

ФИЗИОЛОГИЯ И ПАТОФИЗИОЛОГИЯ

УДК 612.15:616.5-089-74:615.47.014.47

Оригинальная статья

ОСОБЕННОСТИ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНЫХ РЕАКЦИЙ ПРИ СУБКУТАННОЙ ИМПЛАНТАЦИИ ПОЛИКАПРОЛАКТОНОВЫХ МАТРИЦ, МИНЕРАЛИЗОВАННЫХ ВАТЕРИТОМ

И. А. Норкин — НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, директор, профессор, доктор медицинских наук; **А. Н. Иванов** — НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, заведующий отделением лабораторной диагностики, ведущий научный сотрудник отдела фундаментальных и клинично-экспериментальных исследований, доктор медицинских наук; **М. О. Куртукова** — ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, доцент кафедры гистологии, кандидат медицинских наук; **М. С. Савельева** — ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского», Образовательно-научный институт наноструктур и биосистем, аспирант; **А. В. Мартюкова** — ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, студент; **Д. А. Горин** — Сколковский институт науки и технологий, Центр фотоники и квантовых материалов, профессор, доктор химических 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.

PECULIARITIES OF MICROCIRCULATORY REACTIONS AFTER SUBCUTANEOUS IMPLANTATION OF POLYCAPROLACTONE MATRICES MINERALIZED BY VATERITE

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, Doctor of Medical Sciences, Professor; **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, Leading 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. S. Savelyeva** — Saratov National Research University n.a. N. G. Chernyshevsky, Educational and Research Institute of Nanostructures and Biosystems, Post-graduate; **A. V. Martyukova** — Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Department of General Medicine, Student; **D. A. Gorin** — Skolkovo Institute of Science and Technology, Center of Photonics and Quantum Materials, Professor, Doctor of Chemical 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.

Дата поступления — 19.12.2017 г.

Дата принятия в печать — 20.02.2018 г.

Норкин И. А., Иванов А. Н., Куртукова М. О., Савельева М. С., Мартюкова А. В., Горин Д. А., Парахонский Б. В. Особенности микроциркуляторных реакций при субкутанной имплантации поликапролактоновых матриц, минерализованных ватеритом. Саратовский научно-медицинский журнал 2018; 14 (1): 35–41.

Цель: оценка изменений микроциркуляции кожи, возникающих при подкожной имплантации поликапролактоновых скаффолдов, минерализованных ватеритом. **Материал и методы.** Эксперимент выполнен на 30 белых крысах, разделенных на две группы: отрицательного контроля и опытную. В группе отрицательного контроля крысам подкожно имплантировали поликапролактоновый скаффолд с адсорбированным чужеродным белком. В опытной группе животным подкожно имплантировали матрицу из поликапролактона, минерализованную ватеритом. Методы исследования включали лазерную доплеровскую флоуметрию и морфологическое исследование тканей области имплантации матриц. **Результаты.** Изменения микроциркуляции кожи над областью размещения матриц соответствуют морфологической картине тканевых реакций. Нарушения биосовместимости проявляются воспалением в области имплантации скаффолдов, что сопровождается стойким повышением перфузии, ассоциированным с изменением модуляции локального кровотока. При имплантации поликапролактоновых матриц, минерализованных ватеритом, признаков воспаления в окружающих скаффолд тканях не отмечается. При этом локальные микроциркуляторные реакции носят транзиторный характер, полностью исчезая к 21-м суткам после имплантации. **Заключение.** Совокупность данных функциональных и морфологических исследований позволяет констатировать высокую степень биосовместимости поликапролактоновых матриц, минерализованных ватеритом, что обуславливает перспективы их применения для стимуляции регенерации тканей.

Ключевые слова: регенерация, скаффолды, поликапролактон, ватерит, микроциркуляция.

Norkin IA, Ivanov AN, Kurtukova MO, Savelyeva MS, Martyukova AV, Gorin DA, Parakhonsky BV. Peculiarities of microcirculatory reactions after subcutaneous implantation of polycaprolactone matrices mineralized by vaterite. Saratov Journal of Medical Scientific Research 2018; 14 (1): 35–41.

