

УДК 616-092.9: 616.71-003.93

ДИНАМИКА МАРКЕРОВ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ ПРИ ПОДКОЖНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ СКАФФОЛДОВ ИЗ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА И ВАТЕРИТА

Иванов А.Н.¹, Чибрикова Ю.А.², Норкин И.А.¹

¹ НИИТОН СГМУ, Саратов, e-mail: lex558452@rambler.ru;

² ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им В.И. Разумовского Минздрава России, Саратов

Целью настоящей работы являлась оценка динамики маркеров структурно-функционального состояния эндотелия при подкожной имплантации скаффолдов из поликапролактона и ватерита в сравнении с матрицами, не обладающими биосовместимостью. В эксперименте на белых крысах изучены изменения концентрации в сыворотке крови С-реактивного белка, фактора роста эндотелия сосудов, синдекана-1 и VE-кадгерина при субкутанной имплантации скаффолдов из поликапролактона и ватерита в сравнении с небюсовместимыми матрицами. Установлено, что отсутствие биосовместимости скаффолдов проявляется системным воспалительным ответом, пролонгированной проангиогенной активностью, сопровождающейся формированием воспалительного фенотипа эндотелиоцитов. При имплантации скаффолдов из поликапролактона паттерн системного воспалительного ответа соответствует таковому у ложнооперированных животных, что свидетельствует о биосовместимости этих матриц. Повышение концентрации фактора роста эндотелия сосудов на ранних сроках после имплантации при отсутствии признаков повреждения эндотелиального гликокаликса характеризует высокий ангиогенный потенциал скаффолдов из поликапролактона и ватерита. Наиболее информативным для прогнозирования васкуляризации скаффолдов при субкутанной имплантационных тестах является соотношение изменения сывороточных концентраций фактора роста эндотелия сосудов и синдекана-1, которое позволяет оценить ангиогенный потенциал матрицы с 7-х суток после подкожной имплантации до появления морфологических признаков формирования новых сосудов.

Ключевые слова: скаффолды, васкуляризация, эндотелий, воспаление, регенерация.

DYNAMICS OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ENDOTHELIUM MARKERS IN SUBCUTANEOUS IMPLANTATIONS OF POLICAPROLACTON AND VATERITE SCAFFOLDS

Ivanov A.N.¹, Chibrikova Yu.A.², Norkin I.A.¹

¹ NIITON SGMU, Saratov, e-mail: lex558452@rambler.ru;

² FSBEI HE I.V. Razumovsky Saratov SMU MOH Russia, Saratov

The objective of this research was the assessment of dynamics in structural and functional endothelium markers in subcutaneous implantations of polycaprolacton and vaterite scaffolds, and their comparison to bioincompatible matrixes. The experiment with white rats enabled finding changes in serum concentrations of C-reactive protein, vascular endothelial growth factor, syndecan-1 and VE-cadherin in subcutaneous implantations of polycaprolacton and vaterite scaffolds as compared to bioincompatible matrixes. It was found that bioincompatible scaffolds caused systemic inflammation response and prolonged proangiogenic activity together with the formation of endotheliocytes of inflammatory phenotype. The pattern of systemic inflammation response at polycaprolacton scaffolds implantations was same as in sham operated animals suggesting biocompatibility of these matrixes. The increase in vascular endothelial growth factor at early stage after the implantations with no signs of endothelial glycocalyx damage showed high angiogenic potential of polycaprolacton and vaterite scaffolds. The best informative value for the prediction of scaffold vascularization at subcutaneous implantation tests was the ratio of changes in concentrations of serum vascular endothelial growth factor and syndecan-1 that enabled the assessment of matrix angiogenic potential from Day 7 of subcutaneous implantations to the emergence of morphological signs of new vessels formation.

Keywords: scaffolds, vascularization, endothelium, inflammation, regeneration.

В настоящее время актуальным направлением развития регенеративной медицины является создание трехмерных матриц-скаффолдов, выполняющих функции межклеточного матрикса, способных поддерживать миграцию, пролиферацию и направленную дифференцировку клеток, тем самым обеспечивая ускорение репаративных процессов [1]. Необходимым условием регенерации является наличие адекватной трофики тканей, которая при использовании технологии трехмерных матриц обеспечивается прорастанием в скаффолд сосудов [2]. Применительно к скаффолдам для стимуляции регенерации костной ткани значимость формирования в матрице сосудов обусловлена их многогранной ролью в процессах миграции остеобластов и остеокластов, а также в процессах минерализации образующейся костной ткани и ее последующем ремоделировании. Нарушение процессов формирования новых сосудов в скаффолде препятствует остеогенезу, то есть снижает остеоиндуктивные характеристики имплантируемой матрицы [3]. Следовательно, ангиогенные характеристики скаффолда вносят значительный вклад как в его остеоиндуктивные свойства, так и в регенераторный потенциал в целом. В связи с этим актуально изучение васкуляризации матриц, содержащих минеральные компоненты, и факторов, регулирующих этот процесс, так как это позволит прогнозировать и модулировать прорегенераторные свойства скаффолдов.

