

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ И ДИНАМИКИ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ СКАФФОЛДОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА И ПОЛИКАПРОЛАКТОНА С ГИДРОКСИАПАТИТОМ ПРИ СУБКУТАННОЙ ИМПЛАНТАЦИИ

Козадаев М.Н., Иванов А.Н., Пучиньян Д.М., Норкин И.А.

Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии, Саратов, Россия (410002, Саратов, ул. Чернышевского, 148), e-mail: m_kozadaev_ortoped@mail.ru

Активное развитие тканеинженерных технологий представляет собой один из возможных путей решения актуальной проблемы регенерации и восстановления утраченных тканей. Ключевое значение в развитии технологий тканевой инженерии является разработка и создание 3-х мерных скаффолдов – матриц, которые могут выступать в качестве субстрата для заселения клетками, стимулируя процесс регенерации. В данной экспериментальной работе представлены результаты сравнительного анализа микроциркуляторных изменений и динамики клеточных популяций скаффолдов на основе поликапролактона (ПКЛ) и матриц на основе ПКЛ с гидроксиапатитом (ГА). Результаты исследования позволяют сделать заключение о том, что при подкожной имплантации оба скаффолда способны к интеграции в соединительную ткань в условиях *in vivo*, активно заселяются соединительнотканными элементами и васкуляризируются, на фоне незначительных реактивных изменений. Однако при подкожной имплантации матрицы на основе ПКЛ и ГА отличаются меньшей скоростью заселения соединительнотканными элементами по сравнению с ПКЛ-скаффолдами.

Ключевые слова: скаффолд, поликапролактон, гидроксиапатит, биосовместимость.

COMPARATIVE ANALYSIS OF MICROCIRCULATORY CHANGES AND CELL POPULATIONS DYNAMICS OF POLYCAPROLACTONE AND POLYCAPROLACTONE-HYDROXYAPATITE SCAFFOLDS AFTER SUBCUTANEOUS IMPLANTATION

Kozadaev M.N., Ivanov A.N., Puchinyan D.M., Norkin I.A.

Saratov Research Institute of Traumatology and Orthopaedics, Saratov, Russia (410002, Saratov, Chernyshevskogo st., 148), e-mail: m_kozadaev_ortoped@mail.ru

Active development of tissue-engineering technology is one of the possible ways to solving the urgent problem of regeneration and restoration of lost tissue. Key importance in the development of tissue engineering technologies has creation of three-dimensional matrices or scaffolds that can act as a substrate for colonization by cells, stimulating the regeneration process. In this experimental work the results of the comparative analysis of the microcirculatory changes and cell populations dynamics of polycaprolactone (PCL)-scaffold and PCL-hydroxyapatite (HA) matrix during subcutaneous implantation tests are presented. Results of the study allow to conclude that both scaffolds are capable of integration into the connective tissue *in vivo*. After subcutaneous implantation both types of scaffolds were populated by connective tissue cells as well as were vascularized with minor reactive changes. However, the PCL-HA-matrix after subcutaneous implantation has less rate of colonization by connective tissue elements in comparison to the PCL-scaffold.

Keywords: scaffold, polycaprolactone, hydroxyapatite, biocompatibility.

Для создания матриц, применяемых в тканевой инженерии, используется обширный спектр материалов, имеющих природное и искусственное происхождение, а также их комбинации, позволяющие моделировать механические свойства скаффолдов и параметры биodeградации [5]. Одним из полимеров, применяемых для создания скаффолдов, является поликапролактон (ПКЛ), который не обладает цитотоксическими эффектами и способен к биodeградации в организме [2, 9]. Включенный в состав матрицы на основе ПКЛ гидроксиапатит (ГА), являющийся кристаллохимическим аналогом минеральной

составляющей костной ткани и обладающий остеокондуктивностью, может найти широкое применение в клинической практике [2, 4]. Ранее проведенные исследования ПКЛ-скаффолдов в условиях *in vitro* продемонстрировали хорошую адгезию и пролиферацию клеток, культивируемых на подобных матрицах [6, 8]. Основными требованиями, предъявляемыми к скаффолдам, являются их биосовместимость и способность, заселяясь клеточными элементами, со временем замещаться на собственные ткани организма [4].

