Journal of Siberian Federal University. Biology 1 (2016 9) 21-32
~ ~ ~

УДК 615.462

Biodegradation of PHA *in vivo*

Ekaterina I. Shishatskaya*
Institute of Biophysics of SB RAS
50/50 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia

Received 21.11.2015, received in revised form 24.01.2016, accepted 07.03.2016

The present review summarizes the literature data on the degradation dynamics of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in vivo and the authors' results obtained over a more than ten years of research, which included implantation of experimental polymer items shaped as microparticles, films, filaments, and 3D constructs subcutaneously, intramuscularly, and into internal organs of animals for long periods of time. The study shows that PHA degradation is determined by the chemical structure of the polymer, the shape of the implant, and implantation site; PHA degradation is slow, occurring via humoral and cellular pathways, usually beginning on the surface of the implants, with no local defects developing or strength decreasing dramatically. PHA biodegradation involves macrophages and foreign body giant cells. PHA products are resistant to the effects of biological media and are capable of functioning in vivo for between several months and one year or longer.

Keywords: biopolymers, polyhydroxyalkanoates, PHAs, implants, degradation in vivo.

DOI: 10.17516/1997-1389-2015-9-1-21-32.

Биодеградация ПГА *in vivo*

Е.И. Шишацкая
Институт биофизики СО РАН
Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50

В представленном обзоре обобщены литературные данные по динамике разрушения полигидроксиалканоатов (ПГА) in vivo и собственные результаты авторов, полученные за период исследований более десяти лет в экспериментах с имплантацией животным полимерных изделий в виде микрочастиц, пленок, нитей и 3D-форм на длительные сроки, достаточные для определения периодов полуразрушения имплантатов. В биодеградации ПГА наиболее значима роль макрофагальных иммунокомпетентных клеток фагоцитирующего

© Siberian Federal University. All rights reserved
* Corresponding author E-mail address: shishatskaya@inbox.ru

типа с высокой ферментативной активностью; тканевая реакция на ПГА всегда с присутствием гигантских клеток инородных тел, но без значимого местного воспаления и полной инволюцией реактивных явлений на имплантаты. Показано, что характер и скорость биодеградации ПГА зависят от их химической структуры, формы и массы изделия, а также структуры поверхности и места имплантации. Разрушение происходит медленно (в сравнении с другими биополимерными разрушаемыми имплантируемыми материалами) и без резкого падения прочностных свойств изделий, на начальных этапах главным образом с поверхности изделий, и последующим постепенным разрушением всего имплантата, сопровождающимся замещением на дифференцированную ткань. Изделия из ПГА устойчивы к воздействию биологических сред и пригодны для функционирования in vivo в течение периода от нескольких месяцев до года и более.

Ключевые слова: биополимеры, полигидроксиалканоаты, ПГА, имплантаты, разрушаемость in vivo.

Введение

До недавнего времени процесс биодеградации полигидроксиалканоатов (ПГА) в биологических средах оставался малоизученным. Вместе с тем вопросы о механизме и кинетике биорезорбции материалов в организме являются очень важными для применения саморазрушающихся изделий в медицине (Штильман, 2006; Хенч, Джонс, 2007). Саморазрушающиеся медицинские материалы и изделия должны не только быть абсолютно безвредными для организма, но также иметь необходимые механофизические характеристики. При этом скорость биодеструкции материала *in vivo* должна соответствовать скорости регенерации тканей. Поэтому важнейшим моментом для применения биодеструктивных имплантатов является знание механизма и кинетики биодеструкции конкретного материала в конкретных условиях внутренней среды организма.

Опубликованные результаты изучения деградации ПГА *in vivo* до недавнего времени были весьма фрагментарными. В одной из первых работ этого направления биодеградация поли-3-гидроксибутирата (П(3ГБ)) и его сополимеров с 3-гидроксивалератом (П(3ГБ)/3ГВ) в виде таблетированных форм исследована *in vivo* в середине 1980-х гг. (Korsatko et al., 1984; Korsatko-Wabnegg, Korsatko, 1990). Показана стабильность *in vivo* моножильных нитей, изготовленных из П(3ГБ) и сополимеров П(3ГБ)/3ГВ, в течение 6 месяцев (Miller, Williams, 1987). У авторов другой работы этого периода, напротив, деструкция пленочных образцов П(3ГБ) зафиксирована уже спустя 2 недели после имплантации, а через год исследователям удалось обнаружить только маленькие фрагменты полимерных имплантатов (Beumer et al., 1978). В ряде работ показано, что в течение года масса пленочных образцов ПГА и иных конструкций может уменьшиться существенно, от 30 до 80 % от исходной (Lukinska et al., 1997).

