УДК 617:616-08-084-092.4

[1]В.А. Липатов, [2]Е.В. Грехнева, [2]И.В. Мезенцева, [2]Ю.И. Ерохина, [1]Е.И. Воронкова, [1]А.Ю. Сериков, [1]Ю.А. Сапельникова

ОЦЕНКА РЕАКЦИИ ТКАНЕЙ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ НА ВНУТРИМЫШЕЧНОЕ ВВЕДЕНИЕ ОБОЛОЧЕК МИКРОКАПСУЛ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРОВ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ, ГУАРОВОЙ КАМЕДИ, ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОНА КАК НОСИТЕЛЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ХИРУРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

[1]Курский Государственный Медицинский Университет
[2]Курский Государственный Университет

.

Микрокапсулирование - перспективный метод пролонгирования эффекта лекарственных препаратов. В рамках данной работы в условия эксперимента «in vivo» изучена в сравнительном аспекте реакция тканей лабораторных животных на внутримышечное введение оболочек микрокапсул на основе полимеров альгината натрия, гуаровой камеди, поливинилпирролидона. Статья содержит анализ результатов исследования, цель которого состоит в выборе материала для создания оболочки микрокапсул. В ходе исследования выявлено, что приоритетным материалом является полимер гуаровая камедь.

Ключевые слова: *медицина, микрокапсулы, полимеры, реакция тканей.*

ASSESSMENT OF LABORATORY ANIMALS TISSUE REACTIONS ON INTRAMUSCULAR MICROCAPSULE SHELLS BASED ON POLYMERS OF SODIUM ALGINATE, GUAR GUM, POLYVINILPIRROLIDON AS CARRIER OF DRUGS FOR TREATMENT AND PREVENTION OF SURGICAL DISEASES

[1]V.A. Lipatov, [2]E.V. Grehneva, [2]I.V. Mezentsev, [2]Y.I. Erokhina, [1]E.I. Voronkova, [1]A.Y. Serikov, [1]Y.A. Sapelnikova
[1]Kursk State Medical University
[2]Kursk State University

Microencapsulation - a promising method for prolonging the effect of drugs. In this work in experimental conditions «in vivo» laboratory animals′ tissues reaction on intramuscular shell microcapsules based on polymers of sodium alginate, guar gum, polyvinilpirrolidon were studied in a comparative aspect. The article analyzes the results of the study, the aim of which is to select a material for the shell of the microcapsules. The study revealed that the priority material is a polymer guar gum.

Key words: *medicine, microcapsules, polymers, tissue reaction.*

Введение

Введение инкапсулированных лекарственных средств является перспективным способом лечения множества заболеваний в различных сферах медицины [1,2]. Снижение кратности введения препаратов позволяет предотвратить многократную травматизацию тканей, возникновение постинъекционных осложнений, оптимизировать концентрацию действующего вещества в месте введения, предупреждая тем самым побочные эффекты

препарата. Микрокапсулирование обладает широким перечнем преимуществ по сравнению с иными методами пролонгирования эффекта лекарственных препаратов; особое место занимает высвобождение активных компонентов в необходимом участке организма [3]. В целях проведения эффективного, безопасного лечения оболочки микрокапсул должны соответствовать множеству требований, предъявляемых к полимерным материалам, следовательно, поиск веществ, максимально соответствующих всем необходимым параметрам, представляет сегодня особый интерес [4].

Цель

Изучить в сравнительном аспекте реакцию тканей организма лабораторного животного при инъекционном внутримышечном введении микрокапсул на основе полимеров гуаровой камеди, альгината натрия и поливинилпирролидона для обоснования выбора наиболее оптимальных вариантов воздействия.

Материалы и методы

В качестве материалов для экспериментальных исследований были использованы образцы полимерных оболочек микрокапсул, изготовленные на кафедре химии Курского Государственного Университета, на основе полимеров альгината натрия, гуаровой камеди, поливинилпирролидона.

Экспериментальные оперативные вмешательства проводились на лабораторных крысах линии Вистар. Под общим наркозом в стерильных условиях операционного блока кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии им. А.Д. Мясникова КГМУ половозрелой лабораторной крысе без признаков заболеваний произведены внутримышечные инъекции микрокапсул. Местом инъекции являлась передняя брюшная стенка на 1 см ниже мечевидного отростка.