Независимо от планируемой области применения обязательным требованием, предъявляемым к скаффолдам, является наличие биосовместимости [4]. Ключевыми аспектами биосовместимости скаффолдов служат интенсивность, продолжительность и характер воспалительного ответа при имплантации в организм. Следует отметить, что ряд медиаторов воспаления являются индукторами ангиогенеза, следовательно, необходимы для эффективной васкуляризации скаффолдов. Вместе с тем интенсивное воспаление препятствует образованию сосудов в скаффолдах и заселению их клеточными элементами [5]. В основе ангиогенных реакций лежат миграция и пролиферация эндотелиальных клеток. В связи с этим исследование взаимосвязей биосовместимости скаффолдов и структурно-функциональных изменений эндотелия представляет как научный, так и практический интерес, в частности в аспекте прогностического значения маркеров ангиогенных реакций эндотелиальных клеток, что и определило направление настоящей работы.

Цель исследования: оценить динамику маркеров структурно-функционального состояния эндотелия при подкожной имплантации скаффолдов из поликапролактона и ватерита в сравнении с матрицами, не обладающими биосовместимостью.

Материал и методы исследования. Дизайн исследования включал рандомное деление 54 животных на 4 группы: контроля (8 крыс), сравнения (12 ложнооперированных животных),

отрицательного контроля (17 крыс с имплантированным небиосовместимым скаффолдом – поликапролактоновая матрица с нативным овальбумином) и опытную (17 животных с имплантацией скаффолда из поликапролактона и ватерита). В соответствии с рекомендациями этического комитета Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского (протокол № 6 от 6.02.2018) инвазивные манипуляции у крыс проводились под общей анестезией, достигаемой комбинированным внутримышечным введением ксилазина («Interchemie», Нидерланды) и телазола («Zoetis», Испания). Вывод крыс из эксперимента осуществлялся передозировкой указанных препаратов.

Имплантируемые матрицы были изготовлены Образовательно-научным институтом наноструктур и биосистем. Субкутанный имплантационный тест продолжительностью 7 и 21 день выполнялся по методике, изложенной в [4, 6]. На 7-е или 21-е сутки эксперимента для получения сыворотки забирали кровь объемом 5 мл путем кардиальной пункции.

Методом иммуноферментного анализа (ИФА) проводилось определение в сыворотке крови экспериментальных животных: С-реактивного белка (СРБ) с использованием набора реактивов «Rat C-Reactive Protein ELISA» («eBioscience», США) для оценки системного воспалительного ответа; фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) с использованием набора «Rat VEGF Immunoassay» («R&D Systems», США) для оценки механизмов регуляции ангиогенеза; растворимых форм синдекана-1 и VE-кадгерина с использованием наборов реагентов «ELISA Kit For Syndecan 1 Rat» и «ELISA Kit For Cadherin 5 Rat» («Cloud-Clone Corp.», США) для оценки повреждения гликокаликса эндотелиоцитов и стабильности микрососудистого русла. ИФА реализован в точном соответствии с инструкциями производителей реагентов на микропланшетном спектрофотометре Anthos 2020 («Biochrom», Великобритания).

Полученные данные обработаны статистически программой Statistica 10.0. и представлены в виде медианы и межквартильного размаха, так как не соответствовали закону нормального распределения. Для попарного сравнения групп применен критерий Манна–Уитни, на основании которого рассчитывался показатель достоверности (критический уровень $p=0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение. В результате проведенных исследований установлено, что через 7 суток после выполнения операции в объеме субкутанной имплантации матрицы у крыс группы сравнения отмечается увеличение СРБ в крови на 18,7%. Концентрация СРБ в группе ложнооперированных животных к 21-м суткам эксперимента не имела значимых отличий от уровня интактных крыс (таблица).