В целом, было установлено, что биодеградация двух типов ПГА – П(3ГБ) и П(3ГБ)/3ГВ – происходит *in vivo* очень медленно (Hasirci, 2000). Как правило, поли-3-гидроксибутират полностью абсорбируется *in vivo* за 24-30 месяцев (Malm et al., 1992; Hazari et al., 1999). В ходе имплантации П(3ГБ) и П(3ГБ)/3ГВ внутрибрюшинно мышам зарегистрирована

их деградация с разными скоростями в зависимости от состава материала (Gogolewski et al., 1993a, b). При подкожной имплантации крысам пленок из ПГА убыль массы за 10 недель составила от 50 до 100 % от исходной. В серии более поздних работ была исследована биодеградация различных конструкций из ПГА при имплантации лабораторным животным на длительные сроки (Lukinska et al., 1997; Shum-Tim et al., 1999; Stock et al., 2000; Korkusuz et al., 2001) и показано, что все имплантаты, несмотря на отмеченную биодеструкцию, выполняли свои функции в течение всего периода наблюдения (от 6 месяцев до 2,5 лет). Остаточная масса изделий в экспериментах на животных была различной (от 40 до 90 % от исходной). Более детальных, а также обобщающих работ по исследованию закономерностей биоразрушаемости имплантатов из ПГА *in vivo* в доступной литературе не имеется.

Довольно большой массив данных о биоразрушаемости ПГА в виде пленок, микрочастиц, 3D-форм, шовных нитей, имплантированных на длительные сроки подкожно, внутримышечно, внутриорганно, получен сотрудниками Института биофизики СО РАН и Сибирского федерального университета в течение 2000-2015 гг. (Шишацкая с соавт., 2002, 2009, 2012; Volova et al., 2003, 2014; Shishatskaya et al., 2002, 2004 a, b, 2005, 2006, 2011, 2014). Эти данные обобщены в представленной статье.

Результаты изучения биодеградации ПГА *in vivo* в Институте биофизики СО РАН и Сибирском федеральном университете

Экспериментальные образцы изделий из ПГА различной химической структуры и различной формы были имплантированы лабораторным животным на длительные сроки подкожно, внутримышечно, внутриорганно. В ходе экспериментов исследовали местную реакцию тканей на имплантаты в зависимости от типа и места имплантации, а также отслеживали физическое состояние имплантатов для определения возможных сроков функционирования *in vivo* без существенного разрушения.

Биодеградация ПГА в виде микрочастиц

Разработка систем контролируемой доставки лекарственных средств (в англоязычной литературе “drug delivery control systems”) – перспективное и быстро развивающееся направление в фармакологии. При этом наиболее перспективными считаются лекарственные долговременные системы в виде биодеградируемых микросфер, которые могут быть введены инъекцией в кровоток, подкожно или внутримышечно, а также адаптированы для орального применения или в виде ингаляций. Однако при введении микросфер (подкожно или внутримышечно) в силу высокой развитости поверхности при малом объеме биоматериала затрагивается большая зона, что может вызвать интенсивный тканевой ответ. В отношении ПГА, несмотря на имеющиеся сообщения перспектив их использования для микроинкапсулирования различных лекарственных препаратов, вопрос о биосовместимости и «времени жизни» полимерных микрочастиц *in vivo* в доступной литературе не был освещен. В работах (Shishatskaya et al., 2008, 2011) впервые исследована реакция тканей, длительность функционирования, а также локализация продуктов деградации ПГА при имплантации полимерных микрочастиц внутримышечно и при введении в кровоток.

Микрочастицы, полученные из П(3ГБ), были введены внутримышечно в бедренную мышцу крысам Вистар. Микроскопическая

картина в месте введения полимерных микрочастиц изменялась в ходе эксперимента, и изменения касались как реакции тканей на введение микрочастиц, так и среднего диаметра и количества микросфер, а также их целостности. Спустя 2 недели в тканях в месте введения микрочастиц зафиксировано присутствие моноядерных макрофагальных клеток секреторно-фагацитарного типа, а также наличие единичных гигантских клеток инородных тел (ГКИТ) с 2-3 ядрами. В эти сроки в кластере имплантированных микросфер количество крупных (свыше 10-15 мкм) частиц значительно сократилось и не превышало 14 % в поле зрения. С увеличением длительности наблюдения отмечено нарастание макрофагальной активности. Спустя 5 недель наблюдали увеличение моно- и полиядерных макрофагальных клеток на фоне сокращения фракции крупных частиц до 4-5 % от общего числа в поле зрения, что свидетельствует о протекании процесса разрушения полимерного матрикса частиц. Вокруг крупных микросфер (диаметром более 10 мкм) зафиксировано скопление ГКИТ с 6-8 ядрами. В сроки 7-9 недель на фоне увеличения общей численности ГКИТ отмечен рост количества ядер в них. Спустя 11-12 недель по-прежнему характерной реакцией тканей было наличие выраженной макрофагальной инфильтрации с большим количеством полиядерных ГКИТ, окружающих полимерные частицы или сгруппированных вокруг кластера мелких микрочастиц; наличествовали достаточно крупные симпласты ГКИТ с 10-12 и более ядрами. В отдельных зонах кластера микросфер присутствовал полимерный детрит как продукт разрушения более крупных частиц. Однако в целом в течение достаточно длительного периода наблюдения большинство неразрушенных микросфер присутствовало в тканях, что свидетельствует о достаточно длительном процессе биорезорбции микрочастиц *in vivo*, несмотря на их малые размеры, что говорит о возможности использования поли-3-гидроксибутирата для создания долговременной лекарственной формы, предназначенной для внутримышечного введения (Shishatskaya et al., 2008).