The aim is to assess skin microcirculation changes arising during subcutaneous implantation of polycaprolactone scaffolds mineralized by vaterite. *Material and Methods.* The experiment was carried out on 30 albino rats divided into two groups: a negative control group and an experimental one. We implanted polycaprolactone scaffold with exhausted foreign protein subcutaneously into rats of the negative control group. We implanted polycaprolactone matrix mineralized by vaterite subcutaneously into the animals of the experimental group. Research methods include laser Doppler flowmetry and morphological examination of the tissues of the matrix implantation area. *Results.* Changes of skin microcirculation over the matrix allocation area correspond to the morphological pattern of tissue reactions. Biocompatibility disorders take the form of inflammation in the scaffold implantation area that is accompanied by stable perfusion rise associated with local bloodstream modulation changes. We did not observe inflammation signs in the surrounding scaffold tissues during implantation of polycaprolactone matrices mineralized by vaterite. Besides local microcirculatory reactions possess a transient character disappearing completely by the 21st day after the implantation. *Conclusion.* Complex of the given functional and morphological studies allow us to ascertain high-grade biocompatibility of polycaprolactone matrices mineralized by vaterite thus giving rise to prospect of their use for tissue regeneration stimulation.

Key words: regeneration, scaffolds, polycaprolactone, vaterite, microcirculation.

Введение. Проблема стимуляции регенерации тканей имеет большое значение во многих областях медицины, в частности в травматологии и ортопедии. Среди возможных способов решения данной проблемы выделяются технологии тканевой инженерии, направленные на разработку и создание скаффолдов или матриц, которые способны структурно и функционально замещать межклеточный матрикс, что способствует регенерации поврежденных тканей [1]. К скаффолдам для стимуляции регенерации скелетных тканей предъявляется ряд специальных требований, в частности длительный период биодеградации, а также наличие особых механических характеристик [1]. В связи с этим для их изготовления используют синтетические полимеры, обладающие соответствующими свойствами, в частности поликапролактон [2]. Вместе с тем, учитывая высокую степень минерализации межклеточного вещества костной ткани, в состав скаффолдов для стимуляции ее регенерации целесообразно включение неорганических компонентов, позволяющих добиться оптимальных osteoconductive и osteoinductive свойств. Наиболее часто с этой целью используют гидроксипатит, который является основным минеральным компонентом костной ткани [3, 4].

В качестве альтернативы фосфатным соединениям используют карбонат кальция в форме кальцита и ватерита, который, так же как и гидроксипатит, обладает способностью стимулировать пролиферацию osteoblastов. При этом дополнительным преимуществом ватерита является его пористая структура, обеспечивающая возможность адсорбции различных веществ и их высвобождения при перекристаллизации, что может быть использовано в качестве системы адресной доставки биоактивных молекул, необходимых для репаративных процессов [5].

Вне зависимости от планируемой области применения обязательным свойством скаффолдов является биосовместимость. Согласно межгосударственному стандарту ГОСТ-ИСО одним из важных этапов оценки биосовместимости являются имплантационные тесты. Так, наиболее широко используются модели субкутанной имплантации у белых крыс, что обусловлено хорошей васкуляризацией и интенсивным метаболизмом соединительных тканей подкожной клетчатки. Система микроциркуляции динамически изменяется при сдвигах гомеостаза [6, 7], т.е., по сути, является «зеркалом» функционального состояния ткани. Перспективным для оценки реакции на имплантацию скаффолда представляется использовать параметры тканевой перфузии.

Цель: оценка изменений микроциркуляции кожи, возникающих при подкожной имплантации поликапролактоновых скаффолдов, минерализованных ватеритом.

Материал и методы. Исследования выполнены на 30 белых беспородных крысах-самцах массой 200–250 г, разделенных на две группы. Группа отрицательного контроля включала 15 животных, которым подкожно имплантировали скаффолд из поликапролактона с адсорбированным чужеродным белком (матрица, не обладающая биосовместимостью); опытная группа состояла из 15 животных, которым подкожно имплантировали матрицу из поликапролактона, минерализованную ватеритом.

При проведении экспериментов соблюдали этические принципы в соответствии с Хельсинкской декларацией 1975 г. и ее пересмотром в 1983 г. При работе с экспериментальными животными руководствовались требованиями приказа Министерства здравоохранения РФ от 23 августа 2010 г. №708-н «Об утверждении Правил лабораторной практики». Всех животных за 5 минут до проведения манипуляций наркотизировали введением внутримышечно комбинации золетила (Virbac Sante Animale, Франция) в дозе 0,1 мл/кг и ксилазина (Interchemie, Нидерланды) в дозе 1 мг/кг.