Вывод животных из эксперимента осуществлялся поэтапно, на 3, 7 и 14-е сутки в количестве трех особей из каждой группы посредством снотворного хлоралгидрат. Обращение с животными соответствовало гуманным принципам [5,6].

После аутопсии животных проводилось взятие материала (участок ткани в месте внедрения имплантата) для приготовления гистологического препарата. Основные этапы: взятие материала; фиксация; промывка в воде; обезвоживание и уплотнение; заливка; приготовление срезов; окрашивание; заключение срезов.

При гистологическом исследовании мышечной ткани из места инъекции взвеси образцов микрокапсул изучали качественные характеристики (состояние мышечных волокон, их группировка, форма и взаиморасположение, морфологические характеристики сосудов и нервов, состояние перимизия, изменения в мышечном синцитии и в окружающей волокна межуточной ткани), а также количественные показатели (в

срезах с продольной ориентацией мышечных волокон – диаметр мышечного волокна, расстояние между мышечными волокнами; в срезах с поперечной ориентацией мышечных волокон – соотношение площадей мышечных волокон и пространств эндомизия, количество ядер на поперечном срезе мышечного волокна).

Статистическая обработка с целью выявления достоверных отличий проводилась с использованием критерия Манна – Уитни. Степень отклонения от контрольных значений определялась по сумме площадей перекрытия областей значения опытных групп относительно контрольной. Площади перекрытия рассчитывались путем интегрирования Гауссовой функции.

Результаты и обсуждение

В каждой группе животных на всех сроках эксперимента мышечные волокна сохраняют лентовидную форму, характерную организацию, а также компактное расположение. На поздних сроках (14-е сутки) они расположены максимально плотно друг к другу. Миоциты во всех препаратах сохраняют регулярную поперечную исчерченность и имеют умеренное количество собственных ядер под сарколеммой, обладающих овальной или удлиненной формой с одним или двумя ядрышками. Мышечная ткань на всех сроках не проявляла ни диффузных, ни очаговых изменений тинкториальных свойств.

На отдельных участках визуализируются тонкие прослойки соединительной ткани, внедряющиеся в межмышечные пространства (эндомизий), с расслоением миосимпласта на отдельные пучки. В препаратах, приготовленных из мышечной ткани животных, выведенных из эксперимента на 3-и сутки, промежутки между мышечными пучками имеют максимальную ширину за счет очагового межпучкового интерстициального отека.

В эндомизии и перимизии содержатся единичные клеточные элементы резидентного пула, визуализируются артериолы, венулы и нервные волокна. На 3-и сутки в зонах, где отмечаются явления интерстициального отека, венулы расширены, полнокровны, в просвете сосудов обнаруживаются эритроциты. В кровеносных сосудах мышечного типа ни на ранних, ни на поздних сроках гипертрофии мышечной стенки не определяется. Не выявлено также и признаков избыточного фиброза эндомизия, трофических расстройств в мышечной ткани, диффузных и очаговых инфильтративных процессов.

Таким образом, на ранних сроках (3-и сутки) в некоторых препаратах определяются очаговые изменения мышечной ткани. Эти изменения заключаются в локальном интерстициальном отеке и полнокровии сосудов микроциркуляторного русла. К 14-м суткам признаков патологических изменений при анализе гистологических

препаратов не обнаружено. Видимых отличий между группами животных, которым производилась внутримышечная инъекция взвеси микрокапсул, изготовленных из разных полимеров, также обнаружить не удалось.