Далее были исследованы последствия введения микрочастиц в кровоток животных, включая оценку динамики распределения частиц во внутренних органах и реакцию тканей на это введение, а также закономерности биоразрушения полимерного матрикса *in vivo* (Шишацкая и др., 2009; Shishatskaya et al., 2011). Подобное исследование стало возможным в связи с тем, что ранее была доказана возможность получения высокоочищенных образцов ПГА, пригодных для контакта с кровью (Sevastianov et al., 2003).

Для получения частиц, предназначенных для внутривенного введения, использовали меченный по ^{14}C П(3ГБ). Экспериментальным животным вводили в хвостовую вену стерильную суспензию микросфер с исходной радиоактивностью 6050 имп/мин/мг частиц. Спустя 3 ч после введения микрочастиц в кровоток животным и далее еженедельно содержание радиоактивного углерода анализировали в сердце, легких, печени, почках, селезенке без учета радиоактивности мягких и твердых тканей животных, а также выделяемых продуктов обмена, поэтому часть потока меченого углерода оставалась неучтенной.

Для изучения динамики разрушения полимерного матрикса частиц *in vivo* проведены специальные исследования, которые, помимо регистрации динамики радиоактивности тканей, включали хроматографические исследования остаточного содержания полимера в органах, а также измерения молекулярной массы полимера, выделенного из тканей на различных сроках наблюдения. Это позволило

впервые определить концентрацию в органах неразрушенного поли-3-гидроксибутирата в разные сроки наблюдения. Через неделю после введения микрочастиц в кровоток животным наибольшее содержание полимера зарегистрировано в сердце и легких, на порядок ниже – в печени и на 2 порядка ниже – в тканях селезенки и почек. Спустя 8 недель отмечено резкое падение содержания П(3ГБ) для тканей сердца и легких. В конце эксперимента (12 недель от момента введения микрочастиц в кровоток) остаточное содержание полимера в тканях всех органов сравнялось и было на уровне 4–8 × 10^{-4} мг/г для частиц с $M_в$ ПЗГБ 289 000 кДа и 12-19 × 10^{-4} мг/г – для микрочастиц с величиной $M_в$ ПЗГБ 693 кДа. Обнаруженное низкое содержание остаточного высокомолекулярного (неразрушенного) П(3ГБ) в тканях органов, в особенности в печени и селезенке, на фоне зарегистрированной высокой радиоактивности этих тканей позволило предположить высокую интенсивность разрушения полимера в этих органах. Самое высокое содержание мономеров через неделю после введения микрочастиц установлено в тканях сердца и легких, где оно было более чем в 2 раза выше по сравнению с тканями печени и селезенки. Наименьшее содержание мономера было в тканях почек. Спустя 8 недель этот показатель для сердца и легких уменьшился практически на порядок. Еще через 4 недели в легких и в печени измеряемая величина уменьшилась практически в 30 раз, в сердце – в 20 раз, в селезенке еще значительнее – в 45 раз, минимальное снижение зарегистрировано в почках – в 6 раз. В ходе эксперимента зафиксировано падение молекулярной массы полимера во всех органах. Уже спустя 3 ч в большинстве органов отмечено снижение величины $M_в$ у выделенного полимера, что свидетельствует о разрушении полимерных цепей. Наибольшее падение $M_в$ зарегистрировано в селезенке – 53 % от исходного значения; далее в печени – 43 % и сердце – 38 %, при практически неизменности показателя в легких как наименее активном для метаболизма П(3ГБ) органе. Через 2 недели падение молекулярной массы П(3ГБ) матрикса микрочастиц достигло 70 % и более от исходной величины в тканях печени, почек, сердца и селезенки и менее значительно (на 49 %) – в легких. На более поздних сроках, спустя 12 недель после введения частиц, остаточная величина молекулярной массы полимера микрочастиц, экстрагированного из всех органов, не превышала 23–27 % от исходной величины. Показатель полидисперсности полимера микрочастиц в ходе эксперимента снизился в среднем в 2 раза при сравнении с исходными значениями. Это является свидетельством того, что полимерный матрикс становится более однородным, возможно, в результате вымывания из него низкомолекулярных фрагментов.

