из биоактивного стекла, получаемых плавкой (типа препарата «Bioglass®»), также можно использовать вещества, формирующие при испарении или сушке поры и пенообразующие реагенты. Метод формования матрикса окунанием в гель можно применять для биоактивных стеклянных порошков, полученных плавкой. Наиболее успешным методом производства матриц из биоактивного стекла по структуре, аналогичной губчатой кости, является метод пенообразования в процессе золь-гель. В процессе золь-гель происходят реакции полимеризации исходных веществ стекла в растворе (золь). Золь – это раствор оксидов кремния, формирующий гель путем образования межмолекулярных связей и сетчатой структуры. Во время процесса пенообразования в золь (раствор) захватывается воздух под действием смешивания при увеличении вязкости; это сопровождается образованием сетки окиси кремния ($-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$). Для стабилизации пузырей в матриксе добавляются поверхностно-активные вещества. Когда пористая пена становится гелем, пузыри стабилизируются окончательно. После этого гель подвергается контролируемому процессу старения термической обработкой ($60\text{ }^\circ\text{C}$), а для укрепления гель сушат при $130\text{ }^\circ\text{C}$, и далее для удаления органических примесей с поверхности изделие подвергают стабилизации-спеканию при $500\text{--}800\text{ }^\circ\text{C}$. Матрицы из биоактивного стеклянного пеноматериала могут содержать макропоры диаметром до $600\text{ }\mu\text{m}$, соединенные окнами пор со средним диаметром более $100\text{ }\mu\text{m}$ и прочностью на сжатие до $2,5\text{ МПа}$. В культуре остеобластов *in vitro* показано, что пеноматериалы стимулируют формирование и минерализацию костных узелков в течение двух недель культивирования. К недостаткам матриц из биоактивного стекла следует отнести жесткость при натяжении.

Таким образом, конструирование матриц для культивирования клеток и тканевой инженерии активно развивается в настоящее время, поэтому можно ожидать, что эра идеальных матриц наступит в обозримом будущем.

ГЛАВА 7. СПЕЦИФИКА ТЕХНОЛОГИИ ВЕДЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

Использование клеточных культур тканей и органов относится к одному из наиболее актуальных направлений современной биотехнологии. Культуры клеток используют для производства биологических материалов, предназначенных для получения целевых макромолекул и технологий тканевой инженерии. В культурах клеток можно варьировать условия среды, обеспечивая получение необходимых количеств клеточной массы требуемой дифференцировки.

Клеточные культуры активно используют для тестирования биологической безопасности новых материалов, биологически активных и лекарственных веществ. Особое направление применения клеточных культур – тканевая инженерия. Следует подчеркнуть, что наиболее важным элементом успеха тканевой инженерии является наличие необходимого количества функционально активных клеток, способных дифференцироваться, поддерживать соответствующий фенотип и выполнять конкретные биологические функции. Клетки в ходе дифференцировки должны продуцировать внеклеточный матрикс (в его основе белки, в частности коллаген) соответствующей организации и структуры, выделять цитокины и другие сигнальные молекулы, а также взаимодействовать с соседними клетками или тканями. В связи с этим возникает необходимость создания адекватных условий для роста и дифференцировки клеток *in vitro*.

7.1. Принципы работы в клеточной лаборатории и основные асептические лабораторные методы

В лаборатории, предназначенной для культивирования клеток, должны постоянно поддерживаться условия высокой асептики. В странах ЕС практика регламентируется директивами GLP. Директивы GLP касаются общих процедур, позволяющих успешно выполнить эксперимент и обеспечивают повторяемость эксперимента; они включают правильное планирование экспериментов, письменную регистрацию всех выполненных экспериментальных процедур (в лабораторной книге), обучение, по крайней мере, двух ученых, способных самостоятельно выполнить эксперимент и соответствующую маркировку этикетками всех веществ, сред и культур (наименование, дата, описание, номер пассажа и тип клеток). Следует обязательно письменно регистрировать методики или стандартные операционные процедуры, а также содержать лабораторное оборудование в чистоте. Протоколы GLP сводят до

минимума потенциальные риски биологической опасности для исследователя.

Важнейшее условие для работы с клеточными культурами – соблюдение правил стерильности. Микробная инфекция приводит к гибели клеток, снижается их рост и нарушается экспрессия клеточных белков, что ведет к искажению результатов эксперимента.

При культивировании клеток следует обязательно выполнять приведенные ниже общие асептические приемы:

- обязательно надевать одноразовые перчатки (например, из нитрила) при работе в лаборатории с культурами клеток;
- надевать чистые лабораторные халаты, которые ни в коем случае не выносить из лаборатории;
- перед началом работы рабочие участки и руки в перчатках нужно протирать 70 %-ным спиртом;
- работать только в специально обозначенных «чистых зонах», в частности в ламинарном шкафу для культур тканей;
- все предметы и руки в перчатках нужно протирать 70 %-ным спиртом при каждом входе в стерильную зону, например бокс, ламинарный шкаф или термостат;
- стерильные флаконы или колбы следует открывать только в ламинарном шкафу непосредственно перед использованием и ни в коем случае не оставлять открытыми;
- стерильные одноразовые пипетки нужно доставать из упаковок внутри ламинарного шкафа и только непосредственно перед использованием;
- когда со стерильных флаконов или колб снимают крышки, по возможности крышку не класть на рабочий стол, открытый флакон нужно наклонить, чтобы микроорганизмы из среды попадали только на край флакона;
- жидкости нельзя брать из разных флаконов одной и той же пипеткой; для каждого флакона должна использоваться новая стерильная пипетка;
- при выполнении процедур с культурой клеток нельзя разговаривать, кашлять или чихать;
- работа должна выполняться как можно быстрее, чтобы избежать инфекции клеток.

7.1.1. Методы стерилизации

Существует несколько методов стерилизации лабораторного оборудования и/или образцов: термическая обработка, фильтрация через поры диаметром 0,2 мкм, химическая очистка (моющее вещество или спирт) и ультрафиолетовое облучение. Большинство микроорганизмов нейтрализуется (уничтожается) при температуре 55–80 °С, поэтому широко используются методы стерилизации более высокой температурой, а именно кипячением. Однако эндоспоры и прионы могут сохраниться и при кипячении, поэтому в большинстве лабораторий, культивирующих клетки, наиболее распро-

страненным и эффективным методом является обработка в автоклаве. В автоклавах пар образуется при температуре около 134 °С под давлением. Большинство современных автоклавов также включают функцию сушки в конце цикла.

Клеточные технологии ориентированы на культивирование клеток на разнообразных средах и материалах, которые должны быть стерильными. Кроме нейтрализации микроорганизмов, также крайне важно, чтобы метод стерилизации не изменял свойства материала. Многие используемые на практике матрицы для клеток изготовлены из резорбируемых материалов, поэтому в них не применимы методы мокрой стерилизации, а должны применяться УФ-облучение, которое, однако, стерилизует только поверхность, не проникая внутрь материала или матрикса. Нагревание или химическая стерилизация может изменить химический состав и/или механические свойства материала. Кроме удаления живых микроорганизмов, при исследовании материалов большое значение имеет удаление фрагментов мертвых микроорганизмов (в частности, бактерий) и продукты их обмена (эндотоксины). Поэтому в исследованиях биоматериалов необходимо тщательно мыть материалы и матрицы как дополнение к стерилизации.

7.1.2. Оборудование лаборатории для работы с клеточными культурами

Как правило, в связи с необходимостью поддержания условий высокой стерильности работы с клеточными культурами проводят в специализированных помещениях – боксах. В комплект необходимого оборудования бокса для работы с клеточными культурами должны входить: бокс-ламинар 2-го класса защиты, CO₂-инкубатор, инвертированный микроскоп, холодильник для хранения сред, шкаф для посуды.

CO₂-инкубатор предназначен для культивирования клеток, выращиваемых в чашках Петри или пластиковых планшетах. В инкубаторе поддерживается необходимая температура (порядка 37 °С), влажность и гумидная среда (5 % об. CO₂). Работу с клетками проводят в боксе-ламинаре. Бокс-ламинар – это место, где производятся все манипуляции с клетками, – это и есть собственно рабочее место. Ламинар оборудован УФ-облучателем, системой фильтров грубой и тонкой очистки воздуха, подсветкой. Поверхности изготовлены из нержавеющей стали, что позволяет обрабатывать ее с применением стерилизующих жидкостей и обжига. На столешнице бокса размещаются: стакан с пинцетами, автоматическими пипетками, скальпелями; пенал с автоматическими и стеклянными пипетками, флакон со спиртом; упаковки стерильной посуды, приспособления для работы с клетками (наконечники, пробки, фильтры), а также горелка со спиртом, закрытая керамическим колпачком. Перед работой поверхность стола тщательно промывают водой с моющим раствором и обрабатывают кусочком ваты, смоченной в спирте. Это необходимо, потому что осевшая на поверхности стола пыль

является потенциальным источником заражения клеточной культуры. При работе в боксе все операции следует проводить в непосредственной близости от зажженной горелки, чтобы обеспечить максимальную защиту посуды, растворов, сред и культур от заражения.

Инвертированный микроскоп позволяет анализировать посе́вы клеток на поверхности сред в чашках Петри или планшете снизу, что очень удобно, так как клетки прикрепляются ко дну культуральной посуды.

При работе в боксе-ламинаре с клетками необходимо соблюдать правила личной гигиены. Студент, приступающий к работе, должен быть в чистом халате, шапочке, иметь ватно-марлевую повязку. Перед работой в ламинаре необходимо обработать руки ватным диском, смоченным в дезрастворе или спирте. После этой обработки уже не следует выносить руки за пределы ламинара. Если же это произошло, необходима повторная обработка рук для исключения попадания микроорганизмов в стерильную зону.

Для выращивания клеток необходимы специальная лабораторная посуда и мелкий инструментарий: пластиковые планшеты, чашки Петри, стеклянные и пластиковые флаконы, плоскодонные бутылки, сосуды Карреля, флаконы для питательных сред различного объема, пипетки автоматические с пластиковыми одноразовыми наконечниками, стеклянные мерные пипетки, пеналы для стерилизации и хранения пипеток, фильтры, пробки резиновые и ватно-марлевые, насосы-дозаторы, шейкеры-инкубаторы, шпатели и др.

В случае использования стеклянной посуды перед процедурой стерилизации ее тщательно моют поверхностно-активными веществами. После высушивания посуды все отверстия в стеклянной посуде (горлышки бутылей, флаконов, сосудов Карреля) заворачивают в двойной слой фольги таким образом, чтобы внешний слой фольги был длиннее внутреннего. Это обеспечивает дополнительную защиту внутренней среды сосуда или флакона. Резиновые пробки, наконечники для автоматических пипеток, фильтродержатели с фильтрами помещают в стеклянные стаканы, которые также закрывают перед стерилизацией двойным слоем фольги. Все процедуры – манипулирование с посудой, переливание растворов в ходе приготовления сред, пересевы клеток и пр. – выполняются в работающем боксе-ламинаре таким образом, что горящая спиртовка отделяет рабочую зону от работающего.

7.1.3. Системы для культивирования клеток

Технологии ведения клеточных культур требуют специализированного оборудования, набора дорогостоящих сред, культуральной посуды и устройств. Это безусловный пример так называемых «высоких технологий», которые определяют прогресс в области повышения качества лечения и жизни человека. В связи с этим возникает необходимость обеспечения стандартизованных и единых требований к регламентации способов и приемов клеточных технологий.

Приняты две основные системы культивирования клеток: непроточные (периодические) и проточные. *Непроточные культуры* – тип культур, в кото-

ром клетки вводят в фиксированный объем среды. По мере роста клеток происходит использование питательных веществ и накопление продуктов обмена клеток. Со временем в результате истощения среды происходит прекращение пролиферации клеток. Поэтому среда должна периодически меняться, что приводит к изменению клеточного метаболизма, называемого еще и физиологической дифференцировкой. Увеличить время функционирования периодической культуры клеток можно дробной заменой части среды аликвотным (то есть равным замещаемому) объемом свежей среды или делать это постоянно с низкой скоростью при периодическом удалении части клеток. Перфузионный способ заключается в постоянном поступлении свежей среды в культуру и одновременном удалении равного объема использованной (бесклеточной) среды. Все системы непроточных культур характеризуются накоплением отходов в той или иной форме и непостоянством внешних условий.

Проточные культуры обеспечивают гомеостатические условия без изменения концентрации питательных веществ и метаболитов, а также числа клеток. Такие системы пригодны для суспензионных культур и монослойных культур на микроносителях. Приняты два крупных направления в культивировании животных клеток: *монослойные культуры* и *суспензионные культуры*.

Суспензионные культуры предпочтительнее с точки зрения увеличения выхода клеток. Монослойные культуры также обладают рядом преимуществ: в них относительно легко производить полную замену среды; они обеспечивают высокую плотность клеток; могут быть использованы для любого типа клеток, что обеспечивает наибольшую гибкость исследований. К недостаткам монослойных культур можно отнести требования большого пространства; возрастание стоимости и трудоемкости при увеличении масштаба; недостаточно эффективный контроль, обусловленный трудностями отбора пробы; сложности в определении и контроле рН, концентрации кислорода. Следует подчеркнуть, что применение микроносителей устраняет эти недостатки.

Для культивирования клеток применяют различные системы и культуральную посуду: культивирование проводят в плоских флаконах (матрацах); во вращающихся бутылках; в колонках на микроносителях, в качестве которых выступают плотно упакованные, не смещающиеся стеклянные бусы диаметром 35 мм, стопка пластин и др., а питательная среда омывает их, протекая сверху вниз.

7.1.4. Культивирование клеток человека

Практически все типы клеток человека могут быть введены в культуру и служить средством и объектом во многих медико-биологических исследованиях. Наибольшее распространение получили культуры фибробластов. Широкое использование фибробластов для изучения патогенеза и диагностики наследственных болезней обусловлено легкостью их культивирования, а также тем, что соединительная ткань, главным клеточным элементом кото-

рой являются фибробласты, составляет значительную часть массы тела. Фибробласты составляют строму (каркас) многих органов, являются важными участниками их морфогенеза и создают условия микроокружения, необходимого для дифференцировки и функционирования специализированных клеток. В фибробластах имеется фермент моноаминоксидаза, изменения активности которого характерны для некоторых нервных и психических заболеваний. Фибробласты содержат рецепторы к глюкокортикоидным гормонам, инсулину, некоторым нейромедиаторам.

В 1978 г. Гринберг доказал возможность экстраполяции данных, полученных на культивируемых фибробластах, на условия *in vivo*. Это обусловлено следующими обстоятельствами:

- фибробласты *in vitro* сохраняют важнейшие черты, свойственные клеткам в организме, а также онтогенетические и индивидуально-генотипические свойства организма-донора;
- не существует другого такого типа клеток, который в полной мере мог бы представлять свойства клеток организма;
- изменения, которые возникают при введении фибробластов в культуру, можно легко контролировать и свести к минимуму при создании соответствующих условий.

Поэтому фибробласты используют для изучения клеточных, биохимических, молекулярных аспектов патогенеза ряда болезней, в том числе и связанных с наследственными дефектами нервной системы.

7.1.5. Культивирование клеток и тканей беспозвоночных

Интерес к клеточным культурам беспозвоночных связан с разнообразием и оригинальностью роста и метаморфоза, которые могут быть объектом для изучения основных процессов клеточной дифференцировки и регуляции активности генов. При рассмотрении способов получения энтомопатогенных препаратов показано, что вирусы могут размножаться только при использовании живых клеток насекомых, в связи с чем для получения вирусных препаратов необходимым условием являлось предварительное разведение насекомых-хозяев. Использование клеточных культур беспозвоночных позволяет решить эту проблему.