Концентрация маркеров структурно-функционального состояния эндотелия в сыворотке
крови экспериментальных животных

Группы	СРБ, мг/л	VEGF, пг/мл	Синдекан-1, нг/мл	VE-кадгерин, пг/мл
Контроль (n=8)	101 (96; 114)	9,4(7,3; 15,7)	1,11(0,82;1,51)	56,18(54;60,54)
Группа сравнения 7-е сутки (n=6)	120 (118; 126) p ₁ <0,05	16,2(14,7;18,8) p ₁ <0,05	1,45 (0,91; 1,88) p ₁ >0,05	56,18 (54;60,55) p ₁ >0,05
Группа сравнения 21-е сутки (n=6)	108 (106; 117) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	8,9(7,3;12,6) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	1,2 (0,97; 1,84) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	57,27(54;60,55) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05
Отрицательный контроль 7-е сутки (n=8)	168 (131; 203) p ₁ <0,05 p ₃ <0,05	30,8(26,1;34,4) p ₁ <0,05 p ₃ <0,05	2,31 (1,91; 2,67) p ₁ <0,05 p ₃ <0,05	60,55 (54;62,73) p ₁ >0,05 p ₃ >0,05
Отрицательный контроль 21-е сутки (n=9)	127 (125;129) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₃ <0,05	54,2(23;69,2) p ₁ <0,05 p ₂ >0,05 p ₃ <0,05	2,3 (1,96; 2,4) p ₁ <0,05 p ₂ >0,05 p ₃ <0,05	58,4 (56,2;62,6) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05 p ₃ >0,05
Опытная группа 7-е сутки (n=8)	126 (108; 129) p ₁ <0,05 p ₃ >0,05 p ₄ <0,05	50 (32,3;66,2) p ₁ <0,05 p ₃ <0,05 p ₄ <0,05	1,31 (1,11; 1,78) p ₁ >0,05 p ₃ >0,05 p ₄ <0,05	57,2 (52,9;60,55) p ₁ >0,05 p ₃ >0,05 p ₄ >0,05
Опытная группа 21-е сутки (n=9)	106 (102;109) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05 p ₃ >0,05 p ₄ <0,05	11,5(9,5;16,7) p ₁ >0,05 p ₂ <0,05 p ₃ >0,05 p ₄ <0,05	1,37 (0,63; 2,04) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05 p ₃ >0,05 p ₄ <0,05	57,3 (53;62,7) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05 p ₃ >0,05 p ₄ >0,05

Примечание: Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. p_{1,2,3,4} – статистическая значимость различий при сравнении с контролем, данными, полученными на 7-е сутки эксперимента, группой сравнения и отрицательным контролем в тот же срок наблюдения соответственно.

В сыворотке крови у крыс группы сравнения на 7-е сутки эксперимента выявлено повышение концентрации VEGF в 1,7 раза относительно контрольных значений, что отражает уровень проангиогенной активности, обусловленной травматизацией тканей. К 21-м суткам после оперативного вмешательства концентрация VEGF в крови у животных группы сравнения нормализуется полностью и не имеет значимых отличий от контроля, отражая завершение

активной фазы ангиогенеза. Значимых изменений концентрации растворимых форм компонентов гликокаликса эндотелиальных клеток ни на 7-е, ни на 21-е сутки после имитации имплантации матриц у крыс группы сравнения относительно контрольных значений не выявлено (табл.). Следовательно, оперативное вмешательство без имплантации скаффолдов вызывает транзиторное слабовыраженное увеличение концентраций СРБ и VEGF в крови, которое регистрируется на 7-е сутки эксперимента. Нормализация биохимических параметров на 21-е сутки эксперимента свидетельствует о завершении ангиогенных процессов и стабилизации сосудистого русла, а также соответствует отсутствию признаков системного воспалительного ответа. Это согласуется с ранее полученными результатами динамического мониторинга кровотока в микроциркуляторном русле и морфологическими данными, характеризующими оперативное вмешательство в объеме субкутанного имплантационного теста [6].

