

# ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 616–092.9:616–091.08

Оригинальная статья

## ОЦЕНКА БИОСОВМЕСТИМОСТИ ПОЛИКАПРОЛАКТОНОВЫХ МАТРИЦ, МИНЕРАЛИЗОВАННЫХ ВАТЕРИТОМ, ПРИ СУБКУТАННЫХ ИМПЛАНТАЦИОННЫХ ТЕСТАХ У БЕЛЫХ КРЫС

**А. Н. Иванов** — НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, заведующий отделением лабораторной диагностики, главный научный сотрудник отдела фундаментальных и клинико-экспериментальных исследований; заведующий центральной научно-исследовательской лабораторией, доктор медицинских наук; **М. О. Куртукова** — ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, доцент кафедры гистологии, кандидат медицинских наук; **М. Н. Козадаев** — НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, младший научный сотрудник отдела фундаментальных и клинико-экспериментальных исследований, кандидат медицинских наук; **Д. А. Тяпкина** — ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, студентка лечебного факультета; **С. В. Кустодов** — ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, студент лечебного факультета; **М. С. Савельева** — ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского», Образовательно-научный институт наноструктур и биосистем, инженер; **И. О. Бугаева** — ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, проректор по учебной работе, заведующая кафедрой гистологии, профессор, доктор медицинских наук; **Б. В. Парахонский** — ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского», Образовательно-научный институт наноструктур и биосистем, старший научный сотрудник, кандидат физико-математических наук; **Е. А. Галашина** — НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, младший научный сотрудник отдела фундаментальных и клинико-экспериментальных исследований, кандидат биологических наук; **Е. В. Гладкова** — НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, начальник отдела фундаментальных и клинико-экспериментальных исследований, кандидат биологических наук; **И. А. Норкин** — директор НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, заведующий кафедрой травматологии и ортопедии, профессор, доктор медицинских наук.

## THE ESTIMATION OF BIOCOMPATIBILITY OF POLYCAPROLACTONE MATRICES MINERALIZED BY VATERITE IN SUBCUTANEOUS IMPLANTATION TESTS IN WHITE RATS

**A. N. Ivanov** — Scientific Research Institute of Traumatology, Orthopedics and Neurosurgery of Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Department of Fundamental, Clinical and Experimental Studies, Head of Laboratory Diagnostics Department, Chief Research Assistant, Doctor of Medical Sciences; **M. O. Kurtukova** — Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Department of Histology, Assistant Professor, Candidate of Medical Sciences; **M. N. Kozadayev** — Scientific Research Institute of Traumatology, Orthopedics and Neurosurgery of Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Department of Fundamental, Clinical and Experimental Studies, Junior Research Assistant, Candidate of Medical Sciences; **D. A. Tyapkina** — Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Department of General Medicine, Student; **S. V. Kustodov** — Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Department of General Medicine, Student; **M. S. Saveleva** — Saratov National Research University n.a. N. G. Chernyshevsky, Educational and Research Institute of Nanostructures and Biosystems, Engineer; **I. O. Bugaeva** — Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Vice-Rector for Academic Work, Head of Department of Histology, Professor, Doctor of Medical Sciences; **B. V. Parakhonsky** — Saratov National Research University n.a. N. G. Chernyshevsky, Educational and Research Institute of Nanostructures and Biosystems, Senior Research Assistant, Candidate of Physical and Mathematical Sciences; **E. A. Galashina** — Scientific Research Institute of Traumatology, Orthopedics and Neurosurgery of Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Department of Fundamental, Clinical and Experimental Studies, Junior Research Assistant, Candidate of Biological Sciences; **E. V. Gladkova** — Scientific Research Institute of Traumatology, Orthopedics and Neurosurgery of Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Head of Department of Fundamental, Clinical and Experimental Studies, Candidate of Biological Sciences; **I. A. Norkin** — Director of Scientific Research Institute of Traumatology, Orthopedics and Neurosurgery of Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Head of Department of Traumatology and Orthopedics, Professor, Doctor of Medical Sciences.

Дата поступления — 02.08.2018 г.

Дата принятия в печать — 16.08.2018 г.

**Иванов А. Н., Куртукова М. О., Козадаев М. Н., Тяпкина Д. А., Кустодов С. В., Савельева М. С., Бугаева И. О., Парахонский Б. В., Галашина Е. А., Гладкова Е. В., Норкин И. А.** Оценка биосовместимости поликапролактоновых матриц, минерализованных ватеритом, при субкутаных имплантационных тестах у белых крыс. Саратовский научно-медицинский журнал 2018; 14 (3): 451–456.