Среды для культивирования клеток и тканей насекомых сильно варьируют по составу. При составлении сред используются данные по составу гемолимфы. Среды отличаются от сред для клеток и тканей млекопитающих наличием органических кислот, повышенным содержанием аминокислот и более высоким осмотическим давлением.

Для получения культуры клеток и тканей беспозвоночных используют эмбрионы, имагинальные диски и органы насекомых: имагинальные диски (зачатки взрослых органов насекомых) используют для изучения процессов дифференцировки *in vitro*; эмбрионы с удаленной оболочкой используют для

изучения начальных стадий развития насекомых; отдельные органы – для различных целей. Например, слюнные железы двукрылых (Diptera) используются для изучения процессов пуффирования в политенных хромосомах (пуф – вздутие хромосом при «включении» ДНК на транскрипцию, когда определенные участки ее раскручиваются и РНК-синтезирующие ферменты начинают синтез РНК; при линьке насекомых пуфы появляются в определенной последовательности).

7.1.6. Культивирование клеток и тканей органов

Органная культура – культивирование *in vitro* органа или части органа, в которых сохраняются анатомическая связь и функционирование тканей, максимально приближенные к таковым в условиях *in vivo*, то есть в организме. Миграция изолированных клеток на периферии экспланта подавляется специальными условиями культивирования, в результате чего могут даже образовываться дифференцированные структуры. Органная культура сохраняет межклеточные взаимодействия, в течение долгого периода поддерживает гистологическую и гистохимическую дифференцировку, как правило, остается в не растущем состоянии в течение нескольких дней и даже недель. Эти культуры не способны к размножению.

Ткани, зависимые от гормонов, сохраняют чувствительность к ним и характерные ответы, эндокринные органы продолжают секрецию специфических гормонов и т. д. Наибольшее сходство процессов морфогенеза *in vivo* и *in vitro* характерно для эмбриональных тканей.

Первые исследования в области культивирования органов и тканей относятся к концу XIX в. В 1897 г. немецкий ученый Лёб (W.Loeb) опубликовал данные о культивировании фрагментов печени, почек, щитовидной железы и яичников кролика на небольших кровяных сгустках в культуральных пробирках. Далее было показано, что для предотвращения центральных некрозов в эксплантах пробирки должны быть заполнены кислородом. В результате многочисленных экспериментов было также установлено, что большинство органов или их фрагментов, за исключением кожи, растут на твердом субстрате лучше, чем в жидкой среде.

Описано несколько видов техники культивирования органов. В качестве субстрата можно использовать сгусток плазмы; способ был предложен Феллом и Робинсоном и получил название «техника часового стекла», став классической техникой морфогенетического анализа эмбриональных органов.

Культивирование проводят во впадине часового стекла на поверхности сгустка, состоящего из плазмы цыпленка и эмбрионального экстракта кур. Часовое стекло помещают в чашку Петри и закрывают сверху влажной ватой или фильтровальной бумагой для предотвращения высыхания. Культивируют в термостате при 37,5 °С. Существуют модификации этого метода, при которых часовое стекло покрывается крышкой, приклеенной воском, и др. Недостатком метода, ограничивающим применение его в биологических ис-

следованиях, является разжижение сгустка в окрестностях экспланта, который в результате оказывается в жидкости. Кроме того, сложный состав среды затрудняет проведение биохимических исследований. Эти недостатки устраняются при использовании сгустка агара. Такая техника была предложена Спраттом. Метод основан на получении агарового геля 1–4 % концентрации, основу которого составляют забуференные солевые растворы или питательные среды типа 199 с добавлением эмбриональной сыворотки.

В середине XX в. было обнаружено, что культуры можно выращивать на бумажных плотиках, плавающих на поверхности жидкости в часовом стекле. Далее бумагу стали обрабатывать силиконом, комбинировали с миллиметровыми фильтрами, а затем перешли на плотки из ацетата вискозы. Метод культивирования на плотиках имеет ряд недостатков, основной из них – погружение ткани в среду при затоплении плотика. Решение этой проблемы было осуществлено Троувеллом, который предложил культивировать органы на поверхности металлической сетки. Сетка представляет собой квадрат размерами 25×25 мм с отогнутыми краями, образующими четыре ножки высотой около 4 мм. Скелетные ткани культивируют непосредственно на сетке, тогда как мягкие вначале эксплантируют на бумагу, а затем помещают на сетку. В 1976 г. для длительного культивирования взрослых тканей человека (эпителия бронхов и молочной железы, пищевода и др.) был предложен метод поочередного культивирования в жидкой среде и газовой фазе. Для этого экспланты прикрепляются ко дну пластикового сосуда и покрываются средой. Сосуды помещают в камеру с определенным газовым составом, а камеру помещают на качающуюся платформу.

Методы культивирования клеток, тканей и органов непрерывно совершенствуется, однако следует отметить, что в мире еще не разработана единая нормативная база применительно к ведению клеточных культур. Такие требования разработаны к производству фармацевтической продукции и биологически активных добавок (БАД), которое ориентируется на самые жесткие требования, так как считается, что производство этих продуктов – ответственное дело, требующее применения новейших технологий и строжайшего контроля качества. Эти требования регламентированы в Международных правилах GMP. GMP («Good Manufacturing Practice»), или «Надлежащая производственная практика» – это нормативный документ, свод правил, регламентирующих организацию производства и контроль качества фармацевтической продукции с момента приобретения сырья и материалов до выпуска готовой продукции, включая хранение и транспортировку. При несоблюдении какого-либо из правил GMP в процессе производства, обработки, упаковки или хранения продукта он признается некачественным. GMP стало условием допуска фармацевтических фирм на рынки развитых стран мира. Главная цель GMP – гарантия высокого качества производимой продукции. В России внедрение правил GMP (ГОСТ Р 52249-2004) осуществляется в соответствии с постановлением Госстандарта РФ от 10.03.2004 № 160-ст.

Разработан протокол GMP, регламентирующий процедуру выделения и ведения эмбриональных стволовых клеток. GMP-протокол выделения ЭСК

и их дериватов требует стандартизации на уровне верхних критериев качества следующих этапов лабораторной работы: а) качество помещений и оборудования для проведения стерильного выращивания клеток; б) качество посуды разового пользования и реагентов; в) квалификация и экспертиза специалистов; г) характеристика исходного материала для выделения ЭСК; д) выделение клеток из тканей по системе общепринятых критериев жизнеспособности клеток, очистки, морфологической целостности, функциональной активности. GMP-протокол выделения ЭСК должен верифицировать выделение малой популяции клеток из первичного источника, избирательную пролиферацию и накопление доли интересующих жизнеспособных, функционально активных прогениторных клеток.

Первый этап GMP-протокола связан с прописью (методикой) получения желаемого количества незрелых прогениторных клеток в виде биосырья для второго биотехнологического этапа.

Второй этап GMP-протокола содержит информацию о путях лабораторного (*in vitro*) получения макроколичеств (10^7 – 10^9) монодифференцированных клеток в условиях культуры.

На третьем этапе в опыте на животных демонстрируется безопасность (biosafety) пересаживаемых клеток, их терапевтическая эффективность, а также отсутствие иммунологических вторичных реакций на трансплантат. GMP-технологии стандартного единообразного повторяемого выращивания стволовых клеток являются мостом, соединяющим работу специалиста биолога в лаборатории с технологией good clinical practice (GCP), которая обязательно воспроизводится при первом, втором и третьем клинических испытаниях новых биоактивных препаратов (особенно живых клеток).

7.2. Потенциал клеточных технологий

Жизненно важные органы весьма сложны по структуре и выполняемым функциям, чтобы быть воспроизведенными полностью посредством традиционных медицинских и биоинженерных технологий. Поэтому весьма привлекательной является идея трансплантации в поврежденные органы стволовых клеток с целью стимулирования к регенерации и восстановлению их естественного состояния и функций. Для этого в поврежденный орган необходимо введение жизнеспособных клеток, способных к пролиферации и дифференцировке. Тканевая инженерия является сегодня активно развиваемой инновационной областью реконструктивной медицины. Основная методология тканевой инженерии реализуется на заборе (выделении) стволовых клеток, культивированию их на матриксе (шаблоне) из биосовместимого материала. При этом матриксы должны обеспечивать необходимую трехмерную форму для роста клеток, а материал, из которого они изготовлены, с течением времени разрушаться и замещаться новообразованной тканью. Ткань, выращенная вне организма, или матрикс с функционирующими клет-

ками затем имплантируется пациенту для восстановления пораженных болезнью или поврежденных тканей.

Достижения клеточной биологии в конце XX в. стали основой для разработки биомедицинских технологий, сформировавшихся на стыке биологии и медицины. Они позволили использовать культивируемые клетки человека в медицине для заживления различных ран, то есть для восстановления структурной и функциональной активности поврежденных тканей в ситуациях, где традиционные методы лечения малоэффективны или бессильны. Развитие этих технологий невозможно без участия знаний из других областей – клеточной и молекулярной биологии, материаловедения, химии природных полимеров и др. Перечень болезней, лечение которых становится возможным благодаря использованию клеточной терапии и трансплантологии, быстро пополняется. Наиболее продвинутым в настоящее время является применение клеточных технологий в кардиологии для лечения инфаркта миокарда, восстановления кровотока в ишемизированных органах и тканях, повышения насосной функции сердца, а также лечения дислипидемий и атеросклероза. В неврологии трансплантационные клеточные технологии начали применять для лечения болезни Паркинсона и болезни Хантингтона. Имеются примеры положительного применения стволовых клеток костного мозга для заживления ожоговых и глубоких кожных ран, лечения системных и местных костных дефектов. В связи с выявленной противоопухолевой активностью низкодифференцированных кроветворных клеток и их способностью прямо супрессировать опухолевый рост проводятся исследования, направленные на клиническое применение стволовых клеток в онкологии.

Однако между важными фундаментальными находками в экспериментах на животных и их клинической апробацией сохраняется длинная дистанция. Сегодня менее 1 % всех важнейших находок вокруг ЭСК находят применение у постели больного. Не вызывает сомнений, что в ближайшее время огромные финансы вместе с научными ресурсами будут затрачены на решительное сокращение расстояния между научными данными и той формой знаний и умений, которые получают «зеленый свет» в клинику. Крупнейшие биотехнологические компании уже «затоварены» патентами, поскольку за год удастся освоить 1–2 новых открытия. Глобальная сетевая компьютеризация биомедицинских исследований позволит упростить и стандартизировать схемы предклинических испытаний и систему критериев для переноса работы в клинику. Превращение стандартно выделенных ЭСК в биотрансплантат требует стандартизации всей технологической цепочки: выделения, наращивания, дифференцировки получаемых клеток по системе международных общепринятых критериев.

Новейшие реконструктивные медицинские технологии, базирующиеся на использовании потенциала стволовых клеток, реализуются с использованием двух подходов. В первом варианте суспензию клеток необходимого фенотипа, выросших *in vitro*, в определенной концентрации вводят в поврежденные ткани органов или в кровоток. Во-втором, технологически более сложном, клетки выращивают вне организма на матриксе (scaffold); далее

всю биоинженерную конструкцию (матрикс + клетки / ткань) или сформированную ткань имплантируют реципиентному организму.

В качестве имплантируемого клеточного материала используются различные источники: взрослые стволовые клетки, выделенные из жировой ткани, обонятельного эпителия, стромальные и гемопоэтические клетки костного мозга, эмбриональные стволовые клетки, выделенные из фетальных тканей, а также клетки, выделенные из амниотической жидкости и пуповинной крови. Вопрос о том, какой источник клеток предпочтительнее по биологическим, медицинским, а также этическим соображениям, дискутируется весьма активно в научной литературе, и на этот счет пока нет единого мнения.

Весьма продвинутыми являются технологии применения клеточных технологий для лечения патологий сердечно-сосудистой системы. Вопрос об идеальном клеточном материале для регенерации ткани миокарда встает чрезвычайно остро на настоящий момент. В частности, применение аллогенных фетальных и эмбриональных клеток служит предметом научных, этических и политических дебатов. Это связано как с проблемами получения материала, так и с вопросом о безопасности его применения (возможность заражения, стимуляции образования злокачественных новообразований, отторжение чужеродного материала). Весьма активно исследуется потенциал клеток пуповинной крови (ПК), первая трансплантация которых была проведена в 1988 г.; в период с 1993 по 2007 г. ориентировочно было выполнено 8000–9000 трансплантаций ПК. Активные исследования и применения стволовых клеток, получаемых из пуповинной крови, связано с рядом обстоятельств: накапливаются сведения, свидетельствующие о преимуществах неродственной трансплантации клеток ПК по сравнению с клетками костного мозга; улучшается долгосрочный прогноз после использования клеток ПК; увеличивается общее количество образцов ПК, размещаемых в банках; совершенствуются технологии выделения и хранения ПК. В отличие от ряда других источников стволовых клеток, технологии с применением клеток ПК из лабораторий все более активно переносят в клинику. Идея такого применения клеток появилась после сообщений о мультипотентности некоторых клеток ПК. Было показано, что мезенхимальные стволовые клетки и гемопоэтические стволовые клетки пуповинной крови способны индуцированно дифференцироваться в нервные клетки, хондроциты, остеобласты, гепатоциты. Различные группы клеток, выделяемых из ПК, проходят в настоящее время в основном доклинические испытания в кардиологии. Имеется множество публикаций положительных примеров применения ПК для лечения гематологических заболеваний: в педиатрической практике, при лечении ряда онкологических заболеваний крови (при острых лейкозах, лимфомах, миелолейкозах и др.). Наиболее широкая область применения ПК – это гематология. Клетки ПК служат источником гемопоэтических клеток. Пересадка двух частично-родственных образцов ПК – одна из наиболее многообещающих клеточных технологий, проходящая завершающую стадию клинических испытаний. Технология обеспечивает ускоренное восстановление количества нейтрофилов, она особенно эффективна для лечения детей. Трансфузия кле-

ток ПК непосредственно в костный мозг проходит испытания в условиях клиники. Это позволит сократить потери клеток, имеющие место при внутривенной трансплантации, при которой значительное количество клеток локализуется в паренхиматозных органах. Использование ПК позволяет применять неродственную трансплантацию клеток. Положительные примеры неродственной трансплантации ПК вылились в США в национальную программу «Изобретения в области пуповинной крови» (National Cord Blood Inventory) с бюджетом 80 млн дол. на период 2005–2010 гг. Известны также положительные результаты коррекции врожденных иммунодефицитных состояний с помощью клеток ПК. Например, пересадка ПК у больных с синдромом Вискотта – Олдрича приводит к высокой степени приживления трансплантата и общему уровню выживаемости пациентов. Трансплантация клеток ПК является безопасным, технически возможным и надежным способом коррекции иммунодефицитных состояний у детей, когда нет возможности провести родственную или неродственную пересадку клеток костного мозга.

Использование костномозговых стволовых клеток на данный момент в клинической практике является одним из наиболее перспективных направлений клеточной терапии. Трансплантация аутологичных стволовых клеток костного мозга не вызывает этических проблем, иммунологического конфликта в связи с пересадкой пациенту его собственных клеток. Однако имеющиеся немногочисленные клинические результаты по применению стволовых клеток у пациентов с ишемической болезнью сердца противоречивы. На данный момент до конца не определены механизм действия стволовых клеток, методы диагностики клинической эффективности клеточной терапии, необходимое количество вводимого клеточного материала, наиболее адекватный способ введения стволовых клеток (инфузия или введение клеток в ткани миокарда). Результаты трансплантации клеток ПК при инфаркте миокарда в ряде публикаций показали позитивные результаты в экспериментах на животных; отмечены случаи увеличения плотности сосудистой сети в постинфарктном сердце; утолщения сердечной мышцы. МСК ПК в процессе со-культивирования с кардиомиоцитами грызунов оказались способными экспрессировать кардиомиогенные сократительные белки и синхронно сокращаться. Есть данные о спонтанной дифференцировке МСК ПК в кардиомиоциты *in vitro*. Исследования на людях пока немногочисленны, имеющие результаты лишь косвенно затрагивают деятельность сердечно-сосудистой системы. Имеются отдельные публикации, свидетельствующие о том, что процедура как интрамиокардиального, так и внутривенного введения кардиомиобластов может быть безопасной и оказывать благоприятное воздействие на процесс ремоделирования левого желудочка сердца, увеличивая сократительную функцию миокарда. При системном введении кардиомиобластов положительный эффект наблюдается как в отношении левых, так и правых отделов сердца. Подобные эффекты улучшения функций сердечной мышцы при системном введении аутологичных кардиомиобластов наблюдали в отдельных клинических испытаниях, включая больных с тяжелыми

формами кардиомиопатии.

