

УДК 616-089.819.843:577.11:612.017.11]-092.9

ДИНАМИКА СЫВОРОТОЧНЫХ МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ НЕТКАНЫХ МАТРИКСОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИОКСИАЛКАНОАТОВ И ПОЛИКАПРОЛАКТОНА

Торопова Я.Г., Антонова Л.В., Головкин А.С., Матвеева В.Г.,
Великанова Е.А., Чернова М.Н.

*НИИ Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН,
Кемерово, e-mail: reception@cardio.kem.ru*

Исследован уровень провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-6 и IL-1 β , моноцитарного хемоаттрактантного белка, С-реактивного белка и церулоплазмينا на различных сроках имплантации нетканых матриксов на основе 5% полигидроксибутирата с гидроксивалератом /10% поликапролактона на переднюю поверхность сердца крыс. Имплантация нетканых матриксов не способствовала усилению воспалительной реакции и была сходна с реакцией на операционную травму. Через 3 недели после имплантации уровни IL-6, IL-1 β , TNF- α , моноцитарного хемоаттрактантного белка и С-реактивного белка в опытной и контрольной группах достоверно не различались. В то же время уровень церулоплазмينا в опытной группе в 1,2 раза превысил значения по сравнению с контрольной. Все это свидетельствует о высокой биосовместимости сополимерной композиции, использованной для изготовления нетканого матрикса.

Ключевые слова: полигидроксибутират с гидроксивалератом, поликапролактон, имплантация, биосовместимость

DYNAMICS OF SERUM MARKERS OF THE INFLAMMATION AT IMPLANTATION OF NONWOVEN MATRIXES ON THE BASIS POLIOKSIALKANOATOV AND POLYCAPROLACTONE

Toropova Y.G., Antonova L.V., Golovkin A.S., Matveeva V.G.,
Velikanova E.A., Chernova M.N.

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases under the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Kemerovo, e-mail: reception@cardio.kem.ru

Level of pro-inflammatory cytokines of TNF- α , IL-6 and IL-1 β , monocytic hemoattractant protein, C-reactive protein and ceruloplasmin on various terms of implantation of nonwoven matrixes on the basis of 5% polyhydroxybutyrate/valerate / 10% polycaprolactone on a forward surface of heart of rats is investigated. Implantation of nonwoven matrixes didn't promote intensifying of inflammatory reaction and was related to reaction to an operational trauma. In 3 weeks after implantation the IL-6, IL-1 β , TNF- α levels, monocytic hemoattractant protein and C-reactive protein in experienced and control groups authentically didn't differ. At the same time ceruloplasmin level in experienced group by 1,2 times exceeded values in comparison with the control. All this testifies to high biocompatibility of the copolymeric composition used for production of a nonwoven matrix.

Keywords: polyhydroxybutyrate/valerate, polycaprolactone, implantation, biocompatibility

На сегодняшний день одной из нерешенных проблем в кардиохирургии является отсутствие протезов для замещения артерий малого диаметра. Возможный путь решения данной проблемы – создание сосуда непосредственно в организме на основе биодеградируемого сосудистого графта. Протезы для сердечно-сосудистой хирургии должны обладать дополнительными свойствами, обеспечивающими долговечность их функционирования: гемосовместимость, тромборезистентность и биологическую инертность. Однако любые эксперименты с биорезорбируемыми полимерами должны ответить на ряд дополнительных вопросов, отражающих принципиальную способность биорезорбируемых полимерных конструкций сохранять биологическую инертность в условиях поддержания хронического воспаления вследствие их длительной клеточной резорбции *in vivo*. При этом обязательно следует учитывать выра-

женность хронического воспаления, сопровождающего этап клеточной биодеградации полимерных структур [2, 3, 4, 5, 7].

Цель исследования – изучить динамику сывороточных маркеров воспаления при имплантации нетканых матриксов из полиоксиалканоатов и поликапролактона, потенциально пригодных для создания сосудистых графтов малого диаметра.

Материал и методы исследования

Ранее коллективом авторов была проведена серия экспериментов по выбору состава полимеров и отработке технологии изготовления конструкций, потенциально пригодных выступить в роли сосудистого имплантата малого диаметра. Оптимальный состав – сочетание 5% полигидроксибутирата/гидроксивалерата (ПГБВ) и 10% поликапролактона (ПКЛ), (Sigma, США), обладавшим длительным сроком биорезорбции. Матрикс на основе 5% ПГБВ/10% ПКЛ были изготовлены методом электроспиннинга в следующем режиме: напряжение на игле – 20 кВ, скорость подачи раствора полимеров – 0,3 мл/ч, рас-