**Цель:** оценить биосовместимость матриц, изготовленных из поликапролактона и минерализованных ватеритом, путем изучения локальных и системных проявлений воспалительной реакции при субкутаных имплантационных тестах у белых крыс. **Материал и методы.** Эксперимент выполнен на 40 крысах, разделенных на четыре равные группы: контроля, сравнения (ложнооперированные крысы), отрицательного контроля (крысы с имплантацией матрицы, не обладающей биосовместимостью) и экспериментальную группу, животным которой имплантировали поликапролактоновую матрицу (ПКЛ) с ватеритом (CaCO<sub>3</sub>). Анализ локальных прояв-

лений воспаления проводился путем морфологического исследования препаратов тканей зоны имплантации. Системные проявления воспаления оценивались по концентрации фактора некроза опухоли альфа (ФНО) и интерлейкина-1бета (ИЛ-1) в сыворотке крови. *Результаты.* Изменения состава клеточных популяций свидетельствуют о том, что ПКЛ/ $\text{CaCO}_3$ -скаффолд через 21 день после имплантации крысам равномерно заселяется клетками фибробластического ряда и васкуляризуется. Данные матрицы не вызывают развития интенсивной воспалительной реакции, которая отмечена в группе отрицательного контроля и сопровождалась системными проявлениями в виде статистически значимого увеличения концентрации в сыворотке крови ФНО и ИЛ-1. *Заключение.* Полученные в ходе исследования данные, подтверждающие биосовместимость ПКЛ/ $\text{CaCO}_3$ -скаффолдов, экспериментально обосновывают возможность их использования для тканевой инженерии.

**Ключевые слова:** регенерация, скаффолды, ватерит, биосовместимость, поликапролактон.

*Ivanov AN, Kurtukova MO, Kozadaev MN, Tyapkina DA, Kustodov SV, Saveleva MS, Bugaeva IO, Parakhonsky BV, Galashina EA, Gladkova EV, Norkin IA. The estimation of biocompatibility of polycaprolactone matrices mineralized by vaterite in subcutaneous implantation tests in white rats. Saratov Journal of Medical Scientific Research 2018; 14 (3): 451–456.*

*Aim:* to estimate biocompatibility of matrices produced from polycaprolactone (PCL) and mineralized by vaterite ( $\text{CaCO}_3$ ) by studying local and systemic manifestations of inflammatory reaction in subcutaneous implantation tests in white rats. *Material and Methods.* The experiment was conducted on 40 rats divided into four equal groups: control, comparison (rats with imitation of implantation), negative control (rats with implanted non-biocompatible matrices) and experimental group, comprised of animals with implanted PCL/ $\text{CaCO}_3$ -matrices. Local inflammatory manifestations were analyzed by morphological assay of implantation area tissues. Systemic inflammatory manifestations were estimated by TNF- $\alpha$  concentration and interleukin-1 $\beta$  (IL-1) in blood serum by ELISA. *Results.* The changes in cellular population content demonstrate that a PCL/ $\text{CaCO}_3$ -matrice on the 21 day after the implantation to rats is evenly colonizing by fibroblast cells and vascularizing. This type of matrices does not provoke intense inflammatory reaction seen in negative control animals and accompanied by systemic manifestations such as statistically significant rise in TNF- $\alpha$  and IL-1 concentrations. *Conclusion.* The data obtained in the study proving the biocompatibility of PLC/ $\text{CaCO}_3$ -scaffolds experimentally substantiate the potential for their use in tissue engineering.

**Key words:** regeneration, scaffolds, vaterite, biocompatibility, polycaprolactone.

**Введение.** В настоящее время одним из важнейших направлений тканевой инженерии является создание трехмерных скаффолдов, применяемых для стимуляции процессов регенерации. Скаффолды — трехмерные пористые структуры, выполняющие при имплантации в зону дефекта функцию внеклеточного каркаса, по периферии и в толще которого происходит регенерация за счет заселения матрицы клеточными элементами [1]. Для изготовления скаффолдов применяется обширный спектр материалов, имеющих как природное, так и искусственное происхождение [2]. Чтобы обеспечить возможность химической модификации и высокой многофункциональности, предпочтение при разработке скаффолдов отдается искусственным материалам, одним из которых является поликапролактон (ПКЛ) [3]. Данный полимер способен к биодegradации в условиях *in vivo* с образованием продуктов, не оказывающих токсического воздействия на окружающие участки тканей и на весь организм в целом [4].