Клеточные технологии исследуют для целей повышения эффективности терапии при ишемии нижних конечностей. Так, при сравнении в эксперименте на животных последствий имплантации клеток пуповинной крови и клеток костного мозга (КМ) на развитие сосудистой сети при ишемии нижних конечностей оказалось, что оба типа клеток оказывают равный терапевтический эффект (происходит увеличение плотности капилляров на единицу площади мышцы), однако выявлены различия фенотипа и характеристик роста клеток. В обеих популяциях клеток в равной степени была ярко выражена экспрессия маркеров моноцитов и эндотелиоцитов, а экспрессия маркеров (CXCR4) была значительно выше на клетках ПК, чем на клетках КМ. Результаты доклинических исследований позволили начать ограниченные клинические испытания с целью выяснения безопасности и эффективности метода введения клеток ПК в лечении ишемии нижних конечностей у людей. Таким образом, применение клеток ПК с целью обеспечения терапевтического ангиогенеза становится все более актуальным.

Имеются свидетельства применения системной трансплантации аутологичных МСК стволовых клеток у больных с резистентными формами туберкулеза. Достаточно широкий фронт работ выполняется с применением стволовых клеток для лечения диабета с тех пор, как было доказано, что они способны дифференцироваться в клетки, продуцирующие инсулин. Эти исследования из стадии доклинических экспериментов на животных перешли в разряд клинических испытаний. Цель этих методик – инфузия аутологичных клеток ПК детям с диабетом 1-го типа для «переустановки» иммунной системы и, возможно, для дифференцировки клеток ПК в инсулинпродуцирующие клетки. Одним из главных осложнений диабета является диабетическая нейропатия – осложнение, связанное, прежде всего, с нарушением трофики периферических нервов. Как источник эндотелиальных предшественников, а также клеток, продуцирующих факторы роста, клетки ПК могут рассматриваться в качестве правомерных кандидатов для терапии этого осложнения. Показано, что при внутримышечной трансплантации клетки ПК улучшают кровоток в нижних конечностях у животных с диабетом 1-го типа. Известны положительные результаты работ использования стволовых клеток для регенерации печени при хроническом гепатите и циррозе печени.

Особое направление применения клеточных технологий – это терапия злокачественных заболеваний. Как известно, при острых лейкозах у детей чаще всего требуется аллогенная пересадка гемопоэтических стволовых клеток костного мозга (ГСК). Результаты такой трансплантации обеспечивают уровень выживаемости у детей через 1 год в 59 %, а через два года – 47 %. Результаты по применению клеток на более взрослых пациентах выглядят значительно скромнее. В качестве основного источника гемопоэтических стволовых клеток для пациентов с острой лейкемией, нуждающихся в аллогенной трансплантации, рассматривают клетки пуповинной крови. Так, имеются примеры, доказывающие возможность использования клеток ПК для лечения хронического миелоидного лейкоза. Описаны результаты примене-

ния неродственных ПК с 20 %-й выживаемостью пациентов; при этом уровень рецидивов составил от 10 до 20 %, что значительно отличалось от такового при использовании клеток КМ. Имеются данные о применении клеток ПК в случае нескольких типов лимфом. Клиническое исследование на 21 пациенте свидетельствует в пользу 20–25 %-й выживаемости пациентов через год после трансплантации клеток ПК. Таким образом, несмотря на небольшие выборки пациентов, ПК можно уже сейчас рассматривать как адекватный источник ГСК для тех, кому требуется неродственная пересадка.

В связи с растущим интересом к ПК уже несколько лет предпринимаются попытки использовать ее при трансплантации взрослым реципиентам. Для этого обычных объемов ПК (40–100 мл) недостаточно для достижения выраженного терапевтического эффекта. Это привело к практике использования двух образцов, точнее их одновременной или последовательной пересадки взрослому пациенту. Например, во Франции зарегистрировано 4 клинических случая применения двух образцов ПК после неудачной первичной трансплантации (раннее отторжение трансплантата) при различных заболеваниях. В своих выводах исследователи отмечают, что пересадка двух даже неродственных образцов является большим преимуществом при лечении многих типов заболеваний, прежде всего из-за своей доступности. Особенно в случаях отторжения первого трансплантата. До сих пор, однако, неясно, как влияет на приживление пересадка двух образцов ПК по сравнению с одним. Следует отметить, что активно развиваемая в настоящее время клеточная заместительная терапия ориентирована на трансплантацию культивируемых стволовых или других клеток взрослого организма без учета необходимости создания для них соответствующего микроокружения, которое должно регулировать их восстановительную функцию в заданном направлении.

7.2.1. Клеточные технологии в реконструкции органов и тканей

Успех второго направления применения стволовых клеток в реконструктивной медицине, вводимых в составе биоинженерной конструкции, зависит во многом от наличия функциональных матриц (каркасов) тканей.

Развитие методов клеточной биологии и исследований в области тканевой инженерии открывает новые перспективы для реконструктивной ортопедии. Со стволовыми клетками применительно к восстановлению костных дефектов в настоящее время связывают большие надежды. Развитие клеточных технологий для костной хирургии прошло несколько этапов, от пересадок суспензий фетальных скелетогенных предшественников до использования аутогенных детерминированных остеогенных клеток. Описаны многочисленные примеры по восстановлению дефектов кости клеточными взвесями костномозговых клеток и их первичными культурами. Несмотря на имеющиеся положительные результаты, при перенесении метода в клинику стало очевидным, что он может иметь развитие только при условии его большей

эффективности по сравнению с существующими восстановительными технологиями (костная аллопластика, несвободная костная пластика по Г. А. Илизарову, и др.). Качественное превосходство методов клеточной и тканевой инженерии, как полагают специалисты, можно будет получить только при соблюдении канонов и принципов тканевой инженерии.

Используемый в тканевой инженерии междисциплинарный подход направлен в первую очередь на создание новых биокomпозиционных материалов для восстановления утраченных функций отдельных тканей или органов в целом. На первом этапе получают донорские мезенхимальные клетки костного мозга (или используют клетки из банка клеточных культур), далее клетки культивируют *in vitro* на подложке (scaffold) из биodeградируемого и биосовместимого материала, и затем имплантируют в место дефекта костной ткани (рис. 7.1).

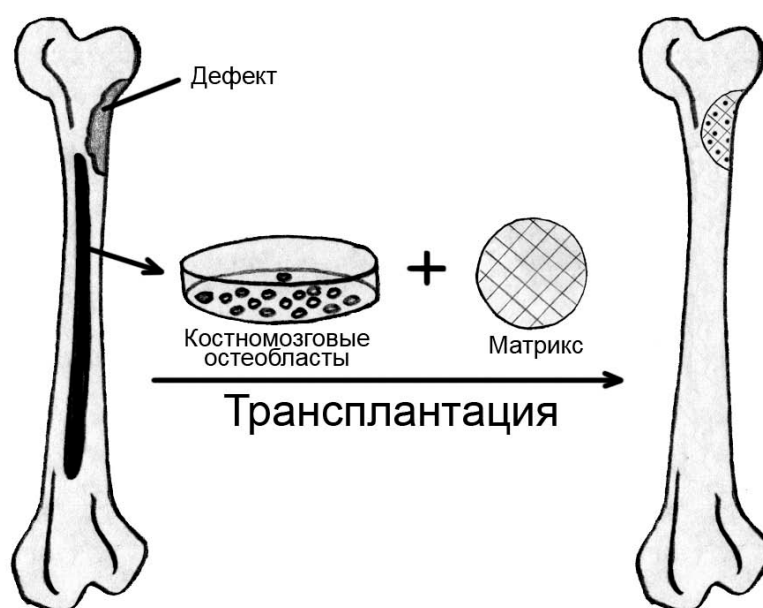


Рис. 7.1. Методология использования методов тканевой инженерии для реконструкции дефектов костной ткани

Однако для успешной индукции остеосинтеза в месте имплантации необходимо создать высокую начальную концентрацию клеток (до 10^7 – 10^8 клеток). Простое введение суспензии клеток оказалось малоэффективным, поэтому возникла серьезная проблема поиска адекватного носителя для закрепления трансплантируемых клеток в организм реципиента. Наиболее ответственным этапом использования культивированных клеток является трансплантация их в зону повреждения, которая зависит от того, какая часть клеток попадет в зону дефекта; адгезируются ли культивированные клетки на носителе, сохранят ли они активное функциональное состояние? При этом одной из сложных проблем является выбор адекватного носителя для клеток, так как для реализации остеогенных потенциалов культивируемые клетки должны определенное время находиться в фиксированном к носителю состоянии.

Это может быть связано с гистогенетическим свойством данных клеток проявлять свои остеогенные свойства, будучи организованными в сложные трехмерные структуры. Быстрая деградация носителя-подложки способствует вымыванию клеток вместе с трансудатом из раны.

Одной из основных задач тканевой инженерии в области лечения костных патологий является создание искусственных композитов, состоящих из алло- и/или ксеноматериалов в сочетании с биоактивными молекулами (костные морфогенетические белки, факторы роста и т. д.) и способных индуцировать остеогенез. При этом такие материалы должны обладать рядом необходимых свойств кости: во-первых, они должны выполнять и поддерживать объем дефекта; во-вторых, обладать остеоиндуктивностью, то есть активно побуждать остеобласты и, возможно, другие мезенхимальные клетки к формированию кости; в-третьих, иметь хорошие показатели биосовместимости, то есть быть биodeградируемыми и не вызывать у реципиента воспалительных реакций. Последнее качество обычно достигается в материале только за счет снижения его антигенных характеристик. Совокупность всех этих свойств позволяет таким материалам параллельно с опорной (остеокондуктивной) функцией обеспечивать и биоинтеграцию – вращание клеток и сосудов в структуры имплантата. Известно, что поддерживающий эффект любого материала обеспечивается, как правило, его структурными особенностями. Для биоматериалов этот показатель обычно связан с архитектоникой нативной ткани, из которой он получен. Для кости основными параметрами структурной прочности являются твердо-эластические характеристики костного матрикса и величина пор в нем.

С использованием стромальных клеток костного мозга вполне успешно разрабатываются технологии восстановления медленно регенерирующей костной ткани костей черепа. Показано, что введение в рану клеточного эквивалента, приготовленного из стромальных клеток остеогенной дифференцировки, включенных в гель коллагена, ускоряет и качественно улучшает заживление. Через 120 дней после имплантации клеток у опытных животных полностью закрылась рана, в то время как у контрольных особей (введение только коллагена) восстановление костной ткани не происходило. Создание тканеинженерного эквивалента костной ткани предполагает сочетание в одном изделии материала – носителя и совокупности остеогенных клеток. По современным представлениям эффективным матриксом (носителем) клеток может служить человеческий деминерализованный костный матрикс (ДКМ), заселенный аутогенными стромальными клетками пациента. В пилотных экспериментах установлено, что ДКМ, полученный из губчатой кости человека, может выполнять роль носителя для клеток при изготовлении тканевого эквивалента костной ткани, поскольку по своей архитектонике в точности воспроизводит структуру губчатой кости. Его площадь позволяет разместить на поверхности большое количество культивированных клеток – до 10^6 на см^3 . Культивированные остеогенные клетки адгезируются к нему, распластываются и колонизируют свободные поверхности. При анализе полутонких срезов установлено, что не все клетки на поверхности матрикса имеют

одинаковую морфологию. Часть клеток располагается кластерами, приобретает кубовидную форму и цитоморфологию, характерную для остеобластов; в ряде случаев цитоплазма клеток образует тонкие выросты, выстилающие матрикс. По данным трансмиссионной электронной микроскопии культивированные клетки не всегда плотно адгезированы к поверхности декальцинированного костного матрикса, в основном связь с матриксом осуществляется за счет нескольких контактов, в то время как между коллагеновым деминерализованным матриксом и клеткой сохраняется свободное пространство. Ультраструктура клеток при этом (соотношение гетеро- и эухроматина) свидетельствует об активных метаболических процессах.

В настоящее время значительный интерес представляют биоактивные пористые деградируемые материалы, сохраняющие достаточную механическую прочность в процессе их замещения костной тканью. Особенно перспективны материалы, в состав которых введен гидроксиапатит. Остеогенные свойства гидроксиапатита и трикальцийфосфата, составляющих основу минерального матрикса кости, убедительно доказаны феноменом эктопического костеобразования, когда на поверхности кальцийфосфатных (КФ) материалов формируется костная ткань. Различные образцы КФ материалов, в зависимости от физико-химических свойств (степень кристалличности и пористости, растворимость, шероховатость поверхности и т. д.), обладают разной способностью поддерживать костеобразование. До сих пор не удалось найти ключевое сочетание их структуры, толщины и скорости растворения для реализации остеогенного потенциала пула мезенхимальных стромальных клеток. В реальности, однако, восстановление естественной структуры кости происходит значительно медленнее, по сравнению со скоростью деградации матрикса. Поэтому значительное распространение получили недеградируемые материалы. Взаимодействие костных структур с материалом имплантата определяется его химическими свойствами, характеристиками микрорельефа и смачиваемостью поверхности. Для увеличения остеointegrативных свойств этих материалов предлагаются многочисленные варианты реконструкции их поверхности. При этом задачами обработки являются получение поверхностного слоя костеподобного апатита, уменьшение выделения ионов вещества в ткани, отсутствие цитотоксичности, увеличение адгезии клеток, высокая активность связывания протеинов. Использование мезенхимальных стволовых клеток в тканевой инженерии позволяет придавать остеоиндуктивные свойства материалам, таковыми в обычных условиях не обладающими. В травматологии и челюстно-лицевой хирургии широкое распространение получили также имплантаты на основе сплавов благородных или просто биоинертных металлов: титана и его сплавов, циркония, золота, платины. Как титан, так и сусальное золото обладают хорошими адгезивными свойствами для МСК. Пролиферация клеток наиболее активно происходит на образцах из сусального золота. Далее в порядке убывания следуют титан с плазменным напылением, с пескоструйной обработкой и, наконец, с фрезерной обработкой поверхности. Титан и цирконий существенно отличаются от других металлов тем, что на их поверхности спонтанно образуется оксидный слой, на основе которого в свою очередь формируются

фосфаты кальция. Таким образом, титан можно рассматривать как биоактивный материал. Скрининг материалов, как правило, проводят на клеточных культурах остеобласт-подобных клеток и МСК. При этом обычно отслеживают пропорциональность активности первичной адгезии и распластывания клеток на поверхности материала (до 24 часов) дальнейшей экспрессии маркеров остеогенеза. Считается, что при прочих равных условиях увеличение шероховатости поверхности усиливает адгезию, пролиферацию и фенотипическую экспрессию остеобластов. Поиск материалов, обладающих остеопластическими свойствами, продолжается. Так, с использованием резорбируемых полигидроксиалканоатов (ПГА) для целей репаративного остеогенеза разработано семейство объемных имплантатов разного состава: из полимера гидроксимасляной кислоты (полигидроксibuтирата, ПГБ) и из композиции этого полимера с гидроксиапатитом (ГАП). В экспериментах на животных с использованием модели сегментарной остеотомии исследованы остеопластические свойства разработанных имплантатов в сравнении с фирменными материалами, применяемыми в стоматологии (композитом гидроксиапатит/коллаген, препаратом «Коллапол» и препаратом аллокости «Bio-OSS»). Показано, что реконструктивный остеогенез происходит более активно при использовании всех типов имплантатов, содержащих в качестве основного компонента ПГБ, по сравнению с фирменными материалами. Собственно ПГБ и его композиции с гидроксиапатитом обладают выраженными остеопластическими свойствами, адекватно медленно деградируют *in vivo*, обеспечивая нормальное протекание репаративного остеогенеза и пригодны для реконструкции дефектов костной ткани.