Скаффолды были изготовлены Образовательно-научным институтом наноструктур и биосистем Саратовского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского. Средняя толщина волокон матриц составляла 0,6 мкм. Матрицы были имплантированы в межлопаточную область экспериментальных животных. Для этого после обработки операционного поля проводили разрез кожи. В ране под кожей с помощью браншей пинцета формировался карман размерами около 15х15 мм, в который помещался скаффолд в форме диска диаметром 10 мм, после чего рана ушивалась наглухо.

Микроциркуляцию кожи над областью размещения скаффолдов исследовали методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) с помощью анализатора «ЛАКК-ОП» (производство НПП «Лазма», Россия) и программы LDF 3.0.2.395. Регистрацию ЛДФ-грамм выполняли у всех животных на 7-е, 14-е и 21-е сутки эксперимента. В качестве контроля использовали ЛДФ-граммы животных, зарегистрированные до проведения оперативного вмешательства (интактные животные). При исследовании микроциркуляции определяли показатель перфузии в перфузионных единицах и с помощью вейвлет-анализа рассчитывали нормированные амплитуды эндотелиальных, нейрогенных и миогенных колебаний, позволяющих оценить состояние соответствующих активных механизмов модуляции микрокровотока. Для оценки пассивных механизмов модуляции кровотока

Ответственный автор — Иванов Алексей Николаевич
Тел.: +79272799599
E-mail: lex558452@gmail.com

проводили исследование амплитуд колебаний перфузии в дыхательном и сердечном (кардиальном) диапазонах.

На 21-е сутки животные были выведены из эксперимента путем передозировки препаратов для наркоза. С целью верификации результатов функциональных тестов проводилось гистологическое исследование скаффолда в комплексе с окружающими его мягкими тканями. Материал для морфологического исследования фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина (ООО «Биовитрум», Россия), обезвоживали в спиртах, после чего для выполнения срезов препараты заливали в парафин. Срезы толщиной 5–10 мкм окрашивали гематоксилином Майера (ООО «Биовитрум», Россия) и эозином (ООО «Биовитрум», Россия). Для покрытия срезов применяли среду Bio-Monht (Bio Optica, Италия). Препараты исследовали при помощи микроскопа Axiolmager Z2 (Carl Zeiss, Германия).

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. 1. Изменения микроциркуляции кожи при субкутанной имплантации скаффолдов, не обладающих биосовместимостью. Для оценки особенностей микроциркуляторных реакций при имплантации небюсовместимых матриц была сформирована группа отрицательного контроля,

включающая белых крыс, которым подкожно имплантировали поликапролактоновые скаффолды с адсорбированным чужеродным белком. В результате проведенного эксперимента обнаружено, что у животных группы отрицательного контроля на 7-е сутки после оперативного вмешательства перфузия кожи над областью размещения поликапролактоновой матрицы, содержащей чужеродный белок, на 80% превышает контрольные значения. При этом отмечаются выраженные изменения как активных, так и пассивных механизмов модуляции кровотока, что проявляется повышением абсолютных амплитуд колебаний перфузии в эндотелиальном, нейрогенном и миогенном, а также дыхательном и кардиальном частотных диапазонах соответственно (табл. 1). При сравнении амплитуд, нормированных по среднеквадратическому отклонению перфузии, у животных, которым выполнялась имплантация скаффолда с чужеродным белком, отмечается значимое увеличение осцилляций перфузии в миогенном и нейрогенном диапазонах (табл. 2).

На 14-е сутки после имплантации поликапролактоновых матриц с чужеродным белком у животных отмечается двукратное увеличение перфузии кожи над зоной размещения скаффолдов (см. табл. 1). Через 2 недели после имплантации матриц, не обладающих биосовместимостью, как и на 7-е сутки эксперимента, у животных отмечается изменение активной модуляции кровотока. Однако на 14-е сутки статистически значимо увеличенными остаются только абсолютные значения амплитуд в нейрогенном и миогенном диапазонах. При этом статистически значимое повышение нормированных амплитуд колебаний перфузии отмечается только в миогенном частотном диапазоне (см. табл. 2). Изменения ам-

Таблица 1

Изменения перфузии кожи и абсолютных значений амплитуд ее колебаний в различных диапазонах при имплантации скаффолда с чужеродным белком