Для улучшения остеоиндуктивных и остеокондуктивных свойств матриц в их состав включают неорганические вещества, стимулирующие данные процессы. Ватерит ( $\text{CaCO}_3$ ) является одним из таких соединений, он способен активировать размножение клеток костной ткани и при переходе в кальцит участвовать в адресной доставке веществ, высвобождая в области дефекта предварительно адсорбированные биологически активные молекулы [5, 6].

К основным требованиям, предъявляемым к скаффолдам, относится биосовместимость. Матрицы должны обладать возможностью васкуляризации, способностью к заселению клеточными элементами, не приводить к негативным изменениям в организме. Имплантационные тестирования, в том числе субкутанные, являются одним из важных и обязательных этапов оценки биосовместимости скаффолда [7].

*Цель:* оценка биосовместимости матриц, изготовленных из поликапролактона и минерализованных

ватеритом, путем изучения локальных и системных проявлений воспалительной реакции при субкутанных имплантационных тестах у белых крыс.

**Материал и методы.** Эксперимент выполнен на 40 белых нелинейных крысах-самцах массой 200–250 г, которые были разделены на четыре равные группы: контрольная группа, состоящая из 10 интактных крыс; группа сравнения, включающая 10 ложнопериованных животных, которым выполнялось полное по объему оперативное вмешательство, но без имплантации матриц; группа отрицательного контроля, состоящая из 10 животных, которым имплантировались матрицы на основе ПКЛ с адсорбированным чужеродным белком, не обладающие биосовместимостью; опытная группа из 10 крыс, которым субкутано имплантировались ПКЛ/ $\text{CaCO}_3$ -скаффолды.

Экспериментальная работа проводилась в соответствии с Конвенцией по защите животных, используемых в экспериментах и для других научных целей (принятой Советом Европы в 1986 г.), Хельсинкской декларацией по вопросам медицинской этики и Международными рекомендациями по проведению медицинских-биологических исследований с использованием лабораторных животных (1989), приказом МЗ РФ от 19 июня 2003 г. №267 «Об утверждении правил лабораторной практики». Исследование осуществлялось в соответствии с рекомендациями Этического комитета Саратовского государственного медицинского университета им. В.И. Разумовского (протокол №6 от 6.02.2018). При выполнении всех манипуляций с животными для достижения наркоза внутримышечно вводилась комбинация телазола (ZoetisInc, США) в дозе 0,1 мл/кг и ксилазина (Interchemie, Нидерланды) в дозе 1 мг/кг.

Для имплантации использовали матрицы на основе ПКЛ, изготовленные методом электроформования в Образовательно-научном институте наноструктур и биосистем СГУ. Животным группы отрицательного контроля имплантировали неминерализованные матрицы с адсорбированным чужеродным белком (нативный овальбумин) на поверхности. Для имплантации животным опытной группы использовались скаффолды, минерализованные ватеритом по мето-

**Ответственный автор** — Иванов Алексей Николаевич  
Тел.: +7 (927) 2799599  
E-mail: lex558452@gmail.com

дике, описанной Савельевой М. С., Ивановым А. Н., Куртуковой М. О. с соавт. [5].

Для имплантации матриц проводился разрез предварительно депилированной и обработанной антисептиком кожи межлопаточной области крыс. Далее в ране под кожей с использованием браншей пинцета формировался карман 15х15 мм, в который помещался скаффолд в форме диска диаметром 10 мм. После размещения скаффолдов в подкожном кармане рана ушивалась наглухо с использованием нерассасывающейся монофиламентной нити Resorpen 3–0 USP (RESORBA Medical GmbH, Германия) и обрабатывалась 70%-ным спиртом.

На 21-е сутки после имплантации матриц или ее имитации у ложнооперированных животных под наркозом проводился забор крови путем пункции правых отделов сердца. Кровь забирали в объеме 5 мл в пробирки Vacuette с активатором свертывания и разделительным гелем. Сыворотку крови получали путем центрифугирования 3000 об/мин. Аликвоты сыворотки крови замораживали и хранили при температуре -20°C. Концентрацию ФНО и ИЛ-1 определяли в сыворотке крови экспериментальных животных методом ИФА с использованием наборов реактивов «IL-1 $\beta$  rat» и «TNF- $\alpha$  rat» фирмы eBioscience (BenderMedSystems, Австрия) на микропланшетном спектрофотометре Anthos-2020 (Biochrom, Великобритания).