Для восстановления повреждений длинных костей конечностей объективной необходимости развития методов тканевой инженерии пока нет. Это связано с тем, что, во-первых, трубчатые кости имеют все необходимые компоненты для реализации репаративного остеогенеза и, во-вторых, пока не накоплено знаний о процессах остеоинтеграции таких больших фрагментов костной ткани. Серьезной проблемой для восстановления больших костных фрагментов является также трудно решаемая хирургически необходимостью обеспечения оптимального кровоснабжения. Поэтому применение клеточных технологий в этой области требует осторожного подхода. К настоящему времени зарегистрировано несколько тканеинженерных продуктов для регенерации костной ткани с применением клеточных технологий. В США – это препарат «Osteocell®», представляющий собой диминерализованный аллогенный костный матрикс, засеянный МСК; его аналог в Европе «BioSeed-Oral Bone®». В России аналогичный препарат разработан в Институте трансплантологии и искусственных органов. Показано, что дополнительная иммобилизация МСК из аутологичного костного мозга на аллогенном деминерализованном костном имплантате ускоряет процесс остеогенеза и сокращает сроки репаративной регенерации трубчатых костей.

Проблема лечения ложных суставов до настоящего момента остается одним из актуальных вопросов современной травматологии и ортопедии. Повышение хирургической активности в последние десятилетия не только не решило, но и не уменьшило проблему несращения переломов. На протяже-

нии длительного времени совершенствовались методы костной пластики ложных суставов от различных вариантов свободной ауто- и аллопластики, в том числе с применением деминерализованных костных трансплантатов, до пересадки кровоснабжаемых комплексов тканей. Однако процессы костеобразования и перестройки при различных вариантах ауто- и аллопластики протекают достаточно длительно и превышают средние сроки сращения переломов соответствующей локализации в 2–2,5 раза. Экспериментально доказано наличие костеобразования в деминерализованном трансплантате при заселении его сингенными мезенхимными стволовыми клетками. Это служит основой для разработки нового способа лечения ложных суставов путем трансплантации аутологичных мезенхимных стволовых клеток с применением биотрансплантата на основе деминерализованного костного матрикса.

Новые технологии также востребованы для реконструкции костной ткани в челюстно-лицевой хирургии. Для заполнения дефектов костной ткани челюстей в настоящее время более широко начинают применять остеотропные биоматериалы (керамика, композиты кальцийфосфатных материалов с коллагеном), обладающие биосовместимостью, высокой прочностью и остеоиндуктивными свойствами. Однако полученные результаты их использования неоднозначны, в ряде случаев через 1–3 месяца помещенный в костные карманы материал резорбируется и наблюдаются рецидивы хронического процесса. В доклинических и ограниченных клинических экспериментах получены хорошие результаты по восстановлению костной ткани при использовании остеотропных материалов (гидроксиапатиты, биокерамика, деминерализованный костный матрикс и др.) в комплексе с клеточным материалом, в том числе с МСК. Показано, что остеотропный материал является каркасом для формирования костной ткани и стимулирует дифференцировку МСК в направлении остеоцитов. К настоящему времени разработаны методики по выделению МСК из костного мозга самого пациента и наращиванию их *in vitro* до необходимых количеств. Это позволяет проводить аутотрансплантацию МСК, избегая проблем иммунологической совместимости. Применение аутологичных МСК в комплексе с гидроксиапатитом кальция может стать эффективным способом тканевой инженерии в стоматологии. Метод, несомненно, требует дальнейшего изучения.

7.2.2. Клеточные технологии в реконструкции мышечной ткани и кожи

Эндопротезирование поврежденной мышечной ткани представляет собой весьма сложную задачу. Продвижением работ в этом направлении, возможно, станет применение клеточных технологий. В литературе встречаются описания результатов поисковых исследований, направленных на разработку матриксов, пригодных для культивирования *in vitro* клеток фибробластического ряда для формирования тканей, в том числе и мышечных структур. Известны примеры имплантирования полимерных матриксов с иммобилизо-

ванными клетками для реконструкции дефектов мышечных тканей. Пленочный матрикс «ЭластоПОБ», разработанный в НИИ трансплантологии и искусственных органов из резорбируемых ПГА, исследован для использования с целью восстановления механических повреждений скелетной мышцы (на примере модельных дефектов грудных мышц). Одной группе животных имплантировали полимерные матриксы, второй – матриксы с иммобилизованными мезенхимальными клетками костного мозга, в третьей группе иммобилизованные на матриксе мезенхимальные клетки дополнительно обрабатывали 5-азациитидином, способствующим дифференцировке мезенхимальных стволовых клеток в миогенном направлении. Полимерные матриксы ЭластоПОБ обладали достаточной прочностью и эластичностью и давали возможность при имплантации свободно обернуть поврежденные мышцы и прочно закрепить их в пределах здоровых тканей узловыми швами из нитей диаметром 8/0. Результаты показали, что мезенхимальные клетки костного мозга оказывают значительное влияние на течение воспалительного процесса в поврежденной скелетной мышце: тормозят образование фиброзной капсулы вокруг матрикса, активно способствуют миграции клеток лимфоидного ряда в очаг воспаления. Мезенхимальные клетки костного мозга, обработанные 5-азациитидином, стимулируют ангиогенез в поврежденной скелетной мышце. Полученные экспериментальные данные исследования функциональных свойств пленочного матрикса *in vitro* и *in vivo* позволяют рекомендовать ЭластоПОБ в качестве носителя предварительно культивированных стволовых клеток для доставки жизнеспособных клеток в патологический очаг, удержания их там и оптимизации условий их лечебного воздействия в местах повреждения тканей.

Весьма продвинутыми технологиями тканевой инженерии являются в настоящее время регенерация дефектов кожных покровов. Успехи этого направления связаны с применением технологий клеточной и тканевой инженерии. Доказано, что клетки кожи можно выращивать *in vitro* в лаборатории для создания лоскутов кожи. Однако эта процедура требует времени. Трансплантация выращенных в культуре эпителиальных клеток значительно ускоряет процесс заживления ран. При снятии с поверхности сосуда, выращенного *in vitro* пласта кератиноцитов или фибробластов с помощью протеолитических ферментов, повреждаются клеточные рецепторы. Трансплантация клеток вместе с резорбируемой полимерной подложкой исключает процедуру обработки ферментами.

Самое большое распространение в качестве матриксов для культивирования фибробластов получили трехмерные гели на основе коллагена, фибрина, хитозана в виде сеток, губок, клеев. Такие дермальные эквиваленты кожи в ряде стран, включая РФ, успешно прошли этапы доклинических исследований и находятся на стадии внедрения в клинику. Первые клеточные продукты для этих целей были приготовлены с культивируемыми клетками кожи человека – кератиноцитами и фибробластами, и применены для лечения ожогов. Такие конструкции, приготовленные с нормальными клетками из здоровых тканей, либо заменяют поврежденные клетки пациента, либо стиму-

лируют их функционирование. Для обеспечения успеха всех этапов технологии необходимы сопутствующие материалы. Одним из них является коллаген I типа. В отделе клеточных культур Института цитологии РАН совместно с Институтом высокомолекулярных соединений РАН и химическим факультетом Санкт-Петербургского университета разработана серия резорбируемых полимерных матриц на основе природных полимеров (хитина и хитозана) и полимолочной кислоты, предназначенные для культивирования на них клеток с последующим переносом в место дефекта, что позволяет облегчить процесс трансплантации клеток на рану, избежав их травмирования путем обработки ферментами. Этот тканеинженерный продукт зарегистрирован в Росстандарте и его применение разрешено. Некоторые виды таких резорбируемых матриц могут служить биологическими повязками для лечения ожогов, трофических язв, пролежней, свищей, последствий буллезно-флегмонозных воспалений. Коллективом разработана серия клеточных продуктов, квалифицируемых как изделия медицинского назначения: на основе дермальных фибробластов и коллагена I типа готовится дермальный эквивалент (аналог дермы); с культивируемыми кератиноцитами – многослойный пласт кератиноцитов (аналог эпидермиса); в комбинации дермального эквивалента и кератиноцитов – эквивалент полной кожи. На эти продукты составлены соответствующие нормативные документы. На дермальный эквивалент и многослойный пласт кератиноцитов проведены все необходимые по законодательству испытания – технические, токсикологические и клинические; имеется регистрация МЗ РФ и разрешение на их серийное производство и клиническое применение. Другой эквивалент кожи разработан с использованием резорбируемой полимерной матрицы, предназначенной для культивирования кератиноцитов и дальнейшей их трансплантации на рану. В качестве биodeградируемого материала, предназначенного для формирования матрицы, использован полилактид с гидрофобной поверхностью. Для повышения клеточного сродства к полимеру поверхность матрикса модифицирована нанесением коллагена I типа, а также в результате аминолитиза раствором диамина. Предложенные способы модификации значительно улучшают свойства полимерной матрицы, предназначенной для культивирования клеток. Использование таких систем позволяет заменить процедуру пересадки аутотрансплантата введением в мембранный матрикс фибробластов перед нанесением на рану.

Матрицы для засева фибробластических клеток конструируют из различных, в том числе из биорезорбируемых материалов, которые постепенно деградируют, замещаясь образующимся неoдермисом. Пленочный матрикс «ЭластоП0Б», разработанный в Институте трансплантологии и искусственных органов из резорбируемого полигидроксипутирата с иммобилизованными аллогенными фетальными мезенхимальными стволовыми клетками (ФМСК), положительно охарактеризован для восстановления повреждений кожи животных в результате глубоких термических ожогов. Результаты показали, что иммобилизованные на поверхности матрикса ФМСК способствуют более ранней активизации репаративных процессов в ожоговых ранах,

по сравнению с клетками, которые вносили в рану в суспензии. Это связано с их исходно более высокой функциональной активностью, обусловленной создавшимися в монослое клеток адекватными межклеточными взаимодействиями.

7.2.3. Клеточные технологии в лечении сердечно-сосудистой патологии

В области сердечно-сосудистой хирургии с использованием методов клеточных технологий и тканевой инженерии разрабатываются гибридные конструкции для протезирования поврежденных сосудов, а также клапанов сердца. Гибридные протезы сосудов состоят из основной конструкции, изготовленной из полимерного материала с нанесенными на внутреннюю поверхность ксеногенными и аллогенными клетками различного типа, в основном эндотелиальными. Имеются многочисленные попытки выращивания *in vitro* на поверхности синтетических сосудистых протезов (из Лавсана и Дакрона) фибробластов, эндотелиальных и гладкомышечных клеток. Результаты испытаний первых гибридных эндопротезов на животных имели, однако, негативные последствия – от выраженных иммунных реакций со стороны реципиента и септических проявлений до механического повреждения имплантатов. В конце 90-х гг. прошлого века были опубликованы результаты по разработке полностью биологического протеза сосуда (не армированного сеткой из Дакрона) с напряжением на разрыв более 2000 мм рт. ст., что соответствует аналогичному параметру для кровеносного сосуда человека. Результаты кратковременных (от 1 до 7 суток) испытаний этих протезов в экспериментах на собаках показали легкость хирургического манипулирования с имплантатом и их функциональность. Имеются сообщения о положительных результатах исследования ПГА для конструирования гибридных эндопротезов сосудов. Так, полимерные матриксы из сетчатого полилактида, на поверхность которых был нанесен слой сополимера гидроксигексаноата с гидроксиктаноатом (ПГГ/ПГО), предварительно засеянный аутоклетками из сонной артерии, имплантировали животным. Полимерные имплантаты в виде трубочек диаметром 7 мм после подращивания клеток были имплантированы животным в качестве протеза легочной артерии и створок клапана легочной артерии в экспериментах на ягнятах. В экспериментальной группе полимерные имплантаты, засеянные клетками, оставались функциональными в течение всего периода наблюдения (180 суток); негативных осложнений в виде развития аневризм или структур не наблюдали. В среднем слое формирующейся ткани эластиновых волокон отмечено образование специфического эндотелиального фактора Виллебранда. Механическая прочность испытуемых протезов сосуда была сопоставима с нативными сосудами. Результаты данного опыта резко отличаются от аналогичных исследований модельных сосудистых протезов, изготовленных из композита синтетических полилактида/полигликолида. При использовании последних

отмечена быстрая деструкция пористого имплантата и развитие аневризм в течение нескольких недель после операции.

Новое направление, ориентированное на совершенствование конструкций протезов клапанов сердца, связано с методологией и потенциалом клеточной и тканевой инженерии. Идеальной моделью тканно-инженерного клапана представляется конструкция, засеянная аутогенными сосудистыми клетками пациента. Положительные результаты использования клеточной инженерии для создания биоискусственного протеза клапана получены в экспериментах на животных. В качестве конструкционных материалов при формировании гибридного клапана сердца применяют биodeградируемые полимерные материалы типа полигликолида (ПГК) или полигидроксиалканоев (ПГА). Наиболее впечатляющие результаты в ходе конструирования тканно-инженерных гибридных клапанов сердца получены к настоящему моменту с использованием ПГА. Описаны положительные результаты при сравнительном испытании на животных моделей легочных шунтов, изготовленных из полигидроксиоктаноата (ПГО), в сравнении с полилактидными имплантатами. Трехстворчатые полимерные трубочки, засеянные аутологическими срединными клетками эндотелия, после 7-дневного подращивания клеток *in vitro* были имплантированы овцам. Функцию клапанов оценивали в динамике в течение 24 недель с использованием эхокардиографии. Параллельно проводили гистологические и биохимические исследования. У опытных животных наблюдали формирование нормально организованной ткани. Образование тромбов в ходе всего эксперимента не отмечено. Молекулярная масса полимерного имплантата при этом снизилась за 24 недели примерно на 26 %. У контрольных животных через 4 недели сформировались тромбы на всех створках клапана.

Следует отметить также, что жесткие синтетические материалы, такие, как полигликолактиды, пригодны только для изготовления двухстворчатых клапанов и не пригодны для изготовления трехстворчатых клапанов, например, клапанов легочных артерий. Эластичные, резиноподобные типы ПГА – полигидроксиоктаноат (ПГО) и сополимеры гидроксиоктаноата и гидроксигексаноата (ПГО/ПГГ) использованы для конструирования клапанов сердца. Полимерная пористая матрица из ПГО или сополимерного материала была засеяна клетками, выделенными из сосудистой ткани, которые *in vitro* в течение восьми суток активно пролиферировали, заполняя поры материала, и синтезировали коллаген, что обеспечило формирование соединительной ткани между наружной и внутренней поверхностями матрицы. Конструкции успешно испытаны в биореакторе с пульсирующим током среды.