В целом, обнаруженное в тканях присутствие высокомолекулярного (неразрушенного) полимера на сроке до 12 недель свидетельствует о длительности процесса разрушения П(3ГБ) в тканях внутренних органов и, следовательно, о возможности длительного функционирования микрочастиц как средства доставки лекарственных препаратов.

Биодеградация ПГА в виде пленок

В работе (Шишацкая с соавт., 2012; Shishatskaya et al., 2014) выполнено исследование биоразрушения пленочных образцов ПГА в сопоставлении с полимолочной кислотой. Образцы, изготовленные из растворов ПГА различного химического состава размером 10 × 10 мм и толщиной 0,05-0,08 мм, были имплантированы подкожно крысам линии Вистар. Распределение животных по группам было следующим: четыре экспери-

ментальные (матриксы из ПГА различного химического состава: П(3ГБ) и сополимеры П(3ГБ)/4ГБ, П(3ГБ)/3ГВ, П(3ГБ)/3ГГ) и пятая группа – контроль (матрикс из полилактида). Образцы размещали под кожу спины, по три образца с каждой стороны. Реакция тканей на оперативное вмешательство и последующую имплантацию полимерных пленок в общих чертах протекала по схеме, характерной для раневого процесса и реакции на инородное тело, включая стадии травматического воспаления, новообразования соединительной ткани, формирования и перестройки рубца. На 10-е сутки после операции вокруг имплантированных пленок отмечено начало формирования фиброзной капсулы; выражена макрофагально-фибробластическая инфильтрация; признаков разрушения пленок не обнаружено. Через 30 суток после имплантации вокруг матриксов всех типов сформировались тонкие фиброзные капсулы, для которых было характерным наличие небольшого количества макрофагов и фибробластов, располагающихся на внутренней поверхности на границе с пленкой; определены единичные ГКИТ, лежащие в толще внутренней поверхности капсулы. Отмечается незначительная эрозия имплантатов, более выраженная в образцах из П(3ГБ)/4ГБ. Спустя 60 суток капсулы стали тоньше, а количество инфильтрирующих клеток значительно меньше, чем на сроке 30 суток; обнаружены морфологические изменения в структуре имплантатов. Повреждения в виде трещин в толще матриксов и вакуолизация были наиболее выражены для сополимерных пленок из П(3ГБ)/4ГБ и П(3ГБ)/3ГГ. Спустя 180 суток вокруг имплантатов по-прежнему отмечается высокое содержание макрофагальных клеток. За исключением пленок из П3ГБ, практически все имплантаты сильно разрушены и дефрагментированы. Имплантаты из П(3ГБ)/3ГГ и П(3ГБ)/4ГБ были представлены мелкими фрагментами исходных пленок.

В количественном выражении биодеградация сополимеров П(3ГБ)/3ГГ и П(3ГБ)/4ГБ выглядит следующим образом: через 30 суток остаточная масса составила 75-80 % от исходной; через 90 суток – 20 и 33 %; к концу эксперимента (180 суток) – соответственно 10 и 20 %. Разрушение пленок из сополимеров П(3ГБ)/3ГВ происходило медленнее по сравнению с вышеописанными сополимерами. Так, через 90 суток их остаточная масса составила порядка 40 %, а через 180 суток – 30–35 % от исходной. Таким образом, в исследованных условиях при подкожной имплантации тонких пленочных образцов по разрушаемости исследуемые имплантаты из ПГА находятся в ряду: П(3ГБ)/3ГГ – П(3ГБ)/4ГБ – П(3ГБ)/3ГВ – П(3ГБ).

У всех типов имплантатов в ходе эксперимента происходило снижение молекулярной массы. Наиболее значительно и на ранних сроках величина $M_в$ уменьшилась у образцов сополимера П(3ГБ)/4ГБ, составив через 30 суток 58 % от исходной величины и 22 % – через 180 суток. Уменьшение средневесовой молекулярной массы сополимеров П(3ГБ)/3ГВ и П(3ГБ)/3ГГ было сходным: через 30 суток величина $M_в$ была несколько выше 60 % от исходной; через 180 суток снизилась до 26,5 и 28,5 % от исходной соответственно. Полидисперсность образцов ПГА, характеризующая соотношение в полимере фрагментов с различной степенью полимеризуемости, падала у всех исследованных образцов, за исключением полилактида и сополимера П(3ГБ)/3ГВ (13 мол. %), у которых эта величина практически не изменилась. Полученные результаты показали, что биодеградация пленочных имплантатов *in vivo* существенно зависит от химического состава ПГА.