Результаты морфометрических исследований представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Динамические изменения морфометрических показателей гистологических препаратов мышечной ткани животных из места инъекционной имплантации взвеси образцов полимерных микрокапсул

Морфометрические показатели	**Срок**	**Контроль**	**Альгинат**	**Гуаровая камедь**	**ПВП**
Диаметр мышечного волокна	3 сутки	4,82±0,59	4,32±0,49	5,17±0,65	3,44±0,31*
	7 сутки	4,49±0,9	3,02±0,17*	4,36±0,76	3,03±0,37*
	14 сутки	5,4±0,49	3,33±0,21*	4,29±0,59*	3,89±0,56*
Расстояние между мышечными волокнами	3 сутки	0,67±0,41	1,72±0,46 *	0,96±1,2	0,7±0,17
	7 сутки	1,15±0,11	1,77±0,34 *	1,1±0,38	0,8±0,22 *
	14 сутки	1,12±0,24	1,62±0,16 *	1,19±0,17	1,44±0,15 *
Соотношение площадей мышечных волокон и межмышечных пространств (пространств эндомизия)	3 сутки	0,9±0,03	0,8±0,03 *	0,62±0,03 *	0,82±0,05 *
	7 сутки	0,9±0,02	0,79±0,04 *	0,71±0,05 *	0,79±0,04 *
	14 сутки	0,88±0,02	0,84±0,035 *	0,73±0,05 *	0,74±0,04 *
Количество ядер на поперечном срезе мышечного волокна	3 сутки	3,07±0,2	3,28±0,27	3,98±0,27 *	3,94±0,15 *
	7 сутки	3,08±0,18	3,45±0,28 *	3,88±0,25 *	4,08±0,35 *
	14 сутки	2,99±0,22	2,41±0,27 *	3,02±0,35	2,69±0,26 *

Примечание: * – наличие достоверных отличий средней арифметической по сравнению с контрольной группой

При анализе морфометрических данных диаметр мышечного волокна в группе «альгинат» оказался меньше на 10%, 33%, 38% по сравнению с контролем в третьи, седьмые и четырнадцатые сутки соответственно. Однако диаметр волокна к 14-м суткам оказался меньше на 23% от величины, полученной в 3-и сутки внутри группы.

Диаметр мышечного волокна в группе «гуаровая камедь» на 7% больше в 3-и сутки относительно контроля и соответственно на 3% и 21% меньше по сравнению с контрольной группой в 7-е и 14-е сутки, но он, как и в группе «альгинат», уменьшился на 17% относительно 3-их суток внутри группы.

Диаметр мышечного волокна в группе «ПВП» оказался меньше на 29%, 33%, 28% по сравнению с контролем в 3, 7 и 14-е сутки соответственно. Внутри группы наблюдается увеличение диаметра к 14-м суткам на 13%.

В результате сравнения опытных групп между собой выявлено, что наибольшее количество статистически значимых показателей изменения диаметра волокна на всех сроках эксперимента наблюдаются у группы «ПВП», наименьшее – у группы «гуаровая камедь» (только на 14-е сутки), в группе «альгинат» статистически значимые отклонения отмечаются на 7 и 14-е сутки эксперимента.

По результатам анализа расстояния между мышечными волокнами соотносятся в динамике следующим образом: больше чем в полтора раза на 3-и сутки возрастает данный показатель в группе «альгинат» (на 157% превышает контрольные цифры), к 7-м суткам разница составляет 54%, и 45% – на 14-е сутки эксперимента. Прослеживается явная тенденция к уменьшению расстояния между волокнами внутри группы от начала введения вещества до конца опыта (на 6% к 14-м суткам).

Расстояние между мышечными волокнами в группе «гуаровая камедь» на 3-и сутки превышает контрольные цифры на 43%, на 7-е сутки, напротив, отстает от контроля на 7%, на 14-е – превышает контрольный показатель на 6%. Разница между данными внутри группы, полученными на 3 и 14-е сутки, составляет 24%.

В группе «ПВП» величина расстояния между мышечными волокнами увеличивается на 4% сравнительно с контрольной группой животных, на 7-е – уменьшается на 30%, а на 14-е – увеличивается относительно контрольной группы на 29%. Внутри группы разница между показателями на 3 и 7-е сутки составляет 106%.

Наибольшее число статистически значимых изменений на всех строках эксперимента получено в группе «альгинат», в группе «ПВП» – на 7- и 14-е сутки эксперимента, в группе «гуаровая камедь» статистически значимых изменений не выявлено.