Полученные аналогичным способом трехстворчатые клапаны, изготовленные из сетчатой матрицы полилактида с полимерным покрытием из полигидроксибутирата, были имплантированы ягням. Спустя 20 недель после имплантации тканеинженерных клапанов функциональные характеристики не отличались от нативных. Гистологический анализ подтвердил формирование нормально организованной слоистой ткани с эндотелием. С использованием эхокардиографии было подтверждено, что створки клапана функциони-

ровали в нормальном режиме. Образования стенозов, тромбозов или аневризм не обнаружено. Важно отметить, что с течением времени за 20 недель внутренний диаметр конструкции клапана увеличился с 19 мм в начале эксперимента до 23 мм. Это свойство функционирования тканеинженерных клапанов является важным, так как может быть использовано при операциях у детей, что позволит исключить необходимость повторных операций. Результаты позволяют надеяться, что разработка и применение более совершенных материалов в этой области позволит в ближайшее время снять проблему, существующую при использовании механических клапанов и клапанов животных. Однако прогресс в этой области тесно связан с пониманием механизма высокодетерминированного и комплексного процесса морфогенеза клапанов сердца при их эмбриональном развитии. Пока не решена проблема механической стабильности биоискусственных клапанов в условиях реальной гемодинамики. Решение данной проблемы лежит на пути оптимизации формирования в условиях *in vitro* не только коллагена, ответственного за механическую стабильность экстраклеточного матрикса, но и клеточных структур. Предполагается, что в ближайшие 10–15 лет биоискусственные клапаны сердца, способные к адаптации и регенерации, не требующие антикоагулянтной терапии, постепенно вытеснят существующие механические клапаны сердца и биопротезы.

Таким образом, можно констатировать, что в настоящее время происходит активный поиск и начинается внедрение клеточных технологий повсеместно. Нельзя не отметить, что специфика этой области такова, что клинические учреждения, как правило, включаются в эту работу только на завершающем этапе клинических испытаний, а весь предшествующий путь от выделения и культивирования клеток до получения тканеинженерной конструкции проходят самостоятельно вне клиники другие специалисты, – биотехнологи, цитологи, материаловеды; за рубежом – это в основном фирмы и коммерческие компании, в РФ – лаборатории научно-исследовательских учреждений. Сегодня, когда уже накоплен значительный опыт в области клинических исследований клеточных технологий, вполне уместно ставить вопрос о создании таких подразделений и структур при клиниках.

ГЛАВА 8. НОВЕЙШИЕ КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

8.1. Клонирование животных клеток и высших животных

К новейшим клеточным технологиям относятся: клональное размножение животных клеток для генетических манипуляций, гибридная техника, слияние клеток и техника ведения клеточных культур животных, гибридизация животных клеток и клонирование животных. Важное направление клеточных технологий и клеточной инженерии связано с ранними эмбриональными стадиями. Так, оплодотворение яйцеклеток в пробирке позволяет преодолеть бесплодие. С помощью инъекции гормонов можно получить от одного животного десятки яйцеклеток, искусственно их оплодотворить *in vitro* и имплантировать в матку других животных. Эта технология применяется в животноводстве для получения монозиготных близнецов. Разработан новый метод, основанный на способности индивидуальных клеток раннего эмбриона развиваться в нормальный плод. Это позволяет размножать различных животных ускоренным путем. Манипуляции на эмбрионах используют для создания эмбрионов различных животных. Подход позволяет преодолеть межвидовой барьер и создавать химерных животных.

8.1.1. Гибридная технология

Наиболее перспективным направлением клеточной инженерии является гибридная технология. Гибридные клетки (*гибридомы*) образуются в результате слияния клеток с различными генетическими программами, например, нормальных дифференцированных и трансформированных клеток. Блестящим примером достижения данной технологии служат гибридомы, полученные в результате слияния нормальных лимфоцитов и миеломных клеток. Эти гибридные клетки обладают способностью к синтезу специфических антител, а также к неограниченному росту в процессе культивирования.

В отличие от традиционной техники получения антител гибридная техника впервые позволила получить моноклональные антитела (антитела, продуцируемые потомками одной-единственной клетки). Моноклональные антитела высокоспецифичны, они направлены против одной антигенной детерминанты. Возможно получение нескольких моноклональных антител на разные антигенные детерминанты, в том числе сложные макромолекулы.

Моноклональные антитела в промышленных масштабах получены сравнительно недавно. Как известно, нормальная иммунная система способна в ответ на чужеродные агенты (антигены) вырабатывать до миллиона различных видов антител, а злокачественная (переродившаяся иммунная) клетка синтезирует только антитела одного типа. Миеломные клетки быстро размножаются. Поэтому культуру, полученную от единственной миеломной

клетки, можно поддерживать очень долго. Однако невозможно заставить миеломные клетки вырабатывать антитела к определенному антигену. Эту проблему удалось решить в 1975 г. Цезарю Мильштейну. У сотрудников Медицинской научно-исследовательской лаборатории молекулярной биологии в Кембридже возникла идея слияния клеток мышинной миеломы с В-лимфоцитами из селезенки мыши, иммунизированной каким-либо специфическим антигеном. Образующиеся в результате слияния гибридные клетки приобретают свойства обеих родительских клеток: бессмертие и способность секретировать огромное количество какого-либо одного антитела определенного типа. Эти работы имели огромное значение и открыли новую эру в экспериментальной иммунологии.

В 1980 г. в США Карло М. Кроче с сотрудниками удалось создать стабильную, продуцирующую антигены, внутривидовую человеческую гибридому путем слияния В-лимфоцитов миеломного больного с периферическими лимфоцитами от больного с подострым панэнцефалитом.

Основные этапы получения гибридной техники следующие. Мышей иммунизируют антигеном, после этого из селезенки выделяют спленоциты, которые в присутствии полиэтиленгликоля сливают с дефектными опухолевыми клетками (обычно дефектными по ферментам запасного пути биосинтеза нуклеотидов – гипоксантина или тиамина). Далее на селективной среде, позволяющей размножаться только гибридным клеткам, проводят их отбор. Питательную среду с растущими гибридами тестируют на присутствие антител. Положительные культуры отбирают и клонируют. Клоны инъецируют животным с целью образования опухоли, продуцирующей антитела, либо наращивают их в культуре. Асцитная жидкость мыши может содержать до 10–30 мг/мл моноклональных антител. Гибридомы можно хранить в замороженном состоянии и в любое время вводить дозу такого клона в животное той линии, от которой получены клетки для слияния. В настоящее время созданы банки моноклональных антител. Антитела применяют в разнообразных диагностических и терапевтических целях, включая противораковое лечение.

Эффективным способом применения моноклональных антител в терапии является связывание их с цитотоксическими ядами. Антитела, конъюгированные с ядами, отслеживают и уничтожают в макроорганизме опухолевые клетки определенной специфичности.

8.1.2. Гибридизация животных клеток

В начале XIX в. в связи с открытием многоядерных клеток была установлена способность соматических клеток сливаться друг с другом, однако гибриды соматических клеток были открыты лишь в 60-х годах XX столетия. В 1960 г. Барский с сотрудниками сообщили о выделении линии гибридных клеток; гибридные клетки были получены путем смешения двух линий, выделенных ранее из одной клетки мышинной саркомы. Исходные линии отличались по числу и морфологии хромосом, а также по способности к образо-

ванию опухоли при введении их мышам. Гибридные клетки содержали число хромосом, отличное от исходных клеточных линий, а также поверхностные антигены клеток обеих родительских линий. Было установлено, что клеточные гибриды можно получить, используя клетки различных видов животных. В качестве агента, индуцирующего слияние, выступал инактивированный вирус NVJ, называемый также вирусом Сендай. С этих пор вирус Сендай стал широко использоваться в экспериментах по слиянию клеток.

При изучении межвидовых гибридных клеток, способных к пролиферации, были сделаны два очень важных вывода: первый о том, что в гибридах могут проявиться оба генома; второй о том, что в долгоживущих межвидовых гибридах элиминируются хромосомы одного вида.

Слияние клеток *in vivo* и *in vitro* может проходить без добавления специальных агентов, то есть спонтанно.

В естественных условиях слияние клеток происходит и у млекопитающих. Например, клетки могут сливаться при формировании мышечных трубочек. Еще в XIX в. было показано, что миофибриллы поперечно-полосатых мышц образуются в поликарионах – крупных удлинённых многоядерных клетках. Поликарионы – продукт слияния одноядерных миобластов. Слияние опухолевых клеток – довольно обычное явление, при этом опухолевые клетки *in vivo* иногда сливаются и с нормальными. Эксперименты по спонтанному слиянию клеток проводились и *in vitro*. При проведении подобных экспериментов получают так называемых «химерных» или аллофеных мышей – животных, в тканях которых содержатся клетки различных генотипов.

8.1.3. Клонирование животных

Искусственное разделение эмбриона является рутинным методом клонирования. Метод дает возможность получения большого числа копий животных от высокоценных производителей. Возможно получение большого числа копий однояйцовых близнецов путем разделения зародышей в стадии бластулы или морулы на части. Полученные части зародыша вводятся в пустые оболочки яйцеклеток свиньи, помещают в агаровые цилиндры на несколько дней, далее вводят в яйцеводы овец. Нормально развившиеся зародыши пересаживают хирургическим путем коровам-реципиентам на 6–7 день полового цикла. Выживаемость у половинок составляет до 75 %, у четвертинок – ниже, около 40 %. Образующиеся в результате этого эмбрионы внедряются в матку суррогатной матери, которая обеспечивает их вынашивание и рождение. Так как эмбрионы происходят из одной зиготы, они являются генетически абсолютно идентичными.

Манипуляции на эмбрионах используют для создания эмбрионов различных животных. Подход позволяет преодолеть межвидовой барьер и создавать химерных животных. Таким образом получены, например, овцекозлиные химеры. Первые эксперименты показали возможность трансформации генома животных генами человека, в США удалось получить свиней,

несущих ген гормона роста человека. В Эдинбургском центре биотехнологии получены овцы с перенесенным фактором девятого человека, который секретируется в составе молока.

Новый метод – *перенос ядра соматической клетки* (или перепрограммирование яйцеклеток) начинается с выделения из организма соматической клетки – любой клетки, не участвующей в процессе репродукции (то есть любой, кроме половых клеток: сперматозоидов и яйцеклеток). У млекопитающих любая соматическая клетка содержит полный, двойной набор хромосом (в каждой паре одна хромосома получена от материнской яйцеклетки, вторая – от отцовского сперматозоида). Геном любой половой клетки состоит только из одного хромосомного набора. Для создания овцы Долли исследователи переместили ядро соматической клетки, полученной от взрослой овцы, в яйцеклетку, в которой ядро было предварительно удалено. После проведения определенных химических манипуляций яйцеклетка с подмененным ядром начала вести себя как свежееплодотворенная яйцеклетка. В результате ее деления сформировался эмбрион, который был имплантирован суррогатной матери и выношен в течение полного срока беременности. Появление Долли продемонстрировало возможность удаления генетической программы ядра специализированной соматической клетки и его перепрограммирования в лабораторных условиях методом помещения в яйцеклетку. В течение 5–6 дней яйцеклетка развивается в эмбрион, генетически идентичный животному-донору. Клетки этого эмбриона могут быть использованы для получения любого типа ткани, которая при пересадке не будет отторгаться организмом донора ядра. Этот метод вполне может быть использован для выращивания клеток и тканей для заместительной терапии. Этот метод клонирования животных весьма активно используют в настоящее время.

8.2. Стволовые клетки.

История вопроса и перспективы применения

Развитие биоинженерии, связанное с использованием стволовых клеток (СК), породило многочисленные слухи, мифы и предубеждения. На Западе эта область знаний в течение 10 лет из-за моратория, который был снят в Великобритании, Австрии, Японии, США, Германии в 2000–2002 гг., развивалась биотехнологическими фирмами и корпорациями. В России, по мнению В. Репина (2002), «отсутствие знаний и эффективного государственного контроля привело к тому, что рынок медицинских услуг захвачен псевдотехнологиями. Дилетантское обсуждение проблемы СК начинается с трансплантации и клонирования организмов». Серьезное обсуждение должно начинаться с фундаментальных свойств и закономерностей функционирования СК, в которых, несмотря на ряд бесспорных прорывов, имеются существенные пробелы.

8.2.1. История выделения и изучения стволовых клеток

Открытие тотипотентных (эмбриональных) СК (ТПСК) является третьим по значимости событием в области биологии после расшифровки двойной спирали ДНК и программы «Геном человека». Термин СК впервые был предложен А. Максимовым в 1906 г. для объяснения унитарной теории кроветворения, которая экспериментально была подтверждена через полвека.

Stevens в 1955 г. впервые удалось выделить из тератокарциномы нераковые клетки, которые он назвал эмбриональными плюрипотентными клетками, так как в культуре ткани *in vitro* они давали начало различным тканевым зачаткам (мышцы, нервы, кожа, волосы, сердце и др.). Gearhart в 1973 г. из 5–9-недельных эмбрионов человека, используя технику культивирования клеток на подложке фибробластов мыши, получил незрелые эмбриональные клетки. Первая популяция эмбриональных стволовых клеток человека (ЭСКЧ) была получена Thomson. Примерами ТПСК могут быть оплодотворенная яйцеклетка и клетки эмбриона до стадии 8–16 сомитов, тератосаркома человека линии NTERA-2, TERA-2, H-9 clone. Кроме того, ТПСК можно получить путем пересадки ядер взрослого организма в денуклеированные бластоциты или с помощью культивирования эмбриональных клеток *in vivo* и *in vitro*. Количество рецепторов и функционирующих генов в ТПСК минимально. На их мембране обнаруживаются рецепторы к ФРСК, ЛИФ, ИЛ-6, гликопротеины TRA-1-01, TRA-1-60. Определены внутриклеточные маркерные протеины Oct-3, Oct-4, Tct, Groucho, относящиеся к так называемым белкам-сайленсерам хроматина. С их помощью происходит сверхкомпактная упаковка гетерохроматина, препятствующая образованию петель эухроматина. ЭСКЧ в обычных условиях на поздних стадиях дробления и образования гастрюлы, как правило, утрачивают типотентность и дают начало развитию более дифференцированного пула стволовых клеток для зародышевых ростков. Из них позднее формируются специализированные ткани и органы. Эта категория стволовых клеток относится к разряду специализированных СК. Среди них выделяют полипотентные (ППСК) мульти- и плюрипотентные, би- и унипотентные (БСК, УСК) категории предшественников (прекурсоров). Мезенхимные СК (в отличие от гемопоэтических СК) имеют много фенотипов (фенотип CD-14-, 29-, 34-, 35-, 44-, 90⁺, 106⁺, 120-, 124-); на их поверхности обнаруживаются рецепторы к ФРСК, ИЛ-6, 7, 8, 11, 12, 14, 15, ЛИФ.

Согласно современным представлениям в организме существуют молекулярно-генетические часы (теломераза), которые лимитируют количество делений элементов, обладающих высоким пролиферативным потенциалом. В силу этих обстоятельств дочерние клетки, образующиеся за счет симметричного или (и) асимметричного деления СК, постепенно утрачивают способность к неограниченному воспроизводству. С позиции биологической целесообразности этот механизм позволяет избежать злокачественной или доброкачественной трансформации СК. Опыты по культивированию фибробластов в системе *in vitro* показали, что пролиферативный потенциал клеток млекопитающих ограничен 60–65 делениями. Этого вполне достаточно,

чтобы из одной клетки образовалось около 10^{19} – 10^{20} кариоцитов, что в пересчете на массу составляет несколько тонн. Полагают, что количество СК, закладываемое в процессе эмбриогенеза, имеет константную величину. Причем избыток прекурсоров элиминируется с помощью специальных механизмов, в частности, ускоренной терминальной дифференцировкой или апоптозом. По-видимому, с возрастом пролиферативный потенциал и число СК постепенно истощаются, что приводит к развитию необратимых дистрофических и дегенеративных процессов.