Деградация ПГА
в виде моножильных шовных нитей

В работе (Volova et al., 2003; Shishatskaya et al., 2005) исследована деградация шовных нитей из ПГА при ушивании модельных мышечно-фасциальных ран крыс. Животные были распределены на пять групп: I группа – отрицательный (интактный) контроль; II группа – положительный контроль (ушивание хирургическим шелком); III группа – биодеградируемая нить сравнения (кетгут); IV группа – экспериментальная нить из сополимера П(3ГБ)/3ГВ (включение гидроксивалерата 15 мол. %); V группа – экспериментальная нить из гомополимера П(3ГБ). В результате формирования вокруг имплантированных нитей соединительнотканной капсулы новообразованные ткани плотно окружали нити, врастая в них и образуя на границе «ткань – нить» плотный контакт. Для удаления фрагментов тканей образцы приходилось обрабатывать протеолитическими ферментами. Тем не менее, кроме незначительных поверхностных дефектов, в целом структура нитей не изменилась и заметных дефектов обнаружено не было.

Микроскопическая картина в месте имплантации нитей из П(3ГБ) и П(3ГБ)/3ГВ на 7-е сутки после операции характеризовалась незначительным отеком тканей вокруг нитей и единичными тонкими зонами некроза, что характерно для постоперационной травмы тканей. Нити были окружены преимущественно макрофагами и лимфоцитами, а также нейтрофилами и фибробластами. Для анализа биохимических перестроек, сопровождающих морфологические изменения в тканях, анализировали динамику активности кислой фосфомоноэстеразы (КФ). Увеличение активности КФ служит показателем активизации фагоцитарной реакции макрофагов, являющихся одним из активных агентов биодеструкции ПГА (Malm et al., 1992). Активность КФ в сыворотке крови у оперированных животных была выше по сравнению с интактным контролем. Внутри групп отмечены следующие различия: на всем сроке наблюдения активность КФ в группе наиболее быстро разрушающегося кетгута была выше, чем у животных группы шелк, и достоверно превосходила таковую у двух экспериментальных групп на сроках 1, 2 и 8 недель, но была ниже на более поздних сроках. Через 2 недели во всех группах началось формирование вокруг имплантатов фиброзных капсул, в которых наблюдали увеличение количества зрелых макрофагов секреторно-фагоцитарного типа, в среднем до 6,36±0,42 в поле зрения. Среди окружающих тканей присутствовали единичные ГКИТ с 4–6 ядрами. Через 4 и 8 недель после операции зафиксировано увеличение количества активных, с большим количеством выростов и клеточных лизосомальных структур макрофагов (до 11-12 в поле зрения) и ГКИТ, а также активности КФ в них, при этом целостность нитей не нарушена. Спустя 16 недель после имплантации вокруг ПГА-нитей зафиксировано значительное истончение капсул, однако количество активных макрофагов в тканях, примыкающих к имплантатам, по-прежнему оставалось на высоком уровне. Обнаружены макрофаги, «лежащие» на поверхности полимерных нитей, появились ГКИТ с 10-12 ядрами. Через 24 недели состояние нитей не изменилось; вокруг них продолжало возрастать количество макрофагальных клеток как показателя активной биодеструкции полимерного материала.

Дальнейшим наблюдением за состоянием тканей у животных установлено, что существенных изменений в состоянии образцов не произошло. Спустя 9 месяцев после операции толщина капсул вокруг нитей у отдельных животных уменьшилась до 20-40 мкм. Нити

были окружены здоровыми тканями из вновь сформированных волокон, ориентированных вокруг имплантатов. Через 12 месяцев фиброзной капсулы вокруг имплантатов практически не было; в непосредственной близости с полимерной нитью, по ее окружности, а также в примыкающих тканях по-прежнему фиксировали значительное количество моно- и полиядерных макрофагальных клеток. На гистологических срезах выраженных дефектов нитей из ПГА не обнаружено, в отличие от кетгута и шелка, которые присутствовали в тканях в виде небольших фрагментов. В целом, полученные результаты изучения биодеструкции нитей *in vivo* при непосредственном имплантировании в мышечную ткань также позволили сделать вывод о том, что биодеструкция образцов из ПГА происходит с достаточно низкими скоростями при постепенном (послойном) выщелачивании материала с поверхности.