После забора крови животные выводились из эксперимента путем передозировки препаратов наркоза. Для гистологического исследования скаффолд с окружающими тканями извлекали единым блоком. Материал для исследования фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина (ООО «Биовитрум», Россия), обезвоживали в спиртах, после чего заливали в парафин. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином Майера (ООО «Биовитрум», Россия) и эозином (ООО «Биовитрум», Россия). Для покрытия срезов применяли среду Bio-Monht (BioOptica, Италия).

Препараты исследовали при помощи микроскопа Axiolmager Z2 (CarlZeiss, Германия) и микровизора проходящего света серии  $\mu$ Vizo-103 (ООО «Ломо Фотоника», Россия). На гистологических препаратах выявляли локальные признаки воспалительной ре-

акции: отек, гиперемия, инфильтрацию скаффолда и окружающих его тканей иммунокомпетентными клетками. Проводили морфометрический подсчет количества клеток каждой клеточной популяции: фибробластов, фиброцитов, нейтрофилов, эозинофилов, лимфоцитов, плазмочитов и макрофагов в пяти полях зрения скаффолда и его перифокальной зоны при увеличении объектива 63х.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли при помощи пакета программ Statistica 10.0. Проверяли гипотезы о виде распределений вариационных рядов (критерий Шапиро — Уилка). Большинство наших данных не соответствовали закону нормального распределения, поэтому для сравнения значений использовался U-критерий Манна — Уитни, на основании которого рассчитывали Z-критерий и показатель достоверности различия  $p$ . Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** В ходе морфологического исследования препаратов в области имитации имплантации матриц в группе сравнения на 21-е сутки эксперимента локальных признаков воспаления, включая отек, полнокровие сосудов и лейкоцитарную инфильтрацию, не выявлено. В соединительной ткани области имплантации преобладали клетки фибробластического ряда. Так, доля фибробластов составила 54% от общего количества клеток. Фиброцитов обнаружено 32%. Обнаруживались также единичные лейкоциты, преимущественно лимфоциты и макрофаги (табл. 1). Концентрации провоспалительных цитокинов в группе ложнооперированных животных на 21-е сутки эксперимента не имели статистически значимых отличий от уровня ФНО и ИЛ-1 у интактных крыс (табл. 3).

На 21-е сутки после имплантации матрицы с чужеродным белком у животных группы отрицательного контроля вокруг скаффолда обнаруживался соединительнотканый барьер, инфильтрированный лейкоцитами, отек тканей перифокальной области, а также полнокровие сосудов артериального и венозного русла в этой зоне. При морфометрическом анализе установлено, что в перифокальной области скаффолда, не обладающего биосовместимостью, количество фибробластов превышало таковое в препаратах группы ложнооперированных животных

Таблица 1

**Клеточные популяции перифокальной зоны ПКЛ/СаСО<sub>3</sub>-скаффолдов и матриц с адсорбированным чужеродным белком в сравнении с соединительной тканью зоны имитации имплантации ложнооперированных животных**

Среднее число клеток в пяти полях зрения	Группа сравнения (n=10)	Отрицательный контроль (n=10)	Опытная группа (n=10)
Фибробласты	15 (10; 18)	30 (15; 34) $p_1 < 0,05$	13 (10; 15) $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,05$
Фиброциты	9 (5; 12)	9 (6; 13) $p_1 > 0,05$	11 (7; 16) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$
Полиморфоядерные лейкоциты	0 (0; 0)	3 (2; 5) $p_1 < 0,001$	0 (0; 0) $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,001$
Лимфоциты	2 (0; 3)	7 (3; 11) $p_1 < 0,05$	0 (0; 1) $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,001$
Макрофаги	2 (2; 5)	6 (4; 7) $p_1 < 0,05$	1 (1; 2) $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,001$

Примечание: в каждом случае приведены медиана, верхний и нижний квартили;  $p_1$ ,  $p_2$  — по сравнению с ложнооперированными и с отрицательным контролем соответственно.

Таблица 2

**Клеточные популяции ПКЛ/CaCO<sub>3</sub>-скафолдов и матриц с адсорбированным чужеродным белком в сравнении с соединительной тканью зоны имитации имплантации ложнооперированных животных**

Среднее число клеток в пяти полях зрения	Группа сравнения (n=10)	Отрицательный контроль (n=10)	Опытная группа (n=10)
Фибробласты	15 (10; 18)	5 (1; 12) p <sub>1</sub> <0,001	38 (21; 47) p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001
Фиброциты	9 (5; 12)	2 (0; 6) p <sub>1</sub> <0,001	22 (13; 32) p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001
Полиморфоядерные лейкоциты	0 (0;0)	13 (5;16) p <sub>1</sub> <0,001	0 (0;1) p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> <0,001
Лимфоциты	2 (0; 3)	3 (2; 3) p <sub>1</sub> >0,05	2 (0; 4) p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> >0,05
Макрофаги	2 (2; 5)	4 (2; 6) p <sub>1</sub> >0,05	2 (0; 4) p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> <0,05

Примечание: в каждом случае приведены медиана, верхний и нижний квартили; p<sub>1</sub>, p<sub>2</sub> — по сравнению с ложнооперированными и с отрицательным контролем соответственно.