Стволовые клетки различных тканей представляют собой недифференцированные или слабодифференцированные элементы со схожей морфологией и структурой. По мере утраты полипотентности они приобретают способность к адгезии, изменяют свои фенотипические, в том числе антигенные характеристики. Для реализации своего пролиферативного и дифференцировочного потенциала стволовым клеткам необходимо соответствующее микроокружение. Оно создается за счет вспомогательных клеток (макрофаги, лимфоциты, фибробласты, эндотелий и т. п.), которые обладают способностью как к прямому, так и к опосредованному контакту. В последнем случае речь идет о продукции необходимого количества ростовых и дифференцировочных факторов, цитокинов, молекул адгезии, циклинов и других биоактивных веществ, включая ФРСК, ЛИФ, ИЛ-3,6, КСФ,ТФР, ИПФР, коллаген, фибронектин, адгезии, гормоны и т. п. В настоящее время с помощью культуральных технологий удалось создать условия для выращивания ТПСК и ССК.

Большинство стволовых клеток способно к клонированию как в строго специализированные элементы, так и в гетерогенные, органные и организменные структуры. Под клоном подразумевают группу клеток, имеющих общего предка, а клетка, образующая клон, называется клоногенной (колоние- или кластеробразующей). Если группа клеток имеет одного общего предшественника и остается пространственно объединенной в виде колоний или кластеров, то она является «сцепленные» клоны. Если клетки пространственно разъединены, то – это «потомственными» клонами. Несколько сцепленных клонов, образующих пространственную структуру со сходным генотипом, могут агрегировать с образованием бляшки. Размеры клона свидетельствуют о способности клоногенной клетки к пролиферации и перемещению клеток в процессе роста.

Следует учесть, что выявленная эффективность клонирования не всегда отражает число клеток-предшественниц в исходном материале. Это связано с тем, что коммутированные клетки-предшественницы находятся на разных уровнях развития. Кроме того, нельзя исключить, что часть прекурсоров находится в невыгодных условиях роста. Тем не менее клональная техника с использованием современных морфометрических и математических методов позволяет получить ценную информацию о морфофункциональных характеристиках родоначальных клеток той или иной ткани.

8.2.2. Принципы проведения клеточной терапии с помощью стволовых клеток

XXI в. ознаменовался появлением принципиально нового подхода к восстановлению функций жизненно важных органов, заключающегося в использовании технологий генной, клеточной и тканевой инженерии. Достижения молекулярной и клеточной биологии составили основу принципиально новых биомедицинских технологий, с помощью которых становится возможным решение многих проблем восстановления поврежденных тканей и органов и лечения ряда тяжелых заболеваний человека. Успешное внедрение в практику экспериментальной биологии и медицины методов длительного культивирования клеток, в том числе клеток-предшественников специализированных тканей, создали предпосылки для разработки новых технологий заместительной клеточной и тканевой терапии и конструирования биоискусственных органов. Наиболее продвинутым в настоящее время является применение клеточных технологий в кардиологии для лечения инфаркта миокарда и восстановления кровотока в ишемизированных органах и тканях, повышения насосной функции сердца, а также лечения дислипидемий и атеросклероза. В неврологии трансплантационные клеточные технологии начали применять для лечения болезни Паркинсона и болезни Хантингтона. Имеются сообщения о положительном применении стволовых клеток костного мозга для заживления ожоговых и глубоких кожных ран, лечения системных и местных костных дефектов. В связи с выявленной противоопухолевой активностью низкодифференцированных кроветворных клеток и их способностью прямо супрессировать опухолевый рост начаты исследования и клинические применения клеток предшественников в онкологии.

Для проведения клеточной терапии того или иного заболевания необходимо ответить на ряд вопросов. В первую очередь, следует определить источник СК, затем оптимальные сроки их введения, количество, а также выбрать средство доставки. Источником СК могут быть собственные ткани, ткани взрослого донора, эмбриона, плаценты, а также оплодотворенная или реконструированная яйцеклетка. Анализируя экспериментальный материал, ряд авторов обнаружил, что с возрастом количество СК в тканях и органах постепенно уменьшается. В связи с этим фетальная ткань, включая самые ранние стадии развития эмбриона, хорион, желточный мешок, амнион, плаценту, терато-саркому, пуповинную кровь, остаются одними из наиболее перспективных биоматериалов для получения больших объемов СК, необходимых при проведении пластической и реконструктивной хирургии. При этом необходимо учитывать моральные, нравственные и правовые аспекты данной проблемы.

Различают срочную (аварийную) и плановую (системную) терапию СК. В первом случае решают вопросы, связанные с купированием остро развившегося критического состояния в тканях на фоне дефицита или полного отсутствия СК, например, при инсультах и инфарктах. Обычно при этих заболеваниях, несмотря на наличие всех необходимых компонентов (ростовых

факторов, цитокинов и др.) и вспомогательных клеток (лимфоцитов, макрофагов, эндотелия и т. п.), невозможно восстановить исходную ткань из-за отсутствия специализированных СК. В результате развиваются необратимые изменения, заканчивающиеся образованием рубцовой ткани и нарушением функции органа.

Трансплантация СК таким пациентам, как показали первые наблюдения, способствует реконструкции исходной ткани на 40–70 %.

Второй подход направлен на использование СК при восстановлении функции ткани, которая находится в стадии истощения или декомпенсации (инфаркт миокарда, сердечная недостаточность, аритмия, кардиопатия, цирроз, диабет, иммунодефициты, дистрофические процессы, старение и т. п.). При этом (в зависимости от тяжести состояния) сначала стимулируют регенерацию поврежденной ткани. Следует помнить, что если нарушено специфическое микроокружение органа, то начинают поэтапно осуществлять его восстановление, а затем трансплантируют СК. Если имеются глубокие системные повреждения, то необходимо избрать другую тактику и последовательно реконструировать иммунную, кроветворную, нейроэндокринную и другие системы макроорганизма. Обычно количество вводимых клеток не превышает 0,1–0,01 % от общей массы ткани, которую необходимо восстановить. Теоретически введение 1×10^6 СК с учетом 50 % их гибели способно реконструировать от 1 до 10 г специализированных клеток поврежденной ткани. Анализ литературных данных позволяет предположить, что ССК обладают способностью к хомингу в соответствующую их дифференцировочным потенциалом ткань. Ряд специалистов считают, что предпочтительнее использовать ССК, чем тотипотентные или полипотентные прекурсоры. При этом существенно снижается риск возникновения злокачественных и доброкачественных новообразований, тератом, изменения пути дифференцировки в нежелательном направлении (в частности, вместо мышечной ткани может образовываться костная) и включения механизмов апоптоза.

Многие вопросы, связанные с использованием СК, ССК и их аналогов, полученных генно-инженерными методами, в клинической практике уже решены. Так, разработаны технологии выделения, наработки, хранения и клинического использования данных клеток при лечении разнообразных заболеваний.

Однако ряд проблем остается на уровне теоретических разработок или экспериментов. Необходимо проведение серьезных фундаментальных исследований в данной области медицины в рамках программ по развитию высоких технологий в России. Выявленные закономерности станут основой для разработки оптимальных подходов для проведения клеточной хирургии. После всесторонних доклинических и клинических испытаний необходимо выработать адекватные протоколы (СТО) для конкретной ткани с последующим контролем качества материала, всех технологий, включая клиническое применение. Деятельность лаборатории и клиники должна быть соответствующим образом лицензирована, а продукты и технологии – сертифицированы в установленном порядке.

Однако следует помнить, что клеточная терапия с использованием СК и ССК не является панацеей от всех болезней и имеет строгие противопоказания. Применение донорского материала всегда несет потенциальный риск переноса скрытых инфекций, патогенных генов и возникновения РТПХ. Образующиеся химеры могут быть структурно и функционально неполноценными и приобретать новые, пока еще мало изученные свойства. В частности, при реконструкции нервной ткани существует риск нарушения работы мозга и его высшей психической деятельности. В связи с этим данный метод занимает особое положение среди других манипуляций. Его использование должно осуществляться по строгим показаниям, когда другие технологии бессильны спасти жизнь пациента, с учетом правовых, этических и иных аспектов.

8.2.3. Перспективы и этические проблемы применения стволовых клеток в реконструктивных технологиях

Нельзя не отметить, что в отношении применения и выделения стволовых клеток, особенно эмбриональных, все еще не прекращаются споры о том, могут ли использоваться «взрослые» стволовые клетки вместо клеток ES. Для вопроса, какой источник стволовых клеток предпочтителен, сегодня исчерпывающего ответа нет. В отношении оценки выбора и предпочтений «взрослых» или эмбриональных стволовых клеток, их стабильности, потенциала дифференцировки, а также рисков передачи вредных патогенов, генетических мутаций, неконтролируемой дифференцировки вплоть до злокачественных опухолей, сегодня не имеется доказательной базы, поэтому еще предстоит много и много исследовать и анализировать.

После создания методов генной инженерии, рекомбинантных технологий переноса ДНК между клетками разных видов, завершения программы «Геном человека», получения первых линий ЭСК человека возникла новая биоэтика фундаментальных процессов, стоящих у истоков индивидуальной жизни. Эти новые реальности биоэтики нашли отражение в документе ЮНЕСКО: «Биоэтика: международные аспекты» (октябрь, 2001). Документ резюмирует итоги многочисленных круглых столов по следующим стратегическим направлениям: а) эволюция базисных концепций и принципов биоэтики (достоинство, автономия, самоценность личности и прав с экстраполяцией на внутриутробный период развития человека); б) этика и научные исследования с клетками зародыша (предимплантационная диагностика заболеваний); в) использование геномных данных для диагностики и лечения (разработка новых биотехнологий получения зародышевых клеток); г) генетически модифицированные зародыши, клетки, линии ЭСК; д) донорство и пересадки зародышевых клеток, включая ЭСК; е) создание универсальных основ биоэтики и подготовка глобальных документов, регламентирующих деятельность ученых в этих областях биологии и медицины. В принятой ЮНЕСКО Универсальной декларации о геноме человека и правах человека

(1999 г.) в статье 11 говорится: «Практика, противоречащая человеческому достоинству, как репродуктивное клонирование человека, не разрешается. Государства и компетентные международные организации призываются начать кооперацию в идентификации злоупотреблений и разработке необходимых мер на государственном/межгосударственном уровне для выполнения принципов Декларации». При этом в следующей статье 12 Декларации постулируется: «Свобода научных исследований, необходимых для прогресса знаний, есть часть свободы мысли. Практическое приложение знаний генома человека должно быть направлено на уменьшение человеческих страданий, улучшения здоровья как индивидов, так и всего человечества». Разработки с геномом ЭСК есть часть этой общей стратегии.

В Германии закон запрещает получение ЭСК, но разрешает работать ученым с импортированными линиями ЭСК. В 2002 г. Германия и Франция выступили с инициативой в ООН относительно глобального моратория на эксперименты по репродуктивному и терапевтическому клонированию человека. В Швейцарии закон запрещает эксперименты с ранними зародышами, включая терапевтическое клонирование стволовых клеток из бластоцист. Во Франции разрешено работать с уже созданными ЭСК человека и получать новые линии с целью терапевтического клонирования органов и тканей больного человека. Запрещено репродукционное клонирование. В настоящее время Франция и Германия инициировали дискуссию в ООН о подготовке международной конвенции, запрещающей репродукционное и терапевтическое клонирование плюрипотентных клеток в обход полового процесса. В Израиле принят закон о временном пятилетнем моратории на репродуктивное клонирование. Закон не регламентирует исследования с ЭСК с целью терапевтического клонирования и создания банков клеток для трансплантации. В Великобритании, Бельгии и Швеции разрешены эксперименты с ЭСК для терапевтического клонирования клеток больного человека. Закон разрешил создание первого банка ЭСК. Разрешено создание и клонирование предимплантационных зародышей (до 14-го дня развития) для изолирования линий ЭСК. Репродукционное клонирование запрещено. Лицензии на работу с ранними зародышами и ЭСК выдаются специальной государственной комиссией. В Канаде пока не принято законодательство в отношении ЭСК и ранних зародышей. В Японии с июня 2001 г. действует закон о запрещении репродуктивного клонирования, но разрешены эксперименты с зародышами, остающимися после процедуры искусственного оплодотворения. Репродукционное клонирование наказывается 10 годами тюрьмы и штрафом 90 000 дол. США. Закон позволяет клонировать предимплантационные зародыши для выделения ЭСК и создания банков клеток для трансплантации на их основе. В США госфинансирование распространяется только на официально зарегистрированные линии ЭСК. Создавать или разрушать ранние зародыши запрещено. Две трети населения поддерживают те работы с ЭСК, которые направлены на лечение ныне живущих пациентов. В Индии и Китае активно ведутся исследования как по получению линий ЭСК человека, так и разработке получения ЭСК из других биоисточников (межвидовых клеточных

гибридов).

В России в первом чтении принят закон о временном (пятилетнем) моратории на репродуктивное клонирование, в том числе частными компаниями. Нет никаких нормативных ограничений на работы с ЭСК с целью терапевтического клонирования. Статус предимплантационных зародышей и внутриутробной жизни не имеет юридической нормы. Поэтому законодательство о правах человека не распространяется на эти стадии онтогенеза человека. Права зародышей могут защищаться только средствами биоэтики. Аналогично ситуация трактуется в Великобритании, где парламент разрешил клонирование ранних зародышей человека для получения ЭСК.

Биоэтика играет важную роль мягкого буфера, позволяющего развивать науку на максимальном приросте полезных знаний с минимальными ошибками и злоупотреблениями. Злоупотребления порождаются не наукой, а бизнесом вокруг науки.

Следует отметить, что имеющиеся сегодня на вооружении медиков варианты реконструктивной медицины (трансплантация; имплантация; тканевая инженерия) не свободны от ограничений и представляют собой компромисс. В каждом конкретном случае приходится принимать решение относительно того, какой вариант предпочтительнее использовать для пациента. Это решение принимают врач, пациент и родственники, зачастую в рамках ограниченных ресурсов. При этом возникают проблемы этического характера. По мере расширения спектра современных реконструктивных технологий в медицине все более затруднительным становится определять, какая из возможных альтернатив наиболее пригодна для конкретного случая. Как пишет в своем обзоре Хенч: «...прежде чем имплантаты и трансплантаты стали доступными, решение стоматолога или хирурга, а также пациента было простым. Если болит зуб, его удаляют. Если болит бедро, его пытаются заменить. Если остановилось сердце, наступает смерть. Одна проблема – одно решение».

Сегодняшняя медицина предлагает значительно больше альтернативных вариантов, не все из которых представляют одинаковую ценность с точки зрения риска, выгоды и стоимости. Поэтому наличие альтернативных вариантов создает неопределенности, этические и моральные дилеммы. Так, вероятность выхода из строя искусственного протеза (или органа) – создает существенные неопределенности в выборе стратегии лечения; возникает вопрос, лечить, например, больной сустав или заменить его протезом? В случае выбора варианта хирургической замены сустава бедра протезом всегда имеется вероятность того, что больной плохо перенесет (или вообще не перенесет) операцию, и что протез окажется «неудачным». Например, протезы бедра с огромным успехом имплантированы миллионам пациентов; однако существует и вероятность неудачи, требующая повторной операции, которая составляет около 3–5 % в течение первых 3–5 лет после имплантации и возрастает до 10–15 % по истечении 10–15 лет. Суммарный эффект этих неудач большой, например, из приблизительно 40 тыс. имплантаций бедра в год в Великобритании более 5 тыс. составляют повторные операции. Аналогич-

ная статистика существует для всех других имплантатов и трансплантатов, что приводит к неопределенности в вопросе, кто должен принимать решение относительно выбора приоритета.

Решения о необходимости пересадки донорских органов и порядке этих технологий в существенной степени зависят от ресурсов служб здравоохранения и платежеспособности пациентов. Это приводит к необходимости формирования списков пациентов, ожидающих операции по пересадке органа или плановые операции по их замене. Так, профессор Бил Бон Фильд, в свое время возглавлявший Международный исследовательский комитет по биоматериалам в Колледже королевы Марии Лондонского университета, как-то сказал: «Пациенту 90 лет, и это его пятый по счету вышедший из строя имплантат. Следует ли ему ставить шестой?» Таким образом, ситуация ставит перед хирургом, пациентом и медицинским учреждением этическую дилемму, поскольку имеются тысячи молодых пациентов, все еще ожидающих первой имплантации.