Показатели		Группы			
		Контроль	После оперативного вмешательства		
			7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки
Показатель перфузии, перф. ед.		11,1 (9,6; 12,5)	18,4 (16,8; 20) $p_1=0,000013$	21 (19,2; 25,2) $p_1=0,000036$ $p_2=0,069787$	21,7 (15,9; 27,8) $p_1=0,000036$ $p_2=0,262311$ $p_3=0,696850$
Абсолютная амплитуда колебаний, перф. ед.	эндотелиальных	0,34 (0,16; 0,51)	0,64 (0,51; 0,78) $p_1=0,010415$	0,62 (0,25; 0,8) $p_1=0,067175$ $p_2=0,692380$	0,49 (0,33; 0,74) $p_1=0,212004$ $p_2=0,166145$ $p_3=0,596702$
	нейрогенных	0,19 (0,15; 0,25)	0,42 (0,27; 0,47) $p_1=0,000636$	0,28 (0,19; 0,35) $p_1=0,037515$ $p_2=0,0,75023$	0,29 (0,26; 0,32) $p_1=0,001724$ $p_2=0,129375$ $p_3=0,733730$
	миогенных	0,18 (0,15; 0,21)	0,4 (0,29; 0,51) $p_1=0,000128$	0,3 (0,24; 0,4) $p_1=0,003921$ $p_2=0,222521$	0,26 (0,19; 0,29) $p_1=0,000475$ $p_2=0,146882$ $p_3=0,623177$
	дыхательных	0,22 (0,16; 0,3)	0,3 (0,27; 0,35) $p_1=0,0358990$	0,21 (0,16; 0,24) $p_1=0,760302$ $p_2=0,0,51755$	5,25 (3,65; 8,52) $p_1=0,560274$ $p_2=0,099261$ $p_3=0,520523$
	кардиальных	0,1 (0,08; 0,14)	0,15 (0,11; 0,18) $p_1=0,031796$	0,12 (0,11; 0,13) $p_1=0,107698$ $p_2=0,531046$	0,13 (0,12; 0,15) $p_1=0,030516$ $p_2=0,766680$ $p_3=0,150928$

Примечания: в каждом случае приведены медиана, верхний и нижний квартили; p_1 , p_2 , p_3 — по сравнению с контролем, 7-ми и 14-ми сутками после операции соответственно.

Изменения нормированных амплитуд колебаний перфузии кожи у животных при имплантации скаффолда с чужеродным белком

Показатели	Контроль	Группы			
		После оперативного вмешательства			
		7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	
Нормированная амплитуда колебаний, отн. ед.	эндотелиальных	14,75 (7,6; 17,8)	15,9 (14,3; 19,2) $p_1=0,179642$	16,7 (12,7; 20,9) $p_1=0,090678$ $p_2=0,766680$	14,5 (12,1; 18,3) $p_1=0,677392$ $p_2=0,373379$ $p_3=0,689122$
	нейрогенных	7,78 (6,69; 8,48)	9,4 (8,2; 12) $p_1=0,015721$	8,7 (6,7; 10,7) $p_1=0,637287$ $p_2=0,306763$	9,9 (8,5; 10,8) $p_1=0,048923$ $p_2=0,973699$ $p_3=0,102899$
	миогенных	6,94 (6,08; 9,97)	9,6 (8,1; 12,8) $p_1=0,029903$	9,3 (7,8; 11,4) $p_1=0,015825$ $p_2=0,817483$	9,8 (9,2; 10,7) $p_1=0,006037$ $p_2=0,973699$ $p_3=0,518131$
	дыхательных	8,9 (6,38; 10,73)	7,7 (6; 8,7) $p_1=0,231901$	6,6 (5,6; 8,7) $p_1=0,071424$ $p_2=0,620928$	6,7 (6,2; 8,6) $p_1=0,279402$ $p_2=0,973699$ $p_3=0,600878$
	кардиальных	3,6 (3,26; 4,47)	3,77 (3,3; 4,5) $p_1=0,980536$	3,25 (2,8; 5,8) $p_1=0,523536$ $p_2=0,973699$	4,8 (3,1; 5,35) $p_1=0,560274$ $p_2=0,276606$ $p_3=0,185759$

Примечания: в каждом случае приведены медиана, верхний и нижний квартили; p_1 , p_2 , p_3 — по сравнению с контролем, 7-ми и 14-ми сутками после операции соответственно.

плитуд колебаний, характеризующих пассивную модуляцию микрокровотока, в частности, дыхательных и сердечных осцилляций, на 14-е сутки в группе отрицательного контроля не выражены (см. табл. 1, 2).