стояние от иглы до намоточного коллектора – 150 мм. Нетканые матрицы были имплантированы крысам-самцам (группа НМ, $n = 18$) линии Wistar с массой тела 350 ± 20 г. Эксперимент проводили с учетом требований и принципов гуманного обращения с экспериментальными животными [1] в условиях анестезии изофлюраном. Доступ к сердцу производили посредством левосторонней торакотомии с пересечением двух ребер. После выполнения перикардотомии, осуществляли фиксацию матриц двумя узловыми швами (у верхушки и у основания сердца) по углам образцов на передней поверхности сердца. Размер образцов составил $0,7 \times 0,7$ см. В качестве группы сравнения служили ложноперированные животные (группа ЛО, $n = 18$), которым в аналогичных условиях выполнялись все манипуляции за исключением подшивания матриц. В качестве контрольной группы выступили интактные здоровые животные (контроль, $n = 6$). Вывод животных из эксперимента в группах НМ и ЛО производили через 1, 2 и 3 недели после оперативного вмешательства. У всех животных забиралась кровь с целью последующего определения белков острой фазы воспаления (С-реактивный белок (СРБ) и церулоплазмин (ЦП)), моноцитарного хемоаттрактантного белка (MCP-1) и провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-6 и IL-1 β посредством иммуноферментного анализа.

Статистическую обработку результатов эксперимента проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0. Для описания признаков указывали медиану и межквартильный размах – 25-й и 75-й процентиля (Ме (25–75 %)). Для проверки гипотезы о равенстве законов распределений использовали критерий Манна–Уитни. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$. Графически результаты эксперимента представляли в виде диаграмм со значениями Ме (25%-75 %).

Результаты исследования и их обсуждение

При выведении животных групп НМ и ЛО из эксперимента выявлен спаечный процесс. В группе ЛО во всех случаях отмечался спаечный процесс между грудной стенкой и перикардом с вовлечением миокарда. В группе НМ в половине случаев наблюдался спаечный процесс между грудной стенкой и материалом, в основном в области пересеченных ребер и шовного материала. Реакции между миокардом и неткаными матриксами отсутствовали. На основании вышесказанного можно предположить, что развитие спаечного процесса обусловлено травматизацией ребер, а не имплантированными сополимерными матриксами.

Через 1 неделю после операции достоверное повышение СРБ ($16,92 (10,75–26,00)$ мг/мл) относительно контрольных значений ($8,76 (6,48–10,17)$ мг/мл) было зарегистрировано только в группе НМ (рисунок, а). При этом концентрации СРБ в данной группе превышали таковые у интактных животных в 1,9 раза ($p < 0,05$). В последующие этапы наблюдения уровни

СРБ в опытной и контрольной группах достоверно не различались ($p > 0,05$).

Известно, что любое оперативное вмешательство само по себе способно вызвать воспалительный ответ. В связи с этим представляло интерес сравнить выраженность воспалительной реакции на имплантацию нетканых матриц с воспалительным ответом на операционную травму. Для этого значения острофазных белков сравнивались между группами НМ и ЛО. Выявлено, что в 1 неделю наблюдения СРБ в группе с НМ (рисунок, а) был в 1,7 раза выше ($16,92 (10,75–26,00)$ мг/мл), чем в группе ЛО ($9,99 (9,27–12,03)$ мг/мл), $p < 0,05$. На второй неделе наблюдения достоверного различия уровней СРБ в изучаемых группах не выявлено. Однако через 3 недели в группе ЛО отмечено нарастание концентраций СРБ ($13,74 (11,13–16,92)$ мг/мл), которые оказались в 1,5 раза выше, чем в группе НМ ($9,25 (6,43–11,00)$ мг/мл), $p < 0,05$.

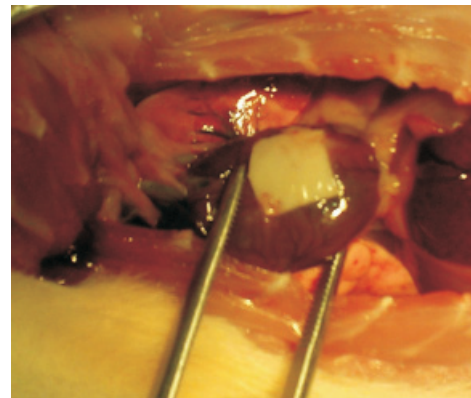
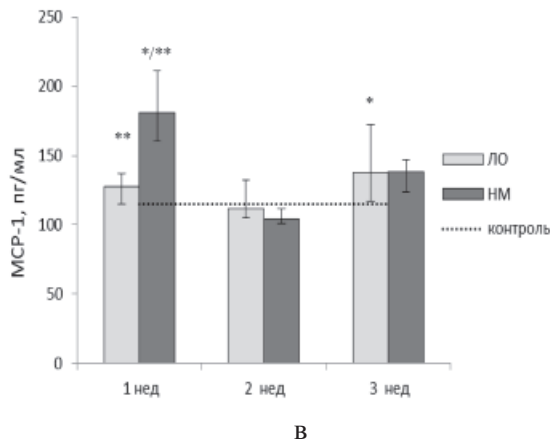