Таблица 3

**Концентрация провоспалительных цитокинов в сыворотке крови экспериментальных животных**

Группы	ФНО, пг/мл	ИЛ-1, пг/мл
Контроль (n=8)	9,5 (5,6; 11,6)	16,1 (13,9; 16,6)
Группа сравнения (n=6)	7,2 (6,8; 8,4) p <sub>1</sub> >0,05	14,9 (14,2; 15,6) p <sub>1</sub> >0,05
Отрицательный контроль (n=9)	15,7 (12,4; 16,5) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05	27,5 (23,6; 31,5) p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,05
Опытная группа (n=7)	7,6 (3,5; 8,4) p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> >0,05 p <sub>3</sub> <0,05	16,6 (12,2; 18,1) p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> >0,05 p <sub>3</sub> <0,05

Примечание: ФНО — фактор некроза опухоли альфа; ИЛ-1 — интерлейкин-1 бета; в каждом случае приведены медиана, нижний и верхний квартили. p<sub>1</sub> — по сравнению с животными группы контроля; p<sub>2</sub> — по сравнению с ложнооперированными животными; p<sub>3</sub> — по сравнению с животными группы отрицательного контроля.

в 2 раза. При этом количество фиброцитов в препаратах этих групп не имело статистически значимых различий (см. табл. 1). В составе лейкоцитарной инфильтрации перифокальной области скафолдов у животных группы отрицательного контроля преобладающими клеточными типами являлись лимфоциты и макрофаги, количество которых составляло в среднем 13 и 11% клеток соответственно. Кроме того, в составе клеточных популяций перифокальной области скафолда у животных данной группы обнаруживались полиморфоядерные лейкоциты, преимущественно нейтрофилы, количество которых статистически значимо выше, чем у ложнооперированных животных (см. табл. 1).

У животных группы отрицательного контроля наблюдали слабое заселение матрицы элементами фибробластического ряда, признаков ее васкуляризации не выявлено. Количество фибробластов и фиброцитов в матрице, не обладающей биосовместимостью, статистически значимо меньше, чем в соединительной ткани зоны имитации имплантации группы ложнооперированных крыс в 3 и 4,5 раза соответственно (табл. 2). В ПКЛ-скафолде с адсорбированным чужеродным белком наблюдали преобладание полиморфных лейкоцитов, которые составили

около 48% от общего числа клеток (см. табл. 2). Определялись лимфоциты и макрофаги, число которых достигало в среднем 11 и 15% (см. табл. 2).

У животных группы отрицательного контроля на 21-е сутки эксперимента обнаруживали статистически значимое повышение концентрации ФНО по сравнению с контролем в 1,7 раза, а по сравнению с ложнооперированными крысами в 2 раза (см. табл. 3). Выявлено также увеличение концентрации ИЛ-1 в 1,7 и 1,9 раза по сравнению с контролем и группой ложнооперированных животных соответственно (см. табл. 3).

На 21-е сутки эксперимента у животных опытной группы в перифокальной зоне ПКЛ/CaCO<sub>3</sub>-скафолда отмечали умеренное кровенаполнение сосудов микроциркуляторного русла. Отеков, лейкоцитарной инфильтрации признаков формирования ограничивающего барьера вокруг ПКЛ/CaCO<sub>3</sub>-скафолда у животных данной группы не выявлено. Преобладающим клеточным типом перифокальной области являлись фибробластические элементы. Так, при морфометрии установлено, что количество фибробластов и фиброцитов достигало 52 и 44% от общего числа клеток (см. табл. 1). При этом количество фибробластов в перифокальной области у животных

данной группы было в 2,3 раза меньше, чем вокруг матриц, не обладающих биосовместимостью, у крыс группы отрицательного контроля (см. табл. 1). Количество лейкоцитов, макрофагов и нейтрофилов в перифокальной области ПКЛ/СаСО<sub>3</sub>-скаффолда не имело статистически значимых различий в сравнении с клеточным составом тканей области имитации имплантации у ложнооперированных животных и было статистически значимо ниже по сравнению с перифокальной областью матриц, не обладающих биосовместимостью, у крыс группы отрицательного контроля (см. табл. 1).

