

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПЕРФУЗИИ И ДИНАМИКИ МАРКЕРОВ ОСТРОЙ ФАЗЫ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ МАТРИЦ НА ОСНОВЕ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА И ГИДРОКСИАПАТИТА

**Иванов А.Н., Козадаев М.Н., Белова С.В., Блинникова В.В., Мамонова И.А.
Пучиньян Д.М., Федонников А.С., Норкин И.А.**

Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии, Саратов, e-mail: m_kozadaev_ortoped@mail.ru

В настоящее время для создания скаффолдов используется обширный спектр материалов, имеющих как природное, так и искусственное происхождение, однако предпочтение отдается синтетическим полимерам в связи с возможностью моделирования их механических свойств и параметров биodeградации. Одним из таких полимеров является поликапролактон (ПКЛ), который не обладает цитотоксическими эффектами и способен к биodeградации в организме. На сегодняшний день к скаффолдам предъявляется целый ряд требований, среди которых особое значение имеет биосовместимость, то есть способность встраиваться в организм, не провоцируя негативных изменений в окружающей ткани. Одной из основных характеристик биосовместимости является интенсивность воспалительной реакции, которая проявляется как тканевыми, так и сосудистыми реакциями, а выделение биологически активных веществ в очаге, в частности, цитокинов, обуславливает системные проявления данного типового патологического процесса. Учитывая вышеизложенное, в ходе экспериментальной работы была проведена сравнительная оценка взаимосвязей показателя перфузии и белков острой фазы у белых крыс при имплантации и имитации имплантации оригинальных отечественных скаффолдов.

Ключевые слова: скаффолд, поликапролактон, гидроксиапатит, биосовместимость.

COMPARATIVE ANALYSIS OF PERFUSION AND DYNAMICS OF ACUTE-PHASE MARKERS OF INFLAMMATORY RESPONSE AFTER POLYCAPROLACTONE HYDROXYAPATITE MATRIX IMPLANTATION

**Ivanov A.N., Kozadaev M.N., Belova S.V., Blinnikova V.V., Mamonova I.A.,
Puchinyan D.M., Fedonnikov A.C., Norkin I.A.**

Saratov Research Institute of Traumatology and Orthopaedics, Saratov, e-mail: m_kozadaev_ortoped@mail.ru

Nowadays wide spectrum of different natural and synthetic polymers is used for formation of tissue engineering matrices or scaffolds. However, synthetic materials demonstrate some important advantages in comparison to natural analogs such as ability to mechanical properties and biodegradation modulation. Polycaprolactone is one of biodegradable synthetic polymers which has no cytotoxic effects that is causes perspectives of its use as a material for scaffold formation. Modern scaffolds have to correspond with several requirements including biocompatibility which is one of the most important features of tissue-engineering matrices. Main characteristics of biocompatibility are linked with intensity of inflammation that is displayed by local tissue and vascular reactions as well as proinflammatory cytokine production causes systemic manifestations of that pathological process. Considering those facts, comparative analysis of the local perfusion changes and acute-phase proteins in white rats with PCL-NA-matrix implantation or its imitation is performed in present experimental work.

Keywords: scaffold, polycaprolactone, hydroxyapatite, biocompatibility.

На сегодняшний день в тканевой инженерии используется обширный спектр материалов, имеющих природное и искусственное происхождение, а также их комбинации, позволяющие моделировать механические свойства скаффолдов и параметры биodeградации [8]. Одним их основных требований, предъявляемых к скаффолдам, является их биосовместимость с тканями организма [6].

Ключевым патогенетическим аспектом, определяющим наличие или отсутствие

биосовместимости материала, является интенсивность воспалительной реакции, возникающей при его имплантации в организм [2]. Локальные проявления воспаления включают тканевые и сосудистые реакции, а выделение биологически активных веществ в очаге, в частности, цитокинов, обуславливает системные проявления данного типового патологического процесса [3, 4]. В этой связи целью настоящего исследования являлся сравнительный анализ изменений перфузии, характеризующих локальные сосудистые реакции, и динамики маркеров острой фазы в сыворотке крови как системных проявлений воспалительного ответа при имплантации и имитации имплантации оригинальных отечественных скаффолдов на основе поликапролактона (ПКЛ) и гидроксиапатита (ГА).