Межгосударственный стандарт для изделий медицинского назначения ISO (ГОСТ 10993-1-2011) рекомендует для выявления местного патогенного действия материалов на живую ткань обязательное применение имплантационных тестов, в том числе и субкутанных. Известно, что система микроциркуляции динамически изменяется при сдвигах гомеостаза [1, 3], отражая функциональное состояние ткани. Поэтому для оценки местной воспалительной реакции на имплантацию различных скаффолдов, помимо обязательного морфологического анализа биоптатов зоны имплантации [7], перспективным, на наш взгляд, является использование параметров тканевой перфузии.

В связи с этим целью работы являлся сравнительный анализ воспалительных изменений микроциркуляции и динамики заселения клетками оригинальных скаффолдов на основе ПКЛ и ПКЛ с ГА в условиях *in vivo*.

Материалы и методы

Экспериментальная работа была проведена в соответствии с Хельсинской декларацией о гуманном отношении к животным. За 5 мин до проведения манипуляций крысам вводили внутримышечно комбинацию ксилазина (Interchemie, Нидерланды) в дозе 1 мг/кг и золетила (Virbac Sante Animale, Франция) в дозе 0,1 мл/кг для достижения наркоза.

Оригинальные отечественные скаффолды на основе ПКЛ и ПКЛ с ГА были разработаны и изготовлены лабораторией «Материалы специального назначения» Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского.

Эксперимент проведен на 60 белых нелинейных крысах самцах, разделенных на 2 экспериментальные группы: первой группе крыс имплантировали оригинальный скаффолд на основе ПКЛ (100%), а второй группе животных – скаффолд на основе ПКЛ (95%) и ГА (5%). Имплантация матриц была проведена по методике, аналогичной В Dorj et al. [10]. Скаффолд в форме диска диаметром 15 мм, толщиной 0,1 мм имплантировали подкожно в межлопаточную область животного. Крыс выводили из эксперимента путем декапитации на 7, 14 и 21 сутки по 10 особей из каждой группы.

Для морфологического сравнительного анализа оригинальных скаффолдов проводили забор мягких тканей зоны имплантации, совместно с матрицей, единым блоком. Материал для морфологического исследования фиксировали в 10%-ном растворе

нейтрального формалина (ООО «Биовитрум», Россия), обезвоживали в спиртах восходящей крепости, после чего заливали в парафин. Срезы толщиной 5–10 мкм окрашивали гематоксилином Майера (ООО «Биовитрум», Россия) и эозином (ООО «Биовитрум», Россия). Для покрытия срезов применяли Bio-Monht и Bio-Clear («Bio Optica», Италия). С помощью микроскопа AxioImager Z2 (производство CarlZeiss, Германия) оценивали и сравнивали между собой структуру, клеточный состав, состояние микроциркуляторного русла окружающих матрицы мягких тканей, динамику заселения скаффолдов клеточными элементами и состав клеточных популяций матриц.

Микроциркуляцию оценивали методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ). Проводилось определение, а затем сравнительный анализ показателей перфузии в перфузионных единицах, а также нормированных амплитуд нейрогенных, миогенных и эндотелиальных осцилляций микрокровотока с помощью спектрального вейвлет-анализа. Регистрацию ЛДФ-грамм осуществляли на 7, 14 и 21 день эксперимента над областью имплантации матриц. Для контроля использовали ЛДФ-граммы, зарегистрированные у крыс до имплантации.

Статистическую обработку данных осуществляли средствами программы Statistica 10. Большинство полученных данных не соответствовали закону нормального распределения, поэтому для сравнения показателей использовали U-критерий Мана-Уитни. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

В результате проведенного исследования установлено, что на 7-е сутки эксперимента показатель перфузии кожи статистически значимо выше над областью имплантации скаффолда на основе ПКЛ, чем матрицы на основе ПКЛ и ГА (табл. 1). На 7 сутки после имплантации матриц на основе ПКЛ и ПКЛ с ГА изменения нормированных амплитуд колебаний в эндотелиальном, нейрогенном и миогенном диапазонах не имеют статистически значимых различий между собой (табл. 2), а также по сравнению с контролем ($p > 0,005$).

В ходе сравнения морфологической картины установлено, что через 7 суток после имплантации скаффолдов на основе ПКЛ и ПКЛ с ГА воспалительные изменения проявляются полнокровием сосудов микроциркуляторного русла, умеренным отеком подкожной клетчатки, а также инфильтрацией ее единичными лейкоцитами как в одной, так и в другой группах животных. При этом в обеих экспериментальных группах заселение скаффолда элементами соединительной ткани наиболее ярко выражено на границах матриц с тканями.