На 21-е сутки после имплантации ПКЛ/СаСО<sub>3</sub>-скаффолд заселялся фибробластическими элементами и васкуляризировался. Количество фибробластов и фиброцитов в ПКЛ/СаСО<sub>3</sub>-скаффолде было в 2,5 раза больше, чем в матрицах, не обладающих биосовместимостью (см. табл. 2). Доля этих клеточных популяций составила 34 и 60% от общего числа клеток соответственно. В структуре ПКЛ/СаСО<sub>3</sub>-скаффолд обнаруживались единичные лейкоциты, количество которых не имело значимых различий при сравнении с клеточным составом соединительной ткани области имитации имплантации у ложнооперированных животных (см. табл. 2). Количество лейкоцитов в ПКЛ/СаСО<sub>3</sub>-скаффолдах было в 1,5–2 раза ниже, чем в скаффолдах, не обладающих биосовместимостью, у крыс группы отрицательного контроля (см. табл. 2).

Концентрации ФНО и ИЛ-1 в крови у животных опытной группы не отличались от таковых у крыс групп сравнения и контроля. Концентрации ФНО и ИЛ-1 в сыворотке крови крыс на 21-е сутки после имплантации ПКЛ/СаСО<sub>3</sub>-скаффолдов были в 2,1 и 1,7 раза меньше, чем у животных группы отрицательного контроля (см. табл. 3).

**Обсуждение.** Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что у ложнооперированных животных на 21-е сутки эксперимента отсутствуют как локальные признаки воспаления в зоне имитации имплантации матриц, так и системные проявления воспалительного ответа. Следовательно, к 21-м суткам эксперимента воспалительные изменения, индуцируемые травмой тканей при оперативном вмешательстве, нивелируются полностью.

У животных группы отрицательного контроля, в отличие от крыс группы сравнения, напротив, отмечаются выраженные воспалительные изменения в зоне имплантации матрицы с чужеродным белком. В ранее опубликованных работах было продемонстрировано, что при подкожной имплантации матриц с адсорбированным чужеродным белком локальные воспалительные сосудистые изменения стойкие и регистрируются в период с 7-х по 21-е сутки эксперимента [7–9]. При этом скаффолд, лишенный биосовместимости, не заселяется соединительнотканными элементами и не васкуляризуется, что также согласуется с ранее опубликованными данными [10]. Полученные данные свидетельствуют, что у животных группы отрицательного контроля отмечается выраженный подъем концентрации в крови провоспалительных цитокинов: ФНО и ИЛ-1, отражающий системные проявления воспалительного ответа. Повышенный уровень ФНО и ИЛ-1 у крыс при подкожной имплантации небюсовместимых скаффолдов объясняет механизм сосудистых изменений, описанный ранее. Следовательно, при подкожной имплантации скаффолдов, не обладающих биосовместимостью, у белых крыс возникает выраженная воспалительная

реакция, которая на 21-е сутки характеризуется типичными локальными и системными проявлениями.

Полученные результаты свидетельствуют, что при субкутанной имплантации ПКЛ/СаСО<sub>3</sub>-скаффолдов у белых крыс опытной группы, в отличие от группы отрицательного контроля, не отмечается локальных признаков воспаления в перифокальной области. Состав клеточных популяций перифокальной зоны ПКЛ/СаСО<sub>3</sub>-скаффолдов не имеет значимых отличий от соединительной ткани зоны имитации имплантации у крыс группы сравнения. Концентрация цитокинов в крови у крыс на 21-е сутки после имплантации ПКЛ/СаСО<sub>3</sub>-скаффолдов не отличается от интактных животных, что подтверждает отсутствие проявлений воспаления. При этом на 21-е сутки эксперимента наблюдается активное заселение ПКЛ/СаСО<sub>3</sub>-скаффолдов элементами соединительной ткани и его васкуляризация, что в совокупности с отсутствием воспалительных изменений перифокальной зоны свидетельствует о биосовместимости данного типа матриц.