Материалы и методы

Эксперимент проведен на 38 крысах, разделенных на 3 экспериментальные группы: группа сравнения – 10 ложнопериоперированных животных, группа отрицательного контроля, 10 белых крыс, которым имплантировали скаффолд, содержащий чужеродный белок, и опытная группа – 10 крыс, которым имплантировали оригинальный скаффолд на основе ПКЛ. В качестве контроля для биохимических исследований использованы образцы крови 8 интактных белых крыс-самцов.

Крысам 2-ой и 3-ей групп под наркозом подкожно, в межлопаточной области имплантировали скаффолд в форме диска диаметром 15 мм, толщиной 0,1 мм по методике аналогичной Doj В. и соавт. [9]. У животных группы сравнения проводилось оперативное вмешательство соответствующего объема, но без имплантации скаффолда.

Определение концентрации СРБ проводили в сыворотке крови, иммунотурбидиметрическим тестом DiaSys Diagnostic Systems GmbH (Германия), с помощью анализатора Sapphire-350 (Ирландия). Активность церулоплазмينا определялась по степени окисления раствора пара-фенилендиамина в сыворотке крови. Забор крови у животных осуществлялся непосредственно перед выводом из эксперимента на 7, 14 и 21 сутки после имплантации.

Микроциркуляцию оценивали методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ). Проводилось определение показателя перфузии в перфузионных единицах. 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

Полученные данные свидетельствуют, что у животных, подвергнутых оперативному вмешательству без имплантации скаффолда, на 7 сутки эксперимента происходит повышение перфузионного показателя в среднем на 27 % (табл. 1). Через 14 суток с момента хирургического вмешательства перфузионный показатель находится в пределах вариабельности группы контроля, и отмечается лишь тенденция, не достигающая статистической значимости к его увеличению (табл. 1). На 21-е сутки эксперимента показатель перфузии у ложнооперированных животных статистически значимо не отличается от исходного уровня (табл. 1).

Таблица 1

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

Группа		Группа сравнения (n=10)	Отрицательный контроль (n=10)	Имплантация ПКЛ и ГА-скаффолда (n=10)
контроль (n=15)		10,2 (9,3; 11,1)	10,2 (9,3; 11,1)	10,2 (9,3; 11,1)
После имплантации	7 сутки	13,25 (12,7; 13,8) p=0,000791	18,05(16,05; 19,7) p= 0,000032	11,4 (11,0; 13,2) p= 0,007139
	14 сутки	12,40 (9,4; 12,6) p=0,085512	20,65(18,2; 26,15) p= 0,000108	12,9 (12,7; 13,4) p= 0,000388
	21 сутки	10,4 (8,8; 11,8) p= 0,948533	21,1(15,9; 27,8) p= 0,000032	10,70 (10,60; 11,20) p= 0,157220

Примечания: в каждом случае приведены медиана, верхний и нижний квартили (25 %; 75 %), p – по сравнению с контролем.

Установлено, что оперативное вмешательство в объеме имплантации матриц вызывает увеличение концентрации в сыворотке крови С-реактивного белка (СРБ) и церулоплазмينا (ЦП) на 7-е сутки эксперимента (табл. 2, 3). Концентрация маркеров острой фазы воспаления в сыворотке крови у ложнооперированных животных нормализуется к 14-м суткам эксперимента (табл. 2, 3), что соответствует динамике показателя перфузии кожи над областью оперативного вмешательства (табл. 1).

Таблица 2

Уровень ЦП крови у животных группы отрицательного контроля (усл. ед.)