В период с 14-х по 21-е сутки эксперимента у животных группы отрицательного контроля перфузия кожи над областью имплантации матрицы с чужеродным белком не претерпевает значимых изменений. При этом также сохраняется повышение значений абсолютных амплитуд колебаний перфузии в нейрогенном и миогенном диапазонах, отражающих изменение активной модуляции кровотока (см. табл. 1). Повышение вклада нейрогенного и миогенного механизмов в модуляцию перфузии подтверждают увеличенные значения нормированных амплитуд колебаний в соответствующих диапазонах. Изменения пассивной модуляции кровотока у животных данной группы выражаются повышением абсолютных, но не нормированных значений амплитуды кардиальных колебаний (см. табл. 1, 2).

2. Морфологические изменения тканей в области имплантации матриц, не обладающих биосовместимостью. Для верификации нарушений, обнаруженных с помощью лазерной доплеровской флоуметрии, проведен анализ морфологических изменений, возникающих при подкожной имплантации белым крысам поликапролактоновых матриц с адсорбированным чужеродным белком. При гистологическом исследовании на 21-е сутки после имплантации вокруг скаффолда с адсорбированным чужеродным белком наблюдается сформированный соединительнотканый барьер, который инфильтрирован лейкоцитами, преимущественно лимфоцитами и плазматическими клетками. Сосуды мягких тканей области имплантации неравномерно наполнены кровью — в большей части как артериального, так и венозного русла отмечается полнокровие. В отдельных участках обнаруживаются признаки свежих и

старых мелкоочаговых кровоизлияний, включая неизмененные эритроциты за пределами сосудистого русла, а также гемосидерин и сидерофаги. На 21-е сутки эксперимента скаффолд инфильтрирован нейтрофилами, на поверхности матрицы формируются гигантские многоядерные клетки. Васкуляризации и заселения скаффолда клетками соединительной ткани при этом не происходит.

3. Изменения микроциркуляции кожи при субкутанной имплантации поликапролактоновых скаффолдов, минерализованных ватеритом. У животных опытной группы через 7 дней после имплантации поликапролактоновых скаффолдов, минерализованных ватеритом, отмечается статистически значимое увеличение перфузии кожи над зоной размещения матрицы в среднем на 14%. При этом показатель перфузии статистически значимо ниже, чем у животных группы отрицательного контроля в тот же срок наблюдения. В опытной группе животных повышение перфузионного показателя на 7-е сутки эксперимента в отличие от группы отрицательного контроля не сопровождается значимыми изменениями как активной, так и пассивной модуляции кровотока. Абсолютные значения амплитуд в основных регуляторных диапазонах у этих животных находятся в пределах вариабельности контроля (табл. 3). Перераспределение вклада различных механизмов в модуляцию кровотока также не выражено и проявляется только снижением активности пассивных дыхательных колебаний, что выражается уменьшением их нормированной амплитуды (табл. 4).

На 14-е сутки эксперимента у животных опытной группы повышение перфузионного показателя кожи над областью размещения минерализованной ватеритом матрицы нивелируется, и его значения достигают пределов вариабельности контроля. Так же как и на 7-е сутки эксперимента, изменений модуляции микрокровотока в зоне имплантации не отмечается:

Таблица 3

Изменения перфузии кожи и абсолютных значений амплитуд ее колебаний в различных диапазонах при имплантации скаффолда, минерализованного ватеритом