В настоящее время наиболее перспективной концепцией разработки композитных скаффолдов для стимуляции регенерации костной ткани является сочетание в структуре таких матриц синтетических полимеров, в частности ПКЛ, и минеральных соединений [11–14]. Результаты ряда зарубежных исследований свидетельствуют о высокой степени биосовместимости матриц из ПКЛ, содержащих фосфатные соединения кальция как основы минеральной составляющей для костной ткани [11, 12, 14]. Так, продемонстрирована биосовместимость ПКЛ-скаффолдов, минерализованных гидроксиапатитом [14], бета-трифосфатом кальция [11, 12], а также двухфазным фосфатом кальция, представляющим собой смесь первых двух соединений [13]. Ранее проведенные собственные исследования согласуются с данными зарубежных авторов и подтверждают биосовместимость неминерализованных матриц из ПКЛ и минерализованных гидроксиапатитом [10].

Ватерит представляет собой наименее стабильную форму карбоната кальция [15]. *In vitro* продемонстрировано, что наночастицы из ватерита в гидрогелевых матрицах не обладают цитотоксичностью и при воздействии межклеточной жидкости или фосфатного буфера переходят в гидроксиапатит [15]. Вместе с тем в базе данных PubMed на сегодняшний день имеются только две работы [5, 16], посвященные матрицам из ПКЛ, минерализованным ватеритом. В частности, установлено, что ПКЛ/СаСО<sub>3</sub>-скаффолды имеют механические параметры, соответствующие губчатой кости человека, а также показана способность остеобластов к адгезии на этих матрицах в условиях *in vitro* [16]. Полученные при выполнении настоящей работы данные, касающиеся состава клеточных популяций матриц и отсутствия системных проявлений при их имплантации, подтверждают ранее опубликованные данные [5, 9] и позволяют сделать заключение, что ПКЛ/СаСО<sub>3</sub>-скаффолды по критериям биосовместимости не уступают аналогичным скаффолдам из поликапролактона.

**Заключение.** Отсутствие биосовместимости скаффолда проявляется воспалением в области его имплантации, что сопровождается характерным изменением состава клеточных популяций соединительной ткани перифокальной области. При этом клеточные популяции скаффолдов представлены в основном лейкоцитами, среди которых преобладают нейтрофилы. Локальные тканевые реакции ассоци-

ированы с системными проявлениями воспалительного ответа, характеризующегося повышением концентрации провоспалительных цитокинов: ФНО и ИЛ-1. При имплантации ПКЛ/CaCO<sub>3</sub>-скаффолдов как локальных, так и системных признаков воспаления в окружающих скаффолд тканях не отмечается. Состав же клеточных популяций скаффолдов характеризуется преобладанием клеток фибробластического ряда. Совокупность данных биохимических и морфометрических исследований позволяет констатировать высокую степень биосовместимости ПКЛ/CaCO<sub>3</sub>-скаффолдов и экспериментально обосновывает возможность их использования для тканевой инженерии.

**Конфликт интересов.** Работа выполнена в рамках государственного задания НИИТОН ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России «Разработка технологии оценки регенераторного потенциала матриц для замещения дефектов костной ткани на основе параметров их васкуляризации». Регистрационный номер АААА-А18-118020290178-3.

**Авторский вклад:** концепция и дизайн исследования — И.А. Норкин, А.Н. Иванов; получение данных — М.О. Куртукова, М.С. Савельева, Е.А. Галашина, Е.В. Гладкова; анализ данных — М.О. Куртукова, М.С. Савельева, Д.А. Тяпкина, С.В. Кустодов; интерпретация результатов — А.Н. Иванов, М.Н. Козадаев, И.О. Бугаева, Б.В. Парахонский; написание статьи — А.Н. Иванов, М.Н. Козадаев, Д.А. Тяпкина, С.В. Кустодов; утверждение рукописи для публикации — И.А. Норкин.