Группа	После имплантации		
	7 сутки	14 сутки	21 сутки
Контроль (n=8)	16,5 (15,8; 18,1)	16,5 (15,8; 18,1)	16,5 (15,8; 18,1)
Группа сравнения (n=8)	21,6 (20,4; 22,1) p= 0,002647	18,1 (16,6; 18,9) p= 0,159406	17,3 (16,0; 18,0) p= 0,608887
Отрицательный	25,9 (24,8; 28,0)	26,4 (23,2; 28,0)	23,1 (22,1; 25,8)

контроль (n=8)	p = 0,001745.	p = 0,001745	p ₁ = 0,001745
ПКЛ и ГА- скаффолд (n=8)	21,3 (20,1; 22,1) p = 0,001745	19,1 (17,3; 20,8) p = 0,063920	17,5 (16,6; 19,2) p ₁ = 0,200842

Примечания: те же, что и в табл. 1.

Таблица 3

Уровень СРБ крови у животных группы отрицательного контроля (мг/л)

Группа	После имплантации		
	7 сутки	14 сутки	21 сутки
Контроль (n=8)	37,1 (37,0; 38,2)	37,1 (37,0; 38,2)	37,1 (37,0; 38,2)
Группа сравнения (n=8)	41,0 (39,0; 43,1) p = 0,008661	39,0 (37,5; 41,3) p = 0,084860	36,8 (36,0; 40,1) p = 0,471581
Отрицательный контроль (n=8)	64,3 (62,8; 65,3) p = 0,002628	46,7 (46,1; 47,3) p = 0,001685	44,0 (42,7; 45,0) p = 0,001685
ПКЛ и ГА- скаффолд (n=8)	43,0 (41,1; 44,1) p = 0,005790	38,2 (36,5; 42,7) p = 0,564012	37,8 (37,6; 38,4) p = 0,109441

Примечания: те же, что и в табл. 1.

В результате исследований установлено, что после имплантации скаффолда, содержащих чужеродный белок, на 7-е сутки эксперимента происходит значительное (на 80 % контрольной величины) увеличение перфузионного показателя (табл. 1). Через 14 суток с момента имплантации матриц такого типа перфузионный показатель в среднем в два раза превышает свой исходный уровень (табл. 1). На 21-е сутки после имплантации скаффолда, не обладающего биосовместимостью, обнаружено, что тенденция к снижению перфузионного показателя относительно 14-х суток отсутствует (табл. 1).

При имплантации матриц, не обладающих биосовместимостью, обнаружено выраженное увеличение СРБ и ЦП на 7-е сутки эксперимента (табл. 2, 3). В период с 14-х по 21-е сутки происходит снижение концентрации ЦП и СРБ, однако уровни данных показателей не достигают контрольных значений (табл. 2, 3).

Полученные данные свидетельствуют о том, что показатель перфузии кожи над областью имплантации оригинального скаффолда на основе ПКЛ и ГА статистически значимо увеличен на 7-е сутки эксперимента по сравнению с контролем. Однако выраженность сдвигов перфузионного показателя не превышает таковые у ложнооперированных животных (табл. 1). На 14- и 21-е сутки эксперимента показатель

перфузии у животных данной группы статистически значимо не отличается от исходного уровня и группы сравнения (табл. 1).

Имплантация скаффолдов на основе ПКЛ и ГА вызывает у животных увеличение в сыворотке крови концентрации СРБ и ЦП на 7-е сутки эксперимента (табл. 2, 3). Однако среднее значение концентрации этих белков в сыворотке крови у животных данной группы не превышает уровень группы сравнения и ниже, чем у крыс группы отрицательного контроля (табл. 2, 3). В период с 7-х по 21-е сутки концентрация СРБ и ЦП в сыворотке крови у животных опытной группы снижается, достигая нормальных значений на 14 сутки (табл. 2, 3).