У животных группы отрицательного контроля концентрация СРБ через 7 суток после имплантации небиосовместимых скаффолдов с овальбумином статистически значимо превышает не только контрольный уровень, но и значения, зарегистрированные у ложноперирированных крыс группы сравнения в тот же срок наблюдения. На 21-е сутки эксперимента у животных группы отрицательного контроля концентрация СРБ снижается по сравнению с 7-ми сутками эксперимента, но превышает значения интактных и ложноперирированных животных в 1,25 и в 1,17 соответственно (табл.). Системный воспалительный ответ, характеризующийся увеличением концентрации СРБ в крови, может объяснять выявленная в ранее проведенных морфологических исследованиях локальная лейкоцитарная инфильтрация как самой матрицы, содержащей овальбумин, так и ее перифокальной зоны [7], что сопровождается гиперпродукцией провоспалительных цитокинов и является признаком отсутствия биосовместимости скаффолда. При этом у крыс группы отрицательного контроля на 7-е сутки после имплантации матриц, не обладающих биосовместимостью, концентрация VEGF в сыворотке крови в 1,9 раза выше, чем у крыс группы сравнения (табл.). К 21-м суткам после имплантации матриц, не обладающих биосовместимостью, отмечается тенденция к дальнейшему увеличению концентрации VEGF, что свидетельствует о выраженной и длительной активации ангиогенеза. Согласно данным литературы пролонгированная гиперпродукция VEGF не приводит к васкуляризации скаффолда и, вероятно, ассоциирована с васкуляризацией разрастающейся соединительной ткани, формирующей отграничивающий барьер вокруг матрицы [5]. Следовательно, длительно сохраняющийся (до 21-х суток) повышенный уровень концентрации VEGF в крови при

субкутанных имплантационных тестах является неблагоприятным признаком для эффективной васкуляризации скаффолда.

Значимых изменений концентрации VE-кадгерина у животных группы отрицательного контроля не выявлено. При этом как на 7-е, так и на 21-е сутки эксперимента у крыс группы отрицательного контроля в два раза по сравнению с контролем увеличена концентрация в сыворотке крови синдекана-1 (табл.), что свидетельствует о деградации гликокаликса эндотелиальных клеток. Интенсификация отщепления растворимой формы синдекана-1 свидетельствует о формировании воспалительного фенотипа эндотелиальных клеток, нарушении адгезивных свойств и барьерных функций [8-10]. Учитывая, что повышение концентрации синдекана-1 при имплантации матриц, не обладающих биосовместимостью, регистрируется уже на 7-е сутки эксперимента, определение данного маркера в крови позволяет прогнозировать нарушение васкуляризации скаффолда.

На 7-е сутки после имплантации скаффолдов из поликапролактона и ватерита у белых крыс опытной группы, так же как и у животных группы сравнения, концентрация СРБ повышена по сравнению с контролем. На 21-е сутки у крыс опытной группы концентрация СРБ полностью нормализуется. Выраженность изменений концентрации СРБ в крови у крыс опытной группы не превышает таковую в группе сравнения, что свидетельствует в пользу травматического генеза описанных изменений. У животных опытной группы на 7-е сутки после имплантации скаффолдов из поликапролактона и ватерита концентрация VEGF в сыворотке крови значимо выше, чем у крыс группы сравнения и отрицательного контроля: в 3,1 и 1,6 раза соответственно. К 21-м суткам после имплантации скаффолдов из поликапролактона и ватерита концентрация VEGF в сыворотке крови у животных снижается и не имеет статистически значимых различий с уровнем контрольной группы (табл.). С помощью морфологических методов ранее было установлено, что к 21-м суткам субкутанного имплантационного теста матрицы из поликапролактона и ватерита эффективно васкуляризованы [7]. Следовательно, повышение концентрации VEGF на ранних сроках имплантации прогностически благоприятно для васкуляризации скаффолдов.

В отличие от животных группы отрицательного контроля, у крыс опытной группы не отмечается значимого увеличения концентрации синдекана-1 в сыворотке крови (табл.), что свидетельствует об отсутствии признаков повреждения гликокаликса эндотелиоцитов. Полученные данные свидетельствуют, что наибольшую ценность для прогнозирования ангиогенного потенциала скаффолдов при субкутанных имплантационных тестах будут представлять не концентрационные изменения VEGF в крови, а соотношение изменения

сывороточных концентраций VEGF и синдекана-1. Прогнозирование ангиогенного потенциала скаффолдов с помощью биохимических методов исследования можно производить уже на 7-е сутки субкутанного имплантационного теста, в то время как согласно данным литературы [4] морфологически оценить васкуляризацию скаффолда возможно не ранее чем через 14 дней после его подкожной имплантации.