#### References (Литература)

1. Do AV, Khorsand B, Geary SM, et al. 3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications. *Adv Healthcare Mater* 2015; 4: 1742–62.
2. Ivanov AN, Norkin IA, Puchinyan DM. The possibilities and perspectives of using scaffold technology for bone regeneration. *Tsitologiya* 2014; 56 (8): 543–8. Russian (Иванов А.Н., Норкин И.А., Пучиньян Д.М. Возможности и перспективы использования скаффолд-технологий для регенерации костной ткани. *Цитология* 2014; 56 (8): 543–8).
3. Novochadov VV. The Problem of cell settling and remodeling of tissue-engineered matrices for regeneration of the articular cartilage. *Bulletin of Volgograd State University* 2013; 1 (5): 19–28. Russian (Новочадов В.В. Проблема управления клеточным заселением и ремоделированием тканеинженерных матриц для восстановления суставного хряща. *Вестник Волгоград. гос. ун-та* 2013; 1 (5): 19–28).
4. Mkhabela V, Ray SS. Biodegradation and bioresorption of poly (ε-caprolactone) nanocomposite scaffolds. *International Journal of Biological Macromolecules* 2015; 79: 186–92.
5. Saveleva MS, Ivanov AN, Kurtukova MO, et al. Hybrid PCL/CaCO<sub>3</sub> scaffolds with capabilities of carrying biologically active molecules: synthesis, loading and in vivo applications. *Materials Science & Engineering C—Materials for Biological Applications* 2018; 85: 57–67.
6. El-Fiqi A, Kim JH, Kim HW. Osteoinductive fibrous scaffolds of biopolymer / mesoporous bioactive glass nanocarriers with excellent bioactivity and long-term delivery of osteogenic drug. *ACS Appl Mater Interfaces* 2015; 7 (2): 1140–52.
7. Ivanov AN, Kozadaev MN, Puchinyan DM, et al. Microcirculatory changes during stimulation of tissue regeneration by scaffold based on the polycaprolactone. *Regional Blood Circulation and Microcirculation* 2015; 14 (54): 70–5. Russian (Иванов А.Н., Козадаев М.Н., Пучиньян Д.М. и др. Изменения микроциркуляции при стимуляции регенерации тканей скаффолдом на основе поликапролактона. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция* 2015; 14 (54): 70–5).
8. Ivanov AN, Kozadaev MN, Belova SV, et al. Comparative analysis of perfusion and dynamics of acute-phase markers of inflammatory response after polycaprolactone hydroxyapatite matrix implantation. *Modern Problems of Science and Education* 2016; 4: 15. Russian (Иванов А.Н., Козадаев М.Н., Белова С.В. и др. Сравнительный анализ перфузии и динамики маркеров острой фазы воспалительной реакции при имплантации матриц на основе поликапролактона и гидроксиапатита. *Современные проблемы науки и образования* 2016; 4: 15).
9. Norkin IA, Ivanov AN, Kurtukova MO, et al. Peculiarities of microcirculatory reactions after implantation subcutaneous polycaprolactone matrices, mineralized vaterite. *Saratov Journal of Medical Scientific Research* 2018; 14 (1): 35–41. Russian (Норкин И.А., Иванов А.Н., Куртукова М.О. и др. Особенности микроциркуляторных реакций при субкутанной имплантации поликапролактоновых матриц, минерализованных ватеритом. *Саратовский научно-медицинский журнал* 2018; 14 (1): 35–41).
10. Ivanov AN, Kozadaev MN, Bogomolova NV, et al. The study of the biocompatibility of the matrix based on polycaprolactone and hydroxyapatite in vivo. *Tsitologiya* 2015; 57 (4): 286–93. Russian (Иванов А.Н., Козадаев М.Н., Богомолова Н.В. и др. Исследование биосовместимости матриц на основе поликапролактона и гидроксиапатита в условиях in vivo. *Цитология* 2015; 57 (4): 286–93).
11. Bang LT, Ramesh S, Purbolaksono J, et al. Development of a bone substitute material based on alpha-tricalcium phosphate scaffold coated with carbonate apatite / poly-ε-caprolactone. *Biomed Mater* 2015; 10 (4): 045011.
12. Nyberg E, Rindone A, Dorafshar A, Grayson WL. Comparison of 3D-Printed Poly-ε-Caprolactone Scaffolds Functionalized with Tricalcium Phosphate, Hydroxyapatite, Bio-Oss, or Decellularized Bone Matrix. *Tissue Eng Part A* 2017; 23 (11-12): 503–14.
13. Thuaksuban N, Pannak R, Boonyaphiphat P, Monmaturapoj N. In vivo biocompatibility and degradation of novel Polycaprolactone-Biphasic Calcium phosphate scaffolds used as a bone substitute. *Biomed Mater Eng* 2018; 29 (2): 253–67.
14. Zomorodian A, Garcia MP, Moura E, et al. Biofunctional composite coating architectures based on polycaprolactone and nanohydroxyapatite for controlled corrosion activity and enhanced biocompatibility of magnesium AZ31 alloy. *Mater Sci Eng C Mater Biol App.* 2015; 48: 434–43.
15. Schroder R, Pohlit H, Schuler T, et al. Transformation of vaterite nanoparticles to hydroxycarbonate apatite in a hydrogel scaffold: relevance to bone formation. *Journal of Materials Chemistry B* 2015; 3: 7079–89.
16. Olah L, Borbas L. Properties of calcium carbonate-containing composite scaffolds. *Acta Bioeng Biomech* 2008; 10 (1): 61–6.