Показатели		Группы			
		Контроль	После оперативного вмешательства		
			7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки
Показатель перфузии, перф. ед.		11,1 (9,6; 12,5)	12,6 (11,7; 13,8) $p_1=0,027027$ $p_{ок}=0,000051$	12,3 (11,4; 13,3) $p_1=0,065411$ $p_2=0,505239$ $p_{ок}=0,000124$	11,4 (10,6; 12,7) $p_1=0,479239$ $p_2=0,091763$ $p_3=0,196199$ $p_{ок}=0,000131$
Абсолютная амплитуда колебаний, перф. ед.	эндотелиальных	0,34 (0,16; 0,51)	0,46 (0,27; 0,50) $p_1=0,518983$ $p_{ок}=0,047108$	0,25 (0,21; 0,90) $p_1=0,677996$ $p_2=0,772059$ $p_{ок}=0,622066$	0,35 (0,18; 0,51) $p_1=0,678320$ $p_2=0,355134$ $p_3=0,644373$ $p_{ок}=0,121252$
	нейрогенных	0,19 (0,15; 0,25)	0,21 (0,18; 0,35) $p_1=0,381443$ $p_{ок}=0,017978$	0,17 (0,14; 0,24) $p_1=0,550608$ $p_2=0,400864$ $p_{ок}=0,037772$	0,23 (0,15; 0,3) $p_1=0,961083$ $p_2=0,549626$ $p_3=0,1538253$ $p_{ок}=0,044315$
	миогенных	0,18 (0,15; 0,21)	0,2 (0,15; 0,24) $p_1=0,433563$ $p_{ок}=0,000822$	0,19 (0,16; 0,22) $p_1=0,585789$ $p_2=0,816735$ $p_{ок}=0,012426$	0,19 (0,13; 0,21) $p_1=0,329115$ $p_2=0,264829$ $p_3=0,230085$ $p_{ок}=0,003717$
	дыхательных	0,22 (0,16; 0,30)	0,19 (0,12; 0,22) $p_1=0,146765$ $p_{ок}=0,009776$	0,19 (0,12; 0,22) $p_1=0,127321$ $p_2=0,783799$ $p_{ок}=0,022104$	0,24 (0,1; 0,35) $p_1=0,150023$ $p_2=0,605344$ $p_3=0,877717$ $p_{ок}=0,113533$
	кардиальных	0,1 (0,08; 0,14)	0,09 (0,07; 0,11) $p_1=0,166985$ $p_{ок}=0,002775$	0,08 (0,07; 0,09) $p_1=0,058588$ $p_2=0,523929$ $p_{ок}=0,000430$	0,11 (0,08; 0,13) $p_1=0,494525$ $p_2=0,567916$ $p_3=0,340105$ $p_{ок}=0,032115$

Примечания: в каждом случае приведены медиана, верхний и нижний квартили; p_1, p_2, p_3 — по сравнению с контролем, 7-ми и 14-ми сутками после операции соответственно; $p_{ок}$ — по сравнению с группой отрицательного контроля в тот же срок наблюдения.

абсолютные значения амплитуд колебаний перфузии в основных регуляторных диапазонах не имеют отличий от контроля (см. табл. 3). Динамики нормированных амплитуд колебаний по сравнению с 7-ми сутками эксперимента у животных данной группы также не отмечено (см. табл. 4).

Через 21 сутки после имплантации матриц из поликапролактона, содержащих ватерит, перфузионный показатель кожи над областью их размещения, абсолютные и нормированные амплитуды колебаний перфузии в эндотелиальном, нейрогенном, миогенном, дыхательном и сердечном диапазонах у животных опытной группы не имеют статистически значимых отличий от группы контроля. При этом перфузия над областью имплантации матриц, абсолютные значения амплитуд нейрогенных и кардиальных колебаний, а также абсолютные и нормированные амплитуды осцилляций в миогенном диапазоне у животных данной группы статистически значимо ниже соответствующих показателей группы отрицательного контроля в тот же срок наблюдения (см. табл. 3, 4).

4. Морфологические изменения тканей в области имплантации поликапролактоновых матриц, минерализованных ватеритом. При морфологическом исследовании тканей области имплантации поликапролактоновых матриц, минерализованных ватеритом, на 21-е сутки эксперимента в перифокальной области в отличие от группы отрицательного контроля признаков воспалительной реакции, включая отек, полнокровие сосудов, лейко-

цитарную инфильтрацию, не обнаружено. На границе матрицы обнаруживается большое число мелких сосудов и множественные мелкоочаговые свежие кровоизлияния, вероятно обусловленные травматизацией сосудов при извлечении матрицы. Матрица плотно заселена клетками соединительной ткани — фибробластами и фиброцитами, в составе матрицы в отдельных полях зрения обнаруживаются единичные лейкоциты — лимфоциты, макрофаги. Скаффолд, минерализованный ватеритом, интенсивно васкуляризован.