По результатам анализа соотношения площадей мышечных волокон и межмышечных пространств получены следующие результаты: отношение указанных величин в группе «альгинат» отличается от контрольных значений в 3-и сутки на 11%, в 7-е – на 12%, в 14-е – на 5%. Внутри группы разница между числовыми данными на 3 и 14-е сутки составила 5%.

В группе «гуаровая камедь» соотношение изменилось относительно контроля к 3-им суткам на 31%, к 7-м – на 21%, к 14-м – на 17%. Динамические изменения внутри группы проявлялись изменением параметра на 18% к 14-м суткам сравнительно с третьими.

В группе «ПВП» отмечается изменение соотношения площадей к 3-м суткам на 9%, к 7-м – на 12%, к 14-м – на 16% относительно контроля. Внутри группы соотношение изменилось на 10% к 14-м суткам от величины, полученной на 3-и сутки эксперимента.

Статистически значимые отличия выявлены в каждой из опытных групп на протяжении всего эксперимента.

Количество ядер на поперечном срезе мышечного волокна при введении альгината увеличивается на 7% и 12% относительно контроля на 3 и 7-е сутки соответственно, однако на 14-е сутки этот показатель снижается на 19% сравнительно с контролем. Внутри группы разница между количеством ядер, обнаруженных на 3 и 14-е сутки, составляет 27%.

В группе «гуаровая камедь» количество ядер больше на 30%, 26% и 1% относительно контроля на 3, 7 и 14-е сутки соответственно. Внутри группы данные величины убывают к 14-м суткам на 24%.

После введения ПВП выявлены следующие динамические изменения: увеличение количества ядер на 28% и 32% соответственно 3 и 7-м суткам, а на 14-е сутки обнаружено уменьшение их количества на 10% по сравнению с контролем. Внутри группы разница между величинами, полученные в 3 и 14-е сутки, составляет 32%.

Наибольшее количество достоверных отличий выявлено у группы «ПВП» (на всех сроках эксперимента), в группе «альгинат» – на 7 и 14-е сутки, в группе «гуаровая камедь» - на 3 и 7-е сутки.

Таблица 2

Площади перекрытия областей значений морфометрических показателей контрольной и опытных групп экспериментальных животных

Площади перекрытия	**Срок**	**Альгинат**	**Гуаровая камедь**	**ПВП**

Диаметр мышечного волокна	3 сутки	0,116	0,775	0,64
	7 сутки	0,229	0,914	0,128
	14 сутки	0,148	0,301	0,003
Расстояние между мышечными волокнами	3 сутки	0,81	0,769	0,534
	7 сутки	0,489	0,853	0,52
	14 сутки	0,534	0,92	0,204
Соотношение площадей мышечных волокон и межмышечных пространств (пространств эндомизия)	3 сутки	0,129	0,285	0,572
	7 сутки	0,506	0,482	0,759
	14 сутки	0,659	0,482	0,659
Количество ядер на поперечном срезе мышечного волокна	3 сутки	0,88	0,98	0,112
	7 сутки	0,83	0,205	0,214
	14 сутки	0,134	0,83	0,134
Сумма площадей		5,424	7,796	4,479

При анализе площадей перекрытия выявлено, что наибольшее значение суммы принадлежит группе «гуаровая камедь» – 7,796; а наименьшее – «ПВП» (4,479).

Заключение

Наиболее физиологичные показатели у контрольной группы животных получены на 14-е сутки эксперимента, так как в этом периоде наступает максимальное восстановление исходной структуры мышечной ткани вследствие сорбции дистиллированной воды и протекающих репаративных процессов. Исходя из этого, критериями оценки степени пригодности использования исследуемых материалов будут служить значения, максимально приближенные к данным, полученным в контрольных группах на 14-е сутки эксперимента.

Снижение диаметра мышечного волокна объясняется присущей исследуемым полимерам гидрофильностью, наибольшая степень которой характерна для альгината натрия. Гидрофильность полимеров играет в определенной мере положительную роль,

уменьшая интерстициальный отек, однако, чрезмерное проявление данного свойства может негативно отразиться на процессах всасывания лекарственных веществ из места введения и приводить к повреждению мышечного волокна [2].