Уровень развития современного общества привел к существованию двух этических дилемм: 1) технократическое общество внушает людям желание жить долго. Однако ресурсы, необходимые для поддержания качества жизни, ограничены. Дисбаланс между бесконечными желаниями и имеющимися ресурсами создает острые этические дилеммы; 2) всем хочется жить долго. Дилемма заключается в том, как добиться баланса между *количеством* и *качеством* жизни.

Сегодня многие ситуации, связанные с использованием новых биоматериалов, искусственных органов и тканевой инженерии, носят неопределенный характер с точки зрения нравственной оценки. Примером может послужить ситуация с имплантатами марки «Bioglass®». Оказалось, что при использовании этих материалов и конструкций сложилась в разное время совершенно различная по качеству последствий ситуация. Первая ситуация – президент компании, обладающей правом на коммерциализацию технологии имплантации, собрал много миллионов долларов и вывел на рынок два изделия, принесшие пользу тысячам людей. Однако впоследствии он похитил у компании несколько миллионов долларов и был отправлен в федеральную исправительную колонию. Вторая ситуация – сотрудник другой компании, также получивший юридические права на коммерциализацию технологии «Bioglass®», ничего не похитил, но он не выпустил на рынок каких-либо изделий, из-за чего тысячи людей не смогли воспользоваться этой технологией. В корпоративной жизни этому человеку, тем не менее, сопутствовал успех. Третья ситуация – еще один человек разработал аналогичный биоактивный материал и использовал его для имплантатов; он продал свою компанию за несколько миллионов долларов, но через несколько лет большая часть имплантатов вышла из строя. Четвертая ситуация – человек вывел на рынок медицинский материал, клиническая безопасность и эффективность которого были подтверждены только в трех клинических случаях применения; уже в четвертом случае применения материал имплантата разрушился, вызвал сильную боль у тысяч пациентов, приведя к корпоративному банкротству

и огромным страданиям людей. Из этих четырех ситуаций как определить, кто был самым нравственным человеком? Однако на этот вопрос трудно ответить в силу существования больших неопределенностей.

Следующий возможный источник неопределенностей и рисков связан с наращиванием масштабов замены вышедших из строя органов и их элементов. Это приводит к тому, что количество случаев с отрицательными последствиями возрастает, это естественно, так как вероятность успеха в большой группе населения уменьшается при увеличении количества вариантов и случаев. Если имплантат выходит из строя, между пациентом и хирургом, госпиталем и производителем или всеми участниками процесса может возникнуть конфликт. Однако пациент, пожелавший поставить себе имплантат, был проинформирован о возможных рисках, и у него было получено обязательное в этом случае письменное согласие, то есть принцип уважения автономии пациента был соблюден. Однако возникает конфликт, так как у пациента может сложиться мнение, что в отношении его был нарушен принцип справедливости. Пациента и его родственников не интересует статистика, а также то, что 85 или 95 % аналогичных случаев, в которых применялось такое лечение, имели успешные результаты. Их беспокоит только то, что их случай оказался неудачным. Таким образом, конфликт будет связан с необоснованным ожиданием равных последствий действия вместо равного выполнения действия. Разница в результатах лечения по сравнению с ожиданиями может неверно восприниматься пациентом как несправедливость.

Каковы же причины необоснованных ожиданий успеха имплантата? Человеческая природа состоит в том, что человек хочет того же самого, что и другие. Это ожидание является питательной средой нашей рыночной экономики. То же самое справедливо для имплантатов. Люди узнают в средствах массовой информации, от своего врача или друзей о перспективности лечения с использованием имплантатов, при этом они думают только о том, что исчезнет источник боли и дискомфорта, и не задумываются о том, что любая операция – это риск и возможность выхода имплантата из строя. Это приводит к необоснованным ожиданиям и выводу в случае неудачи, что с человеком поступили несправедливо.

Развитие новых технологий и средств лечения усиливают проблему, так как новые разработки в области имплантатов рекламируются как превосходящие, даже когда нет долгосрочных данных для больших групп пациентов. Быстрое совершенствование реконструктивных технологий ведет к тому, что выбор становится все шире. Это приводит еще к одной ситуации, ведущей к неопределенности, способной породить конфликт. По мере того как все больше людей хотят поставить себе и действительно ставят имплантаты, потенциал для прибыли увеличивается пропорционально. Поскольку предоставляется все больше вариантов выбора, то становится все более вероятным, что изделие будет рекламироваться ради своей новизны и имиджа, а не ради статистически обоснованного совершенствования благодеяния на протяжении продолжительного периода использования. Нарастающее экономическое давление начинает диктовать внедрение новых имплантатов при минималь-

ных стандартах их испытаний только для того, чтобы предложить населению что-то новое. Круг исследований, необходимых для обеспечения долгосрочной надежности, зачастую исключается из процедуры тестирования нового изделия для того, чтобы оно быстрее попало на рынок. Таким образом, число имплантатов растет, при этом не гарантируется, что от применения всех их будет обязательная долговременная польза. Это приводит к удорожанию медицинских услуг в результате увеличения количества повторных операций.

Специфические этические проблемы по поводу биоматериалов и имплантатов заключаются в обязательности проведения полного комплекса испытаний во избежание возможных долгосрочных осложнений и повторных операций. Статистические данные, которые могут быть использованы для прогнозирования результатов лечения и последствия протезирования, должны составляться профессионалами для всех без исключения имплантатов на основании результатов всего комплекса необходимых, в том числе и долгосрочных испытаний. Пациенты должны быть проинформированы об ожидаемой пользе операции и возможных негативных последствиях. Это один из способов противодействовать ложно ожидаемым результатам.

Сегодня оптимальным представляется обеспечение успеха при имплантациях на уровне 85–95 %, стабильно сохраняемого в течение 10–20 лет. Этические принципы делают необходимым, чтобы все имплантаты и устройства отвечали высокому стандарту успеха, так как в противном случае может быть нарушен основополагающий принцип медицины «прежде всего не причинять вреда».

8.2.4. Процесс передачи новых биомедицинских материалов, устройств и технологий в клиническую практику

Необходимость внедрения новых медицинских технологий для увеличения продолжительности жизни пациентов и повышения качества лечения делает все более актуальной разработку новых материалов, усовершенствование конструкций устройств и технологий их применений. При этом все новые материалы, изделия и виды терапии должны быть проверены на безопасность, прежде чем они будут допущены в клинику. Для получения законодательного разрешения применения новых технологий и устройств в медицине необходимо пройти серию необходимых этапов. Процесс прохождения всех этапов до промышленного выпуска материалов и изделий и внедрение их в клинику называется *передачей технологии*.

На [рис. 8.1](#) в обобщенном виде представлены этапы, обязательные для успешной передачи технологии. Каждое направление передачи технологии имеет временные рамки, регулирующие последовательность шагов (этапов) процесса передачи технологии.

Успех продвижения новой технологии зависит от многих составляющих и, прежде всего, от организационно-правового процесса регулирования всех этапов прохождения разработки от стадии поисковых научных исследо-

ваний до маркетинговых исследований и выхода на рынок. В России еще предстоит создать условия и механизмы для эффективной разработки и коммерциализации биотехнологических разработок в области медицинского материаловедения, тканевой инженерии и конструирования биоискусственных органов. В США и странах ЕС – это уже сложившийся и регламентированный путь. Важно отметить, что передача технологии включает серию этапов, и каждый этап дает разный результат и выдвигает разные требования к бюджету и персоналу. Эффективная разработка нового изделия для здравоохранения требует выполнения многих этапов. Прибыльность часто зависит от времени и затрат, вложенных в каждый этап. Временные и финансовые затраты, связанные с этапами реализации технологии, суммируются и должны точно прогнозироваться и выполняться, если нужно, чтобы процесс передачи был успешным.

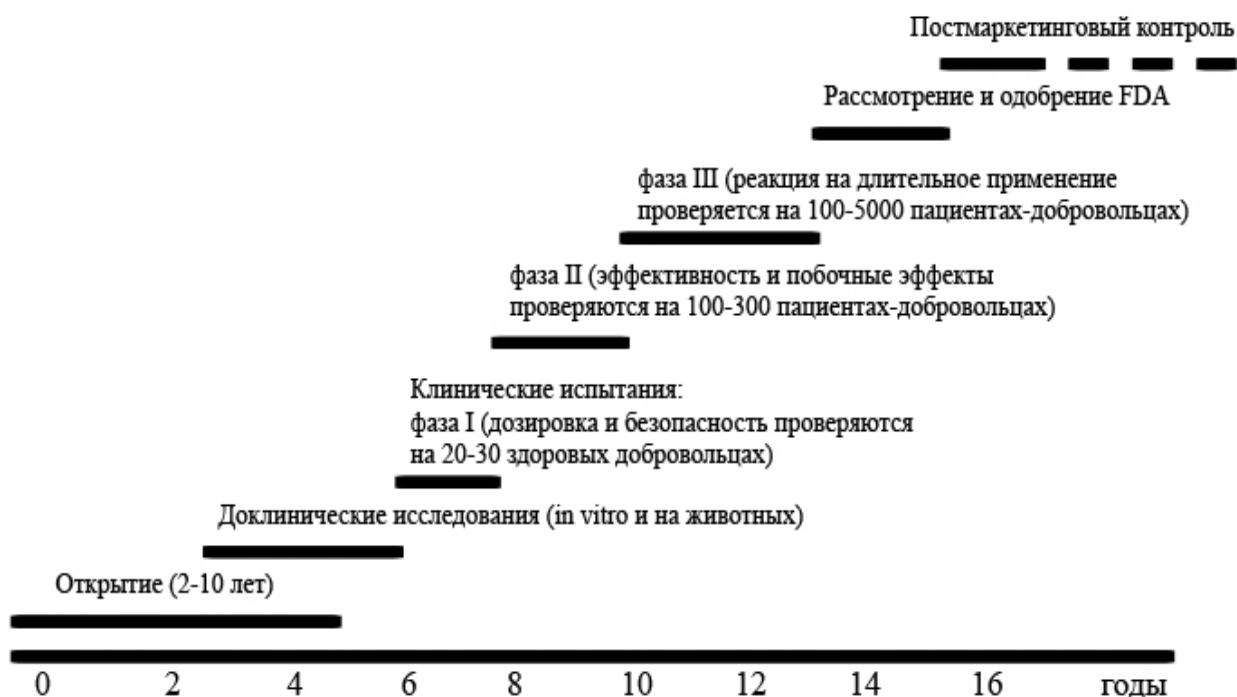


Рис. 8.1. Продолжительность и последовательность этапов процесса передачи технологии в США [1]

Движение к коммерциализации биотехнологической разработки состоит из серии последовательных этапов (рис. 8.2).

Исследовательское направление (2–10 лет) на практике зачастую бывает гораздо продолжительнее вследствие необходимости проведения испытаний новых материалов не только в системах *in vitro*, но и в опытах над животными. Результатами этого этапа могут быть не только научные публикации и диссертационные работы, но также и патенты.

Практика показывает, если есть возможность реализовывать одновременно все пять направлений, суммарное время, необходимое для успешного процесса передачи технологии, может составить 8–10 лет. Однако если приходится выполнять этапы последовательно, суммарное время почти удваива-

ется и доходит до 14–16 лет. Часто это происходит потому, что затраты, связанные с патентной защитой и демонстрацией технологии, обычно значительно больше затрат на исследования. При переходе от уровня исследований к последующим (патентование, маркетинг, демонстрация опытных образцов) в процесс принятия решений вовлекаются новые уровни управления; количество лиц, принимающих решения, увеличивается. Затраты на реализацию каждого последующего этапа возрастают, и при приближении к завершающим этапам процесса передачи технологии необходимые для этого объемы финансирования превосходят средства, которые выделяются университетами, фондами, мелкими компаниями. Критическим является переход от этапа 3 (маркетинговые исследования и оценка рынка) к этапу 4 (демонстрация технологии). На этом этапе потребность в финансировании возрастает на порядок. Помимо существенных финансовых затрат, переход на этот этап требует дополнительного персонала, управления, мощностей.

Как правило, средства, направленные на реализацию этапа демонстрации технологии, выделяются без завершения этапа маркетинга и бизнес-исследования. В маркетинге и бизнес-анализе предпринимается попытка прогноза соотношения затрат/доходов, необходимого капитала, размера рынка, времени выхода на рынок, процента проникновения на рынок, конкурентоспособности новой технологии, времени выполнения заказа по сравнению с конкурентами и т. д. Университетская и академическая наука не имеют персонала и опыта для проведения такого анализа. Для этого необходимо заключить лицензионное соглашение. Зачастую происходят задержки, потому средства редко выделяются для запуска этапа 3 до тех пор, пока не будут выданы патенты (конечная точка этапа 2 и пока не будут подписаны лицензионные соглашения), но на это нужны время и деньги.

Опыт реализации биомедицинских технологий показывает, что чем современней новая технология, тем труднее бывает провести маркетинговые и бизнес-оценки. Поэтому чем больше потенциал новой технологии, тем больше риск и дольше время, необходимое для принятия решения о том, что нужна поддержка для выхода на этап демонстрации технологии и проведения контроля качества продукта.

Переход от этапа 4 к этапу 5 (наращивание производства от уровня экспериментального до уровня производства) требует еще более серьезных вложений средств и оценок рынка. При этом важно знание объема производственной базы, необходимой для достижения прогнозируемых небольших доходов. Тем не менее при этом планируемая производительность производства должна быть сопоставимой с прогнозом продаж. Поэтому выделение прибыльных ниш на рынках в первые годы наращивания производства является ключевым требованием прогнозирования соотношения прибыли/риска для новой технологии. Большие корпорации обладают опытом и знаниями для того, чтобы выполнить такие оценки, но их большие накладные расходы приводят к раздуванию доходности, необходимой для успешной работы предприятия. Маленькие компании, наоборот, имеют низкие накладные расходы, но часто не обладают способностями точно оценить многочисленные факторы, действующие при переходе к промышленному этапу производства продукта.



Рис. 8.2. Этапы, необходимые для проведения полного цикла процесса передачи технологии

Среди факторов, позитивно влияющих на ускорение процесса передачи технологии, можно выделить такие:

- исследователи, отвечающие за создание технологии (этап 1) и патентование (этап 2) должны принимать участие в начальных этапах оценки рынка (этап 3), а также демонстрации технологии (этап 4);
- переходы между этапами 1–2–3 должны быть быстрыми и эффективными;
- лицензионные соглашения должны быть гибкими для того, чтобы обеспечивать быструю реализацию этапов 2, 3 и 4 одновременно, даже если информация по проведению оценки рынка (этап 3) является неполной;
- этапы с конкретными сроками реализации должны быть согласованы исследовательской командой, управленческой командой, командой маркетинга и разработки продукции, которые отвечают за этапы 3 и 4. Эти сроки должны быть согласованы вместе с бюджетами, в которые необходимо заложить материальные стимулы для того, чтобы обеспечить эффективность усилий по своевременному достижению целей;
- для реализации этапов 3 и 4 должен быть предусмотрен достаточный

объем финансовых средств, которые должны предоставляться по этапам; при этом увязывание бюджетов с результатами работы – это один из путей обеспечения того, что капитал будет ориентирован на конечные результаты направлений, а не на то, чтобы его тратили для продолжения исследований.

Одной из причин задержки процесса передачи технологии является продолжение выполнения исследований на этапе 1 при ограниченных ресурсах вместо перемещения программы на этапы 3 и 4. Это часто происходит в университетах и академических учреждениях, где продвижение по службе поощрения зависит от публикаций, что является основным конечным результатом этапа 1.