Обсуждение. Изменения кровотока кожи над областью имплантации скаффолда, содержащего чужеродный белок, регистрируются с 7-х по 21-е сутки эксперимента и характеризуются стойким увеличением перфузионного показателя, которое ассоциировано с изменением как активных (эндотелиальный, нейрогенный и миогенный), так и пассивных (дыхательный и сердечный) механизмов модуляции микроциркуляции. На 7-е сутки после имплантации этих матриц отмечается эндотелийзависимая дилатация артериол, что проявляется увеличением амплитуды колебаний в соответствующем диапазоне, уменьшением нейрогенного тонуса и сопротивления артериол, характеризуется повышением амплитуды нейрогенных колебаний, снижением мышечного тонуса прекапилляров, выражается ростом амплитуд миогенных осцилляций [8]. Изменения активной модуляции сопровождаются динамикой пассивных колебаний кровотока в микроциркуляторном русле, что

Изменения нормированных амплитуд колебаний перфузии кожи при имплантации скаффолда, минерализованного ватеритом

Показатели	Группы				
	Контроль	После оперативного вмешательства			
		7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	
Нормированная амплитуда колебаний, отн. ед.	эндотелиальных	14,75 (7,6; 17,8)	12,2 (10,8; 15,2) $p_1=0,853809$ $p_{ок}=0,053491$	10,5 (8,27; 17,7) $p_1=0,640429$ $p_2=0,451345$ $p_{ок}=0,130031$	10,2 (7,49; 12,87) $p_1=0,102127$ $p_2=0,086645$ $p_3=0,689122$ $p_{ок}=0,044315$
	нейрогенных	7,78 (6,69; 8,48)	6,7 (5,6; 9,36) $p_1=0,407005$ $p_{ок}=0,036250$	5,12 (4,56; 7,32) $p_1=0,033346$ $p_2=0,202450$ $p_{ок}=0,026544$	8 (4,94; 9,65) $p_1=0,980536$ $p_2=0,849015$ $p_3=0,102899$ $p_{ок}=0,106207$
	миогенных	6,94 (6,08; 9,97)	6,85 (5,32; 8,01) $p_1=0,433563$ $p_{ок}=0,007093$	6,31 (3,92; 7,85) $p_1=0,212913$ $p_2=0,486906$ $p_{ок}=0,006707$	6,54 (4,46; 9,02) $p_1=0,251514$ $p_2=0,849015$ $p_3=0,518131$ $p_{ок}=0,001384$
	дыхательных	8,9 (6,38; 10,73)	5,89 (4,05; 7,54) $p_1=0,009890$ $p_{ок}=0,097121$	5,22 (1,73; 6,83) $p_1=0,001077$ $p_2=0,297015$ $p_{ок}=0,097962$	6,25 (3,65; 8,52) $p_1=0,058133$ $p_2=0,723674$ $p_3=0,600878$ $p_{ок}=0,198517$
	кардиальных	3,6 (3,26; 4,47)	2,74 (2,43; 4,11) $p_1=0,080036$ $p_{ок}=0,221014$	2,73 (1,04; 3,54) $p_1=0,008124$ $p_2=0,202450$ $p_{ок}=0,097962$	2,84 (2,49; 4,86) $p_1=0,317167$ $p_2=0,369463$ $p_3=0,185759$ $p_{ок}=0,222521$

Примечания: в каждом случае приведены медиана, верхний и нижний квартили; p_1 , p_2 , p_3 — по сравнению с контролем, 7-ми и 14-ми сутками после операции соответственно; $p_{ок}$ — по сравнению с группой отрицательного контроля в тот же срок наблюдения.

проявляется повышением их амплитуд в дыхательном и кардиальном диапазоне, отражая затруднения оттока крови и повышение ее притока в систему микроциркуляции [8]. При этом баланс механизмов контроля микроциркуляции перераспределяется в пользу нейрогенного и миогенного компонентов, что проявляется ростом соответствующих нормированных амплитуд [8]. Снижение нейрогенного и миогенного тонуса прекапиллярного звена при повышенной перфузии свидетельствует о гиперемическом типе микрогемодинамики [8], что обусловлено процессом воспаления в области имплантации матрицы, не обладающей биосовместимостью, развитие которого подтверждают результаты морфологических изменений в тканях, окружающих скаффолд с чужеродным белком. Наиболее стойкими являются нарушения миогенного контроля микроциркуляции, так как изменения абсолютных и нормированных амплитуд миогенных колебаний регистрируются без существенной динамики на протяжении всего эксперимента, что свидетельствует о выраженной гипоксии и ацидозе тканей [8] в области имплантации матриц с адсорбированным чужеродным белком.