Деградация 3D-имплантатов из ПГА

ПГА перспективны для реконструкции дефектов костной ткани, так как эти полимеры обладают высокой механической прочностью и скорости их биорезорбции *in vivo* в несколько раз ниже, чем у других известных разрушаемых биоматериалов, что позволяет рассматривать ПГА для длительно текущей регенерации крупных костных дефектов. В работах (Шишацкая, 2006; Shishatskaya et al., 2006) были исследованы 3D-имплантаты: из поли-3-гидроксибутирата, композита полимера с гидрокисапатитом (П(3ГБ)/ГАП) с содержанием ГАП 20 % (фирмы ЗАО НПО Полистом®, Москва). В качестве материалов сравнения были взяты композитный материал гидроксиапатит/коллаген (препарат «Коллапол®», ЗАО НПО Полистом, Москва) и препарат ксенокости «Bio-OSS®» («Geistlich», Швейцария). Эксперимент проведен на крысах Вистар с модельными дефектами костной ткани (тест сегментарной остеотомии). Область для формирования дефекта выбрана с учетом данных о том, что оптимальной моделью дефекта длинной трубчатой кости у крыс, позволяющей корректно оценить эффективность влияния на репаративный остеогенез имплантатов из различных материалов, является дефект метаэпифизарной зоны большеберцовой кости диаметром от 1,5 до 3,0 мм и глубиной от 1,0 до 3,5 мм. При постоянном охлаждении физиологическим раствором у животных формировали дефекты большеберцовых костей диаметром 3,0 мм и глубиной 1,5 мм, которые заполняли экспериментальными имплантатами. Послеоперационную рану послойно ушивали. С использованием Image Analysis System «Carl Zeis» (Германия) проводили морфометрические исследования изображений срезов тканей для отслеживания структуры костной ткани в месте дефекта, состояния и динамики резорбции материала имплантатов.

При использовании для заполнения костного дефекта 3D-имплантата из П(3ГБ) через 14 суток после операции вокруг фрагментов полимера зафиксирована пролиферация остеогенных клеток, дифференцировка их в остеобласты и образование новой костной ткани в виде костных трабекул с формированием в межтрабекулярных пространствах сосудов капиллярного типа. В костных полостях наблюдали большие фрагменты полимера, на границе которых происходило образование хрящевой и незрелой костной тканей. Через месяц в зоне дефекта при имплантации П(3ГБ) на фоне активной перестройки в компактную кость, что подтверждалось наличием остеонов с четкими линиями цементации, зафиксировано значительное сокращение площади имплантатов; фрагменты полимера на гистологических срезах составили около

60 % от исходной площади. Через три месяца в препаратах были видны отдельные мелкие фрагменты разрушающегося полимера, которые не включились в состав остеогенной ткани и находились отдельно от неё в виде кластеров. Площадь, занимаемая фрагментами полимера, составила не более 25 % от исходной. Присутствие полимерного материала в эти сроки свидетельствует о достаточно низких скоростях его резорбции.

При замещении дефектов костной ткани имплантатами из композита П(3ГБ)/ГАП картина репаративного остеогенеза несколько отличалась от течения процесса при использовании только П(3ГБ). На 14-е сутки в области дефекта наблюдали формирование незрелой костной ткани; в костных полостях частицы полимера располагались вместе с кроветворными клетками в виде крупных агрегатов. Зафиксированы зоны значительных массивов неразрушенного полимерного имплантата. Через месяц на срезах отчетливо видны фрагменты имплантатов, не интегрированные в новообразованную костную ткань. Через три месяца по-прежнему в препаратах были видны достаточно крупные фрагменты композитных П(3ГБ)/ГАП имплантатов, суммарная площадь которых составляла до 30-40 % от исходной, что в 1,5-2,0 раза выше этого показателя при использовании имплантата из П(3ГБ); отмечено наличие фрагментов гидроксиапатита, отделенного от полимера слоем остеогенных клеток. Таким образом, резорбция композитного имплантата протекала медленнее по сравнению с П(3ГБ).

При применении остеозамещающих фирменных материалов «Коллапол®» и «Bio-OSS®» регенерация костного дефекта протекала на фоне более быстрой резорбции имплантатов. Так, при использовании «Коллапол®» через 14 суток в препаратах отмечены остаточные фрагменты имплантата, их площадь не превышала 20-25 % от исходной. Через один месяц признаков имплантированного материала не обнаружено. Резорбция препарата «Bio-OSS®» проходила еще более активно, и в срок 14 суток материал в препаратах отстутствовал. Этими экспериментами доказано, что собственно полигидроксибутират, а также в сочетании с гидроксиапатитом обладает выраженными остеопластическими свойствами, медленно деградирует *in vivo*, обеспечивая нормальное протекание репаративного остеогенеза.