Таблица 1

Изменения перфузии кожи у животных при подкожной имплантации скаффолдов на основе ПКЛ и ПКЛ с ГА

Группа		ПКЛ-скаффолд	ПКЛ-ГА-скаффолд
После имплантации	7 сутки (n=10)	12,9 (12,5; 13,4)	11,4 (11,0; 13,2) p = 0,021600
	14 сутки (n=10)	12,1 (11,1; 12,3)	12,9 (12,7; 13,4) p = 0,144914
	21 сутки (n=10)	11,5 (11,3; 11,9)	10,70 (10,60; 11,2) p = 0,001299

Примечания: В каждом случае приведены медиана, верхний и нижний квартили (25%; 75%), p – показатель достоверности по отношению к данным, полученным при имплантации ПКЛ-скаффолдов.

Таблица 2

Сравнительная характеристика колебаний микрокровотока кожи при подкожной имплантации матриц на основе ПКЛ и ПКЛ с ГА

Группа		Показатели	Нормированная амплитуда колебаний, отн. ед		
			эндотелиальных	нейрогенных	миогенных
После имплантации	7 сутки	ПКЛ (n=10)	19,64 (17,78; 21,07)	6,13 (5,08; 8,43)	7,01 (5,92; 8,78)
		ПКЛ + ГА (n=10)	17,58 (15,67; 18,56) p = 1,000000	7,51 (6,08; 8,24) p = 0,645898	7,84 (6,48; 8,54) p = 0,645898
	14 сутки	ПКЛ (n=10)	21,0 (19,55; 23,34)	6,25 (4,89; 8,38)	7,63 (4,98; 8,07)
		ПКЛ + ГА (n=10)	15,24 (6,30; 21,76) p = 1,000000	4,74 (3,92; 9,70) p = 0,627029	7,15 (4,75; 7,55) p = 0,144914
	21 сутки	ПКЛ (n=10)	17,80 (14,23; 20,77)	5,90 (4,04; 7,17)	4,75 (4,61; 6,14)
		ПКЛ + ГА (n=10)	20,80 (20,62; 21,91) p = 0,021600	5,84 (4,73; 6,63) p = 1,000000	6,02 (5,46; 6,35) p = 0,358129

Примечания: те же, что и в табл.1.

В структуре обеих сравниваемых матриц через 7 суток после имплантации присутствуют единичные лейкоциты на фоне преобладающих фибробластических элементов. Статистически значимых различий количества нейтрофильных лейкоцитов, моноцитов и макрофагов, а также лимфоцитов между группами не выявлено (табл. 3).

Таблица 3

Динамика состава клеточных популяций при подкожной имплантации матриц на основе ПКЛ и ПКЛ с ГА (число клеток на одно поле при увеличении x400)

Клетки	Группы животных	Время после имплантации		
		7 суток	14 суток	21 сутки
Фибробласты	ПКЛ (n=10)	59 (53; 70)	80 (72; 88)	81 (69; 85)
	ПКЛ + ГА (n=10)	48 (39; 54) p = 0,168079	64 (53; 66) p = 0,021600	61 (50; 72) p = 0,168079
Фиброциты	ПКЛ (n=10)	16 (14; 19)	40 (35; 52)	61,5 (53; 66)

	ПКЛ + ГА (n=10)	11 (9; 14) p = 0,168079	32 (27; 42) p = 0,021600	41 (38; 48) p = 0,021600
Нейтрофилы	ПКЛ (n=10)	7 (4; 9)	5 (4; 7)	5 (4; 6)
	ПКЛ + ГА (n=10)	6 (4; 8) p = 1,000000	6 (4; 7) p = 0,358129	5 (3; 7) p = 0,645898
Моноциты и макрофаги	ПКЛ (n=10)	8.5 (5; 11)	8,5 (3; 15)	8 (5; 10)
	ПКЛ + ГА (n=10)	7 (5; 12) p = 0,645898	11 (7; 13) p ₁ = 0,645898	10 (6; 12) p = 0,066082
Лимфоциты	ПКЛ (n=10)	9 (6; 12)	10 (8; 13)	6 (2; 7)
	ПКЛ + ГА (n=10)	12 (7; 13) p = 1,000000	11 (7; 15) p = 0,168079	6 (3; 8) p = 1,000000

Примечания: те же, что и в табл. 1.