При подкожной имплантации крысам поликапролактоновых матриц, минерализованных ватеритом, наблюдаются транзиторные сдвиги перфузионного показателя, не сопровождающиеся выраженными изменениями активной и пассивной модуляции кровотока в микроциркуляторном русле. Подобные паттерны микроциркуляторных изменений наблюдались ранее при имплантации неминерализованных матриц из поликапролактона и минерализованных гидроксипатитом. Полная нормализация перфузии кожи и модуляции микрокровотока к 21-м суткам после субкутанной имплантации свидетельствует о

биосовместимости матриц [9, 10], что подтверждают полученные в ходе данного исследования морфологические данные, согласно которым скаффолды, содержащие ватерит, колонизируются соединительнотканскими элементами и васкуляризируются, не вызывая выраженной воспалительной реакции в тканях перифокальной области.

Закключение. Представленные экспериментальные данные позволяют заключить, что изменения микроциркуляции кожи над областью размещения матриц соответствуют морфологической картине тканевых реакций. Нарушения биосовместимости проявляются воспалением в области имплантации скаффолдов, что сопровождается стойким повышением перфузии, ассоциированным с изменением модуляции локального кровотока. При имплантации поликапролактоновых матриц, минерализованных ватеритом, признаков воспаления в окружающих скаффолд тканях не отмечается. При этом локальные микроциркуляторные реакции носят транзиторный характер, полностью исчезая к 21-м суткам после имплантации. Совокупность данных функциональных и морфологических исследований позволяет констатировать высокую степень биосовместимости поликапролактоновых матриц, минерализованных ватеритом, что обуславливает перспективы их применения для стимуляции регенерации тканей.

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, А.В. Мартюкова; анализ данных — М.О. Куртукова, М.С. Савельева, А.Н. Иванов; интерпретация результатов — А.Н. Иванов, Д.А. Горин, Б.В. Парахонский; написание статьи — А.Н. Иванов; утверждение рукописи для публикации — И.А. Норкин.

References (Литература)

1. Dorj B, Won JE, Kim JH, Choi SJ, Shin US, Kim HW. Robocasting nanocomposite scaffolds of poly (caprolactone)/hydroxyapatite incorporating modified carbon nanotubes for hard tissue reconstruction. *J Biomed Mater Res A* 2013; 101 (6): 1670–1681.
2. Seyednejad H, Gawlitta D, Kuiper RV, de Bruin A, van Nostrum CF, Vermonden T, Dhert WJ, Hennink WE. In vivo biocompatibility and biodegradation of 3D-printed porous scaffolds based on a hydroxyl-functionalized poly (ϵ -caprolactone). *Biomaterials* 2012; 33: 4309–4318.
3. Ivanov AN, Kozadaev MN, Bogomolova NV, et al. In vivo evaluation of polycaprolactone-hydroxyapatite scaffold biocompatibility. *Tsitologiya* 2015; 57 (4): 286–293. 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): 286–293).
4. Chuenjitkuntaworn B, Inrung W, Damrongsri D, et al. Polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffolds: preparation, characterization, and in vitro and in vivo biological responses of human primary bone cells. *J Biomed Mater Res A* 2010; 94: 241–251.
5. Parakhonskiy BV, Haase A, Antolini R. Sub-Micrometer Vaterite Containers: Synthesis, Substance Loading, and Release. *Angewandte Chemie International Edition* 2012; 51 (5): 1195–1197.
6. 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).
7. Krupatkin AI. Information aspects of microcirculation after surgical sympathectomy in posttraumatic complex regional pain syndrome. *Neuroscience and Behavioral Physiology* 2013; 113 (6-1): 17–21. Russian (Крупаткин А.И. Информационные аспекты состояния микроциркуляции после десимпатизирующих операций при посттравматическом комплексном регионарном болевом синдроме. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова* 2013; 113 (6-1): 17–21).
8. Ivanov AN, Kozadaev MN, Puchinyan DM, et al. Microcirculatory changes during stimulation of tissue regeneration by polycaprolactone scaffold. *Regional Haemodynamics and Microcirculation* 2015; 14 (54): 70–75. 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): 70–75).
9. Starikov VV, Rudchenko SO. Optimization of composite properties on the base of hydroxyapatite and chitosan by its composition and condition variation. *Herald of Khmelnytsk National University* 2010; 915: 35–39. Russian (Стариков В.В., Рудченко С.О. Оптимизация свойств композита на основе гидроксиапатита и хитозана путем вариации его состава и режимов. *Вісник Хмельницького національного університету* 2010; 915: 35–39).