Заключение

Установлено, что биодеградация ПГА *in vivo* реализуется гуморальным и клеточным путями с участием макрофагов и гигантских клеток инородных тел, с высокой активностью кислой фосфатазы, коррелирующей с активностью фермента в сыворотке крови животных. Процесс биоразрушения ПГА *in vivo* зависит от химической структуры полимера, формы и места имплантации изделия. Уменьшение массы полимерных изделий, имплантированных подкожно в мышечную ткань, в кость, сопровождается незначительными изменениями микроструктуры имплантатов, без существенной потери прочности, в течение длительного времени. ПГА под воздействием клеток макрофагального ряда, высокоактивных по кислой фосфатазе, медленно деградируют *in vivo* без резкой потери прочности, обеспечивая длительное функционирование полимерных изделий – от нескольких месяцев до года и более.

Работа выполнена за счет средств государственного задания на проведение фундаментальных исследований РАН (проект № гос. регистрации 01201351505).

Список литературы

Хенч Л., Джонс Д. (2007) *Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей*. М., Техносфера, 304 с. [Hench L., Jones J. (2007) *Biomaterials, artificial organs and tissue engineering*. Moscow, Tehnosphera, 304 p. (in Russian)]

Шишацкая Е.И. (2006) Биосовместимые и функциональные свойства гибридного композита полигидроксибутират/гидроксиапатит. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*, 3: 34–38 [Shishatskaya E.I. (2006) Biocompatible and functional properties of the hybrid composite polyhydroxybutyrate/hydroxyapatite. *Russian Journal of Transplatology and Artificial Organs* [Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov], 3: 34–38 (in Russian)]

Шишацкая Е.И., Волова Т.Г., Гордеев С.А., Пузырь А.П. (2002) Биодеградация шовных нитей на основе полиоксиалканоатов в биологических средах. *Перспективные материалы*, 2: 57–62 [Shishatskaya E.I., Volova T.G., Gordeev S.A., Pusyr A.P. (2002b) Biodegradation of sutures based on polyhydroxyalkanoates in biological fluids. *Advanced materials* [Perspektivnye materialy], 2: 57–62 (in Russian)]

Шишацкая Е.И., Горева А.В., Калачева Г.С., Волова Т.Г. (2009) Распределение и резорбция полимерных микрочастиц в тканях внутренних органов лабораторных животных при внутривенном введении. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 11: 542–546 [Shishatskaya E.I., Goreva A.V., Kalacheva G.S., Volova T.G. (2009) The distribution and resorption of the polymer microparticles in tissue of organs of laboratory animals via administered intravenously. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* [Byulleten ehksperimentalnoj biologii I mediciny], 11: 542–546 (in Russian)]

Шишацкая Е.И., Николаева Е.Д., Горева А.В., Бригкхам К.Д., Волова Т.Г., Сински Э.Д. (2012) Исследование пленочных матриксов из резорбируемых полигидроксиалканоатов различного химического состава *in vivo*: реакция тканей и кинетика биоразрушения. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*, 7: 73–80 [Shishatskaya E.I., Nikolaeva E.D., Goreva A.V., Brigham C.J., Volova T.G., Sinskey A.J. (2012) Investigation *in vivo* of films made of resorbable polyhydroxyalkanoates with different composition: tissue reaction and kinetics of biodestruction. *Cell transplantation and tissue engineering* [Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya], 7: 73–80 (in Russian)]

Штильман М.И. (2006) *Полимеры медико-биологического назначения*. М., Академкнига, 399 с. [Shtilman M.I. (2006) Polymers for medical and biological purpose. Moscow, Akademkniga, 399 p. (in Russian)]

Beumer G.J., van Blitterswijk C.A., Ponec M. (1978) Biocompatibility of a biodegradable matrix used as a skin substitute: an *in vivo* evaluation. *British Journal of Addiction to Alcohol and Other Drugs*, 73: 423–424

Gogolewski S., Javanovic M., Perren S.M. (1993a) The effect of melt-processing on the degradation of selected polyhydroxyacids: polylactides, polyhydroxybutyrate, and polyhydroxybutyrate-*co*-valerates. *Degradation and Stability*, 40: 313–322

Gogolewski S., Javanovic M., Perren S.M., Dillon J.G., Hughes M.K. (1993b) Tissue response and *in vivo* degradation of selected polyhydroxyacids: polylactides (PLA), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerates (PHB/PHV). *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 27: 1135-1148

Hasircii V. (2000) Biodegradable biomedical polymers. *Biomaterials and Bioengineering Handbook*. Wase D.L. (ed.) New-York, Marcel Dekker, p. 141–155

Hazari A., Wiberg M., Johansson-Ruden G., Green C., Terenghi G. (1999) A resorbable nerve conduit as an alternative to nerve autograft in nerve gap repair. *British Journal of Plastic Surgery*, 52: 653–657