Увеличение расстояния между мышечными волокнами свидетельствует о наличии интерстициального отека, степень которого зависит от уровня полимеризации материала, гидрофильности, его заряда и способности к биодеградации [7]. Оптимальным соотношением указанных параметров обладает гуаровая камедь, тогда как при изучении результатов, полученных в группах «ПВП» и «альгинат», отмечены статистически значимые отклонения от контрольных цифр, свидетельствующие о большей степени развитии отека.

Результаты, полученные при анализе соотношения площадей мышечных волокон и пространств эндомизия, прямо пропорциональны изменениям, описанным выше, и обусловлены аналогичными причинами и механизмами.

Снижение количества ядер наблюдается в каждой из контрольных групп, однако в меньшей степени данный процесс протекает в тканях группы «гуаровая камедь». Оно служит показателем протекающих процессов повреждения, этиологическим фактором которых является присутствие полимеров и возникшие при введении последних микротравмы. Возникновение микротравм объясняет наличие прослоек соединительной ткани, внедряющихся в эндомизий.

Отсутствие воспалительной реакции обусловлено интактностью полимеров по отношению к окружающим тканям, что связано с микроструктурой и небелковой природой веществ.

Учитывая, что значения сумм площадей перекрытия в большей степени приближены к контрольным, в группе «гуаровая камедь», следовательно, данный материал является приоритетным сравнительно с поливинилпирролидоном и альгинатом натрия.

Литература / References

1. Иванова Л.А. Технология лекарственных форм: В 2 т. М.: Медицина, 1991; 2:134 - 147.
   Ivanova L.A. Tehnologija lekarstvennyh form: V 2 t. M.: Medicina, 1991; 2:134 -147.
2. Косенко Н.В, Лебеденко В.Я., Махарадзе Р.В. и др. Исследование микрокапсулирования и свойств полимерных микрокапсул.Фармация. 1989; 3: 26-29.
   Kosenko N.V, Lebedenko V.Ja., Maharadze R.V. i dr. Issledovanie mikrokapsulirovanija i svojstv polimernyh mikrokapsul.Farmacija. 1989; 3: 26-29.

3. Тенцова, А.И., Ажгихин И.О. Лекарственная форма и терапевтическая эффективность лекарств. М.: Медицина.1974; 336с.
   Tencova, A.I., Azhgihin I.O. Lekarstvennaja forma i terapevticheskaja jeffektivnost' lekarstv. M.: Medicina.1974; 336s.
4. Егорова Н.С.,Самуилова В.Д. и др. Биотехнология: В 8 т. Т.1. Проблемы и перспективы. Т.7. Иммобилизованные ферменты. М.: Высшая школа; 1987; 1:405-503.
   Egorova N.S.,Samuilova V.D. i dr. Biotehnologija: V 8 t. T.1. Problemy i perspektivy. T.7. Immobilizovannye fermenty. M.: Vysshaja shkola; 1987; 1:405-503.
5. Липатов В. А., Бежин А. И. Методические рекомендации для студентов по выполнению хирургических эксперементальных исследований на животных, 2004.
   Lipatov V. A., Bezhin A. I. Metodicheskie rekomendacii dlja studentov po vypolneniju hirurgicheskih jeksperemental'nyh issledovanij na zhivotnyh, 2004.
6. Европейская Конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. Страсбург, 1986 г.
   Evropejskaja Konvencija o zashhite pozvonochnyh zhivotnyh, ispol'zuemyh dlja jeksperimentov ili v inyh nauchnyh celjah. Strasburg, 1986 g.
7. Шехтер А.Б., Розанова И.Б. Тканевая реакция на имплантат. М.: Медицина. 2014; 25-42.
   Shehter A.B., Rozanova I.B. Tkanevaja reakcija na implantat. M.: Medicina. 2014; 25-42.

Липатов Вячеслав Александрович (контактное лицо) – д.м.н., профессор кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии Курского Государственного Медицинского Университета, доцент. 305041. Курск, ул. К. Маркса, д. 3, Курский Государственный Медицинский Университет. Тел: 8-(4712)-58-81-42;e-mail: drli@yandex.ru.