Таким образом, данные полученные в ходе морфологического исследования, соответствуют динамике показателей микроциркуляции и свидетельствуют об умеренной степени выраженности реактивных реакций в обеих группах животных.

На 14-е сутки после имплантации скаффолдов не выявлено статистически значимых различий перфузионного показателя при сравнении опытных групп животных между собой (табл. 1). Нормированные амплитуды эндотелиальных, миогенных и нейрогенных колебаний у животных сравнимых групп также не имеют значимых различий спустя 14 суток после имплантации (табл. 2).

При сравнении морфологической картины мягких тканей зоны имплантации скаффолдов на основе ПКЛ и ПКЛ с ГА на 14-е сутки эксперимента обнаружено, что у животных данных групп сохраняются незначительные реактивные изменения, проявляющиеся полнокровием кровеносных сосудов, степень выраженности которого не зависит от вида используемой матрицы. При имплантации как скаффолда на основе ПКЛ, так и матрицы, содержащей ГА, лейкоцитарная инфильтрация перифокальной зоны представлена единичными нейтрофилами и лимфоцитами.

На 14-е сутки после имплантации увеличивается число фибробластических элементов в структуре матриц, а клеточные элементы равномерно распределяются по структуре имплантатов. При этом количество фиброцитов и фибробластов статистически значимо выше в структуре скаффолда на основе ПКЛ по сравнению со скаффолдом на основе ПКЛ и ГА (табл. 3). В составе клеточной популяции обеих изучаемых матриц на 14 сутки после имплантации присутствуют единичные лейкоциты: нейтрофилы, макрофаги, лимфоциты, количество которых не имеет статистически значимых различий между группами (табл. 3). Оба типа матриц на 14-е сутки после имплантации содержат сосуды. Различий степени выраженности васкуляризации в зависимости от вида скаффолда не выявлено.

Таким образом, данные ЛДФ-грамм при имплантации скаффолдов на основе ПКЛ и ПКЛ с ГА через 14 дней не имеют статистически значимых различий, но заселение матрицы

на основе ПКЛ клетками фибропластического ряда на 14-е сутки исследования протекает интенсивнее по сравнению со скаффолдом на основе ПКЛ и ГА.

На 21-е сутки перфузионный показатель и нормированные амплитуды нейрогенных и миогенных колебаний микрокровотока кожи у животных с имплантацией изучаемых типов скаффолдов не имеют статистически значимых различий (табл. 1, 2). При этом нормированные амплитуды эндотелиальных колебаний при имплантации матрицы на основе ПКЛ и ГА статистически значимо превышают таковые в группе животных, которым проводилась имплантация ПКЛ-скаффолда (табл. 2). Однако, значения нормированных амплитуд эндотелиальных колебаний в группах животных, которым проводилась имплантация матриц на основе ПКЛ и ПКЛ с ГА, на 21-е сутки эксперимента находятся в пределах вариабельности до имплантационных значений ($p=0,561276$ и $p=0,183098$ соответственно).

На 21 день реактивные изменения тканей перифокальной зоны не выявлены. При использовании как одного, так и другого вида матриц, отмечается умеренное кровенаполнение сосудов перифокальной зоны. Изучаемые матрицы равномерно заселены клетками фибробластического ряда и васкуляризованы. Однако, количество фиброцитов в ПКЛ-скаффолдах статистически значимо выше, чем в матрицах на основе ПКЛ с ГА, что отражает различную интенсивность их заселения (табл. 3).

В составе клеточных популяций матриц на основе ПКЛ и ПКЛ с ГА на 21 сутки после имплантации присутствуют единичные лейкоциты: нейтрофилы, макрофаги, лимфоциты, количество которых не имеет статистически значимых различий между группами (табл. 3). На 21-е сутки после имплантации происходит истончение волокон в обеих изучаемых матрицах, что свидетельствует о начавшейся биодеградации.

Таким образом, при имплантации скаффолдов на основе ПКЛ и ПКЛ с ГА изменения микроциркуляции кожи слабо выражены в обеих группах и не имеют между собой значимых отличий, наиболее ярко проявляясь на 7-е сутки и полностью исчезая на 21-е. Изменения показателей ЛДФ-грамм полностью соответствуют динамике морфологической картины, свидетельствующей о том, что наибольшие реактивные изменения окружающих тканей отмечаются на 7-е сутки и полностью купируются к 21-м суткам как при имплантации ПКЛ-скаффолда, так и матрицы на основе ПКЛ с ГА.