Korkusuz F., Korkusaz P., Eksioğlu F., Gürsel Ih., Hasirci V. (2001) *In vivo* response to controlled antibiotic release systems. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 55: 217–228

Korsatko W., Wabnegg B., Tillian H.M., Egger G., Pfrager R., Walser V. (1984) Poly-D(-)-3-hydroxybutyric acid – a biodegradable carrier for long term medication dosagies. Studies on compatibility of Poly-D(-)-3-hydroxybutyric acid implantation tablets in tissue culture and animals. *Pharmaceutical Industries*, 46: 952–954

Korsatko-Wabnegg B., Korsatko W. (1990) Polyhydroxyalkanoates as drug carriers for the formulation of tablets with "quik-release" effect. *Pharmazie*, 45: 691–692

Lukinska Z.B., Bonfield W. (1997) Morphology and ultrastructure of the interlace between hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composite implant and bone. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 8: 379–383

Malm T., Bowald S., Karacagil S., Bylock A., Busch C. (1992) A new biodegradable patch for closure of af atrial septal defect. *Scandinavian Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 26: 9-14

Miller N.D., Williams D.F. (1987) On the biodegradation of poly-*β*-hydroxybutyrate (PHB) homopolymer and poly-*β*-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers. *Biomaterials*, 8: 129–137

Sevastianov V.I., Perova N.V., Shishatskaya E.I., Volova T.G., Kalacheva G.S. (2003) Production of purified polyhydroxyalkanoates (PHAs) for applications in contact with blood. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 14: 1029–1042

Shishatskaya E.I., Chlusov I.A., Volova T.G. (2006) A hybrid PHA-hydroxyapatite composite for biomedical application: production and investigation. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 17: 481–498

Shishatskaya E.I., Goreva A.V., Kalacheva G.S., Volova T.G. (2011) Biocompatability and resorption of intravenously administered polymer microparticles in tissue of internalorgans of laboratory animals. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 22: 2185–2203.

Shishatskaya E.I., Voinova O.N., Goreva A.V., Mogilnaya O.A., Volova T.G. (2008) Biocompatability of polyhydroxybutyrate Microspheres: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19: 2493–2502

Shishatskaya E.I., Volova T.G. (2004a) A comparative investigation of biodegradable polyhydroxyalkanoate films as matrices for *in vitro* cell cultures. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 15: 915–923

Shishatskaya E.I., Volova T.G., Efremov S.N., Puzyr A.P., Mogilnaya O.A. (2004b) Tissue response to the implantation of biodegradable polyhydroxyalkanoate sutures. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 15: 719-728

Shishatskaya E.I., Volova T.G., Gitelzon I.I. (2002) On the involvement of macrophages and phosphomonoesterases in the tissue response to implantation of polyhydroxyalkanoates. *Doklady Biological Sciences*, 383: 116 – 119

Shishatskaya E.I., Volova T.G., Gordeev S.A., Puzyr A.P. (2005) Degradation of P(3HB) and P(3HB-co-3HV) in biological media. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 16: 643–657

Shishatskaya E.I., Volova T.G., Goreva A.V., Nikolaeva E.D., Sinskey A.J. (2014) An *in vivo* study of 2D PHA matrixes of different chemical compositions: tissue reactions and biodegradations. *Materials Science and Technology*, 30: 549–557

Shum-Tim D., Stock U., Hrkach J., Shinoka T., Lien J., Moses M.A., Stamp A., Taylor G., Moran A.M., Landis W., Langer R., Vacanti J.P., Mayer J.E. (1999) Tissue engineering of autologous aorta using a new biodegradable polymer. *The Annals of Thoracic Surgery*, 68: 2298–2304

Stock U.A., Nagashima M., Khalil P.N., Nollert G.D., Herden T., Sperling J.S., Moran A., Lien J., Martin D.P., Schoen F.J., Vacanti J.P., Mayer J.E. Jr. (2000) Tissue–engineered valved conduits in the pulmonary circulation. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 119: 732 –740

Volova T.G., Shishatskaya E.I. (2014) Results of biomedical studies of PHAs produced in Institute of Biophysics SB RAS and Siberian Federal University. Chapter 21. *"Polyhydroxyalkanoates (PHA): Biosynthesis, Indastrial Production and Applications in Medicine"*. Wu L.P. (ed.) Nova Scienses Publ. Inc. NY. USA, p. 273–330

Volova T.G., Shishatskaya E.I., Sevastianov V.I., Efremov S.N., Mogilnaya O.A. (2003) Results of biomedical investigations of PHB and PHB/PHV fibers. *Biochemical Engineering Journal*, 16: 125–133