Если же технология создается внутри крупной коммерческой компании или корпорации, то обычно действует структура управления, принимающая решения и бюджеты для этапов 2, 3, 4 и 5. Этапы и сроки часто навязываются как часть требований к выполняемой работе участвующих команд. В отличие от этого подхода в условиях, когда технология создается внутри университета или государственной лаборатории, структура управления или бюджет для этапов 3 и 4 отсутствуют. В этом случае принцип состоит, как правило, в заключении лицензионного соглашения с компанией. Каждый этап процесса передачи технологии имеет разную степень риска, время и личные капиталовложения, связанные с ним.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Учебное пособие «Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии», включающее следующие разделы (модули): введение в предмет «Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии», материалы медико-биологического назначения, методы изучения материалов биомедицинского назначения, тканевая реакция на имплантаты, биоразрушаемые материалы и механизмы биодеструкции имплантатов, биология клетки в культуре, материалы для клеточных технологий и тканевой инженерии, специфика технологии ведения клеточных культур, новейшие клеточные технологии, охватывает ключевые разделы медицинского материаловедения и ориентированы на новейшие реконструктивные биотехнологии – клеточную и тканевую инженерию и конструирование биоискусственных органов.

Освоение теоретического материала пособия, разработанного для учебной дисциплины «Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии», в сочетании с приобретением экспериментальных навыков по современному материаловедению и технике ведения и исследования клеточных культур в рамках лабораторного практикума и учебного пособия, сопровождающих данную учебную дисциплину, имеют целью дать студентам знания научных основ биоматериаловедения; основных направлений производства, разработки и модификации новых биоматериалов; основ процессинга материалов для получения специализированных изделий; понятия биосовместимости и методов тестирования биологической безопасности материалов и изделий; научных основ технологий и потенциала клеточных культур; методологии инженерии органов и тканей.

В результате освоения этой дисциплины студенты приобретут знания научных основ биоматериаловедения; основных направлений производства, разработки и модификации новых биоматериалов; основ процессинга материалов для получения специализированных изделий; понятия биосовместимости и методов тестирования биологической безопасности материалов и изделий; научных основ технологий и потенциала клеточных культур; методологии инженерии органов и тканей и приобретут умения ориентироваться в современных направлениях и новейших методах биотехнологии (биомедицинском материаловедении, технологиях клеточных культур, тканевой инженерии и конструирования биоискусственных органов); использовать знания из новейших разделов биотехнологии при изучении специальных дисциплин; применять приобретенные знания для повышения качества жизни людей; использовать полученные данные при написании рефератов, статей, научных проектов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

К главе 1

1. Сайт ВОЗ. – Режим доступа: www.who.int/ru/index.html.
2. Севастьянов, В. И. Биоматериалы для искусственных органов / В. И. Севастьянов // Искусственные органы / под ред. В. И. Шумакова. – М. : Медицина, 1990. – С. 214–220.
3. Штильман, М. И. Полимеры медико-биологического назначения / М. И. Штильман. – М. : ИКЦ «Академкнига», 2006. – 400 с.
4. Chench L. The challenge of orthopaedic materials / L. Chench // Current Orthopaedics. – 2000. – Vol. 14. – P. 7–15.
5. Биосовместимость / под ред. В. И. Севастьянова. – М. : ИЦ ВНИИ геосистем, 1999. – 368 с.
6. Ratner, B.D. New ideas in biomaterials science – a path to engineered biomaterials / B. D. Ratner // J. Biomed. Mater. Res. – 1993. – V. 27, N.7. – P. 837–850.
7. International Standart ISO 10993-1. Biological evaluation of medical devices. Reproduced By Global Engineering Documents With The Permission of ISO Under Royalty Agreement.
8. Сборник руководящих методических материалов по токсиколого-гигиеническим исследованиям полимерных материалов и изделий на их основе медицинского назначения / под ред. Э. А. Бабаяна [и др.]. – М. : Минздрав СССР, 1987. – 96 с.
9. Сборник методических рекомендаций по оценке биосовместимых свойств искусственных материалов, контактирующих с кровью / под ред. Н. Б. Добровой [и др.]. – М. : ВНИТИПРИБОР, 1991. – 70 с.
10. Волова, Т. Г. Полиоксикалкоаноаты-биоразрушаемые полимеры для медицины / Т. Г. Волова, В. И. Севастьянов, Е. И. Шишацкая; под ред. акад. В. И. Шумакова. – Красноярск : Изд-во «Платина», 2006. – 36 п. л.
11. Хенч, Л. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей / Л. Хенч, Д. Джонс. – М. : Техносфера. – 2007. – С. 305. (Серия «Мир биологии и медицины»)

К главе 2

1. Миней, Е. Дж. Металлы / Е. Дж. Миней, А. Р. Бокаччини // Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей / Л. Хенч, Д. Джонс. – М.: Техносфера, 2007. – С. 22–33. (Серия «Мир биологии и медицины»)
2. Davidge, R. W. Mechanical Behaviour of Ceramic / R. W. Davidge. – Cambridge : Cambridge Univ. Press. UK, 1979.
3. Фалалеев, О. В. Исследование молекулярной структуры и физико-

- химических свойств свойств полиоксибутирата / О. В. Фалалеев, Т. Г. Волова, А. Д. Васильев // Доклады РАН. – 1994. – Т. 337. – С. 813–817.
4. Биосовместимость / под ред. В. И. Севастьянова. – М. : ИЦ ВНИИ геосистем, 1999. – 368 с.
5. Севастьянов, В. И. Методология отбора гемосовместимых материалов в условиях *in vitro* для искусственных органов / В. И. Севастьянов [и др.] // Медицинская техника. – 1990. – № 4. – С. 26–29.
6. Штильман, М. И. Полимеры медико-биологического назначения / М. И. Штильман. – М. : ИКЦ «Академкнига», 2006. – 400 с.
7. Штильман, М. И. Имплантаты в сердечно-сосудистой хирургии / М. И. Штильман // Полимеры медико-биологического назначения. – М. : ИКЦ «Академкнига», 2006. – С. 85.
8. Carroccio, A. Endovascular Syent Garfting of Thoracic Aortic Aneurysms / A. Carroccio, S. Ellozy, D. Spielvogel // Dev. Endovasc. Endoscop. Surgery. – 2003. – V. 17. – P. 473–478.
9. Левер, М. Д. Системы сердечно-сосудистой стимуляции / М. Д. Левер // Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей / Л. Хенч, Д. Джонс. – М. : Техносфера, 2007. – С. 199–212. (Серия «Мир биологии и медицины»)
10. Сосудистое и внутриорганное стентирование : руководство / под ред. Л. С. Кокова [и др.]. – М. : Издательский Дом «Грааль», 2003. – 366 с.
11. Хенч, Л. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей / Л. Хенч, Д. Джонс. – М. : Техносфера. – 2007. – С. 211. (Серия «Мир биологии и медицины»)
12. Информация сайта фирмы «Линтекс». – Режим доступа: www.lintex.ru/index.php.
13. Хенч, Л. Замена суставов / Л. Хенч // Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей / Л. Хенч, Д. Джонс. – М. : Техносфера, 2007. – С. 147. (Серия «Мир биологии и медицины»)
14. Web-site of Endo Plus. Ltd. – Режим доступа: www.endoplus.co.uk/products/hip-primary.htm.
15. Штильман, М. И. Проспект НИИ конструкционных материалов на основе графита / М. И. Штильман // Полимеры медико-биологического назначения. – М. : ИКЦ «Академкнига», 2006. – С. 143.
16. Rokkanen P. V. Bioabsorbable fixation in orthopaedic surgery and traumatology / P. V. Rokkanen, O. Bostman, E. Hirvensalo // Biomaterials. – 2000 – Vol. 21, № 24. – P. 2607–2613.
17. Kramp, B. PHV-Folien und –Platten zur Defektdeckung des knochernen Schadels im Kaninchenmodell / B. Kramp [et al.] // Laryngo-Rhino-Otol. – 2002. – Vol. 81. – P. 351–356.
18. Shikinami, Y. Bioresorbable devices made of forged composites of hydroxyapatite (HA) particles and poly-L-lactide (PLLA): Part I. Basic characteristics / Y. Shikinami, M. Okuno // Biomaterials. – 1999. – Vol. 20. – P. 859–877.
19. Штильман, М. И. Полимерные имплантаты в офтальмологии / М. И. Штильман // Полимеры медико-биологического назначения. – М. :

ИКЦ «Академкнига», 2006. – С. 225.

20. Джоунс, Р. Искусственные органы / Джоунс Р. // Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей / Л. Хенч, Д. Джонс. – М. : Техносфера, 2007. – С. 158–170. (Серия «Мир биологии и медицины»).

21. Толпекин, В. У. Трансплантология / В. У. Толпекин [и др.]; под ред. В. И. Шумакова. – М. : Медицина, 1995. – С. 160–180.

22. Pişkin E. Biomaterials in different forms for tissue engineering / E. Pişkin // Porous materials for tissue engineering / Dean-Mo Liu, Vivek Dixit Eds. – Materials Science Forum. – 1997. – V. 250. – P. 1–14.

23. Ratner, B. D. Contemporary methods for characterizing complex biomaterials / B. D. Ratner, A. Chikoti, D. G. Castner // Clin. Materials. – 1992. – V. 11. – P. 25–36.

24. Волова, Т. Г. Полиоксиалканоаты-биоразрушаемые полимеры для медицины / Т. Г. Волова, В. И. Севастьянов, Е. И. Шишацкая; под ред. акад. В. И. Шумакова. – Красноярск : Изд-во «Платина», 2006. – 36 п. л.

К главе 3

1. Биосовместимость / под ред. В. И. Севастьянова. – М. : ИЦ ВНИИ геосистем, 1999. – 368 с.

2. Томсон, Я. Биоконпозиты / Я. Томсон // Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей / Л. Хенч, Д. Джонс. – М.: Техносфера, 2007. – С. 58–70. (Серия «Мир биологии и медицины»).

3. Бурдик, Я. А. Биомедицинские гидрогели / Я. А. Бурдик // Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей / Л. Хенч, Д. Джонс. – М. : Техносфера, 2007. – С. 123–132. (Серия «Мир биологии и медицины»)

4. Волова, Т. Г. Полиоксиалканоаты-биоразрушаемые полимеры для медицины / Т. Г. Волова, В. И. Севастьянов, Е. И. Шишацкая; под ред. акад. В. И. Шумакова. – Красноярск : Изд-во «Платина», 2006. – 36 п. л.

К главе 4

1. Сакураи, Я. Взаимодействие полимеров медицинского назначения с живым организмом. Введение в биоматериаловедение / Я. Сакураи, Т. Акаикэ // Полимеры медицинского назначения / под ред. С. Манабу. – М. : Медицина, 1981. – С. 194–243.

2. Серов, В. В. Соединительная ткань / В. В. Серов, А. Б Шехтер. – М. : Медицина, 1981. – 310с.

3. Шишацкая, Е. И. Реакция тканей на имплантацию биодеструктивных шовных нитей на основе полиоксиалканоатов / Е. И. Шишацкая [и др.] // Медицинская техника. – 2002. – № 4. – С. 23–29.

4. Штильман, М. И. Полимеры медико-биологического назначения /

М. И. Штильман. – М. : ИКЦ «Академкнига», 2006. – 400 с.

5. Биосовместимость / под ред. В. И. Севастьянова. – М. : ИЦ ВНИИ геосистем, 1999. – 368 с.

6. Розанова, И. Б. Биодеструкция имплантатов / И. Б. Розанова // Биосовместимость / под ред В. И. Севастьянова – М. : ИЦ ВНИИ, 1999. – С. 212–242.

К главе 5

1. Биосовместимость / под ред. В. И. Севастьянова. – М. : ИЦ ВНИИ геосистем, 1999. – 368 с.

2. Биодegradация полиоксиалканоатов в биологических средах. Перспективные материалы / Е. И. Шишацкая [и др.] – 2002. – № 2. – С. 57–62.

3. Шишацкая, Е. И. Об участии макрофагов и реакции фосфомоноэстераз в ответе тканей на имплантацию полиоксиалканоатов / Е. И. Шишацкая, Т. Г. Волова, И. И. Гительзон // Доклады РАН. – 2002. – Т. 383. – С. 702–705.

4. Волова, Т. Г. Полиоксиалканоаты-биоразрушаемые полимеры для медицины / Т. Г. Волова, В. И. Севастьянов, Е. И. Шишацкая; под ред. акад. В. И. Шумакова. – Красноярск : Изд-во «Платина», 2006. – 36 п. л.

К главе 6

1. Селвакумаран, Д. Основы культивирования клеток и использование клеточных культур для производства биоматериалов и инжиниринга тканей / Д. Селвакумаран, Г. Джелл // Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей / Л. Хенч, Д. Джонс. – М. : Техносфера, 2007. – С. 244. (Серия «Мир биологии и медицины»).

2. Ueda, H. Polyhydroxyalkanoate derivatives in current clinical applications and trials / H. Ueda, Y. Tabata // Adv. Drug Deliv. Rev, 2003. – V. 55. – P. 501–518.

3. Буттери, Л. Введение в инжиниринг тканей / Л. Буттери, Э. Бишон // Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей / Л. Хенч, Д. Джонс. – М. : Техносфера, 2007. – С. 214–222. (Серия «Мир биологии и медицины»).

4. Фрешни, Р. Культура животных клеток : методы / Р. Фрешни – М. : Мир, 1991.

5. Адамс, Р. Методы культуры клеток / Р. Адамс. – М. : Мир, 1983.

6. Репин, В. С. Эмбриональные стволовые клетки : фундаментальная биология и медицина / В. С. Репин, А. А. Ржанинова, Д. А. Шаменков. – М. : «Реметэкс», 2002.

7. Биотехнология : принципы и применения / под ред. И. Хиггинса, Д. Беста и И. Дж. Джонса. – М. : Мир, 1988.

8. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002.

9. Введение в методы культуры клеток, биоинженерия органов и тканей / под ред. В. В. Новицкого, В. П. Шахова, И. А. Хлусова, Г. Ц. Дамбаева. – Томск, 2004. – 385 с.

К главе 7

1. Буттери, Л. Введение в инжиниринг тканей / Л. Буттери, Э. Бишон // Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей / Л. Хенч, Д. Джонс. – М. : Техносфера, 2007. – С.214–222. (Серия «Мир биологии и медицины»)

2. Фрешни, Р. Культура животных клеток : методы / Р. Фрешни – М. : Мир, 1991.

3. Адамс, Р. Методы культуры клеток / Р. Адамс. – М. : Мир, 1983.

4. Репин, В. С. Эмбриональные стволовые клетки : фундаментальная биология и медицина / В. С. Репин, А. А. Ржанинова, Д. А. Шаменков. – М. : «Реметэкс», 2002.

5. Биотехнология: принципы и применения / под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, И. Дж. Джонса. – М. : Мир, 1988.

6. Волова, Т. Г. Полиоксикалкоаноаты-биоразрушаемые полимеры для медицины / Т. Г. Волова, В. И. Севастьянов, Е. И. Шишацкая; под ред. акад. В. И. Шумакова. – Красноярск : Изд-во «Платина», 2006. – 36 п. л.

К главе 8

1. BioWorld – Режим доступа: <http://www.cbio.ru>.

2. Хенч, Л. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей / Л. Хенч, Д. Джонс. – М. : Техносфера, 2007. – 305 с. (Серия «Мир биологии и медицины»)

3. Штильман, М. И. Полимеры медико-биологического назначения / М. И. Штильман. – М. : ИКЦ «Академкнига», 2006. – 400 с.

4. Репин, С. В. Медицинская клеточная биология / С. В. Репин, Г. Т. Сухих. – М., 1998.

5. Репин, В. С. Эмбриональные стволовые клетки : фундаментальная биология и медицина / В. С. Репин, А. А. Ржанинова, Д. А. Шаменков. – М. : «Реметэкс», 2002.