Выводы

При сравнительном анализе скаффолдов на основе ПКЛ и ПКЛ с ГА установлено, что изменения микроциркуляции кожи слабо выражены в обеих группах и не имеют между собой значимых отличий. Изменения динамики перфузии кожи соответствуют динамике морфологической картины в обеих экспериментальных группах. Заселение ПКЛ-скаффолдов

и скаффолдав на основе ПКЛ с ГА клетками соединительной ткани протекает активно в период с 7-х по 21 сутки эксперимента, но интенсивность заселения клеточными элементами выше при имплантации матрицы на основе ПКЛ. Установлено также, что спустя 21-е сутки с момента имплантации скаффолдов обоого типа появляются первые признаки их биодegradации

Таким образом, отечественные скаффолды как на основе ПКЛ (100%), так и ПКЛ (95%) с ГА (5%) способны к интеграции в соединительную ткань в условиях *in vivo*. Активное заселение исследуемых матриц соединительнотканнми элементами, васкуляризация на фоне незначительных реактивных изменений при подкожной имплантации убедительно демонстрирует их биосовместимость. Однако при подкожной имплантации матриц на основе ПКЛ с ГА скорость их заселения соединительнотканнми элементами меньше, чем при использовании ПКЛ-скаффолдов.

Список литературы

1. Иванов А.Н., Федонников А.С., Норкин И.А., Пучиньян Д.М. Коррекция микроциркуляторных нарушений в стратегиях менеджмента остеоартрита и остеохондропатий // Российский медицинский журнал. –2015. – Т. 21, №1. – С. 18-23.
2. Иванов А.Н., Норкин И.А., Пучиньян Д.М. Возможности и перспективы использования скаффолд-технологий для регенерации костной ткани // Цитология. – 2014. – Т. 56, № 8. – С. 543-548.
3. Киреев С.И. Исследование реактивности организма при хирургическом лечении переломов костей верхней конечности // Вестник новых медицинских технологий.– 2009. – Т. 16, № 1. – С.122-123.
4. Новочадов В.В. Проблема управления клеточным заселением и ремоделированием тканеинженерных матриц для восстановления суставного хряща // Вестник Волгоградского государственного университета. – 2013.– Т. 1, № 5. – С.19-28.
5. A pilot study of the use of an osteochondral scaffold plug for cartilage repair in the knee and how to deal with early clinical failures / A.A. Dhollander, K. Liekens, K.F. Almqvist et al. // Arthroscopy.– 2012.– № 28. – P. 225-233.
6. Comparison of Cellular Proliferation on Dense and Porous PCL Scaffolds / H. Şaşmazel, M. Gümüşderelioğlu, A.Gürpınar, M.A. Onur // Bio-Medical Materials and Engineering.– 2008.– Vol. 18, №3. – P. 119-128.

7. Erisken C., Kalyon D.M., Wang H. Functionally graded electrospun polycaprolactone and beta-tricalcium phosphate nanocomposites for tissue engineering applications // *Biomaterials*. – 2008. – Vol. 29, № 30. – P. 4065-4073.
8. Poly-epsilon-caprolactone gel hybrid scaffolds for cartilage tissue engineering / J.C. Schagemann, H.W. Chung, Mrosek E.H., J.J. Stone et al // *Biomed Mater Res A*.– 2010.– Vol. 93, №2. – P. 454-463.
9. Response of engineered cartilage tissue to biochemical agents as studied by proton magnetic resonance microscopy / K. Potter, J.J. Butler, W.E. Horton, R.G.S. Spencer // *Arthritis Rheum*.– 2000.– № 43. – P. 1580-1590.
10. Robocasting nanocomposite scaffolds of poly (caprolactone) hydroxyapatite incorporating modified carbon nanotubes for hard tissue reconstruction / B. Dorj, J.E. Won, J.H. Kim et al. // *J Biomed Mater Res A*.– 2013.– Vol. 101, № 6. – P. 1670-1681.

Рецензенты:

Киреев С.И., д.м.н., профессор кафедры травматологии и ортопедии, ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, г. Саратов;

Антипова О.Н., д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии им. И.А. Чуевского, ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, г. Саратов.