Выводы

1. Полная нормализация концентрации СРБ, VEGF, растворимых форм компонентов гликокаликса у ложнооперированных животных позволяет полностью исключить влияние травматизации тканей при оперативном вмешательстве на состояние эндотелиальных клеток на 21-е сутки имплантационного теста скаффолдов.
2. Имплантация небюсовместимых скаффолдов вызывает выраженный системный воспалительный ответ, пролонгированную активацию ангиогенеза, сопровождающуюся деградацией гликокаликса и формированием воспалительного фенотипа эндотелиоцитов.
3. При имплантации скаффолдов из поликапролактона паттерн системного воспалительного ответа соответствует таковому у ложнооперированных животных, что свидетельствует о биосовместимости этих матриц. Повышение концентрации VEGF на ранних сроках после имплантации при отсутствии признаков повреждения эндотелиального гликокаликса характеризует высокий ангиогенный потенциал скаффолдов из поликапролактона и ватерита.
4. Прогнозирование ангиогенного потенциала скаффолдов с помощью оценки маркеров состояния эндотелиальных клеток можно производить уже на 7-е сутки субкутанного имплантационного теста еще до появления морфологических признаков васкуляризации. При этом наибольшую ценность для прогнозирования ангиогенного потенциала скаффолдов при субкутанных имплантационных тестах представляет соотношение изменения сывороточных концентраций VEGF и синдекана-1.

Список литературы

1. Bose S., Roy M., Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. Trends in Biotechnology. 2012. 30 (10). P. 546-554. DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.07.005.
2. Perez R.A., Seo S.J., Won J.E., Lee E.J., Jang J.H., Knowles J.C., Kim H.W. Therapeutically relevant aspects in bone repair and regeneration. Materials Today. 2015. 18 (10). P. 573-589.

3. Sharma S, Srivastava D, Grover S, Sharma V. Biomaterials in tooth tissue engineering: a review. *J. Clin. Diagn. Res.* 2014. 8(1). P. 309-315. DOI: 10.7860/JCDR/2014/7609.3937.
4. Ivanov A.N., Kozadaev M.N., Bogomolova N.V., Matveeva O.V., Puchinyan D.M., Norkin I.A., Salkovsky Y.E., Lyubun G.P. Biocompatibility of polycaprolactone and hydroxyapatite matrices in vivo. *Cell Tiss. Biol.* 2015. No. 9. P. 422-429. DOI: 10.1134/S1990519X15050077.
5. Spiller K.L., Anfang R.R., Spiller K.J., Ng J., Nakazawa K.R., Daulton J.W., Vunjak-Novakovic G. The role of macrophage phenotype in vascularization of tissue engineering scaffolds. *Biomaterials.* 2014. 35 (15). P. 4477-4488. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.02.012.
6. Ivanov A.N., Saveleva M.S., Kozadaev M.N., Matveeva O.V., Salkovskiy Yu. E., Lyubun G.P., Gorin D.A., Norkin I.A. New Approaches to Scaffold Biocompatibility Assessment. *BioNanoScience.* 2019. 9 (2). P. 395-405. DOI: 10.1007/s12668-019-00613-3.
7. Saveleva M.S., Ivanov A.N., Kurtukova M.O., Atkin V.S., Ivanova A.G., Lyubun G.P., Martyukova A.V., Cherevko E.I., Sargsyan A.K., Fedonnikov A.S., Norkin I.A., Skirtach A.G., Gorin D.A., Parakhonskiy B.V. Hybrid PCL/CaCO₃ scaffolds with capabilities of carrying biologically active molecules: Synthesis, loading and in vivo applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2018. 85. P. 57-67. DOI: 10.1016/j.msec.2017.12.019.
8. McDonald K.K., Cooper S., Danielzak L., Leask R.L. Glycocalyx degradation induces a proinflammatory phenotype and increased leukocyte adhesion in cultured endothelial cells under flow. *PLoS One.* 2016. 11 (12). P. e0167576. DOI: 10.1371/journal.pone.0167576.
9. Voyvodic P.L., Min D., Liu R., Williams E., Chitalia V., Dunn A.K., Baker A.B. Loss of syndecan-1 induces a pro-inflammatory phenotype in endothelial cells with a dysregulated response to atheroprotective flow. *J. Biol. Chem.* 2014. 289 (14). P. 9547-9559. DOI: 10.1074/jbc.M113.541573.
10. Purushothaman A., Uyama T., Kobayashi F., Yamada S., Sugahara K., Rapraeger A.C., Sanderson R.D. Heparanase-enhanced shedding of syndecan-1 by myeloma cells promotes endothelial invasion and angiogenesis. *Blood.* 2010. 115 (12). P. 2449-2457. DOI: 10.1182/blood-2009-07-234757.