Обсуждение результатов

Полученные данные демонстрируют, что имитация имплантации матриц сопровождается транзиторными, слабовыраженными изменениями концентраций белков острой фазы, которые соответствуют динамике перфузионного показателя. Вызванные оперативным вмешательством изменения, как со стороны микроциркуляторного русла, так и биохимического анализа наиболее выражены на 7-е сутки эксперимента, переходят в подострую стадию на 14-е сутки и исчезают полностью к 21-м суткам.

Отсутствие биосовместимости скаффолда характеризуется выраженным увеличением концентрации в крови белков острой фазы воспаления. Также обнаружено, что воспалительные изменения кровотока в коже над областью имплантации скаффолда, содержащего чужеродный белок, проявляются увеличением перфузионного показателя в 2 раза. Повышение перфузии отражает гиперемический тип микроциркуляции в области имплантации скаффолда, не обладающего биосовместимостью [5]. В отличие от группы сравнения, где максимально выраженные реактивные изменения перфузии микроциркуляторного русла были выявлены на 7-е сутки эксперимента, у животных группы отрицательного контроля выраженная и стойкая гиперемия зарегистрирована с помощью ЛДФ в период с 7-х по 21-е сутки. Локальные сосудистые изменения находятся в тесной ассоциации с системными проявлениями воспалительного процесса, что выражается аналогичной паттерну микроциркуляторных сдвигов динамикой маркеров острой фазы воспалительной реакции. Стойкое повышение концентрации СРБ и ЦП в сыворотке крови связано с продукцией в ответ на чужеродный белок провоспалительных цитокинов, которые являются основными стимуляторами их синтеза в печени [7]. Тенденция к уменьшению концентрации ЦП и СРБ у животных группы отрицательного контроля на 14 и 21-е сутки эксперимента обусловлена снижением их синтеза при длительном воспалительном процессе [1].

В результате эксперимента установлено, что при субкутанной имплантации скаффолдов на основе ПКЛ и ГА изменения перфузионного показателя отмечаются только на 7-е сутки эксперимента. Динамика концентраций ЦП и СРБ, совпадающая с локальными изменениями перфузии, свидетельствует, что оригинальные матрицы не вызывают выраженной воспалительной реакции, демонстрируя высокую степень биосовместимости. Транзиторный характер изменений показателя перфузии и динамики концентрации белков острой фазы как в группе с имплантацией скаффолда, так и в группе ложнооперированных животных, вероятно, обусловлены травмой мягких тканей при оперативном вмешательстве.

Выводы

Представленные данные свидетельствуют, что динамика маркеров острой фазы воспаления у животных групп сравнения, отрицательного контроля и опытной группы соответствует изменениям показателя перфузии в области имплантации, что подчеркивает патогенетическую взаимосвязь локальных и системных проявлений воспалительной реакции при имплантации матриц. В ходе субкутанных имплантационных тестов установлена биосовместимость матриц на основе ПКЛ и ГА с соединительной тканью у белых крыс.

Список литературы

1. Евстифеева С.Е. Распространенность повышенного уровня С-реактивного белка и его ассоциации с традиционными факторами риска и заболеваемостью у жителей российской федерации (по данным исследования ЭССЕ-РФ) // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2014. – Т. 10, № 6. – С. 597-605.
2. 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.
3. Иванов А.Н., Норкин И.А., Пучиньян Д.М., Широков В.Ю., Жданова О.Ю. Адгезивные молекулы эндотелия сосудистой стенки // Успехи физиологических наук. – 2014. – Т. 45, № 4. – С. 34-49.
4. Киреев С.И. Исследование реактивности организма при хирургическом лечении переломов костей верхней конечности // Вестник новых медицинских технологий. – 2009. – Т. 16, № 1. – С.122-123.
5. Крупаткин А.И., Сидоров В.В. Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови: руководство для врачей. – М.: Медицина, 2005. – 125 с.
6. 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.

7. Черешнев В.А., Гусев Е.Ю. Иммунологические и патофизиологические механизмы системного воспаления // Медицинская иммунология. – 2012. – Т. 14, № 1-2. – С. 9-20.

8. 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.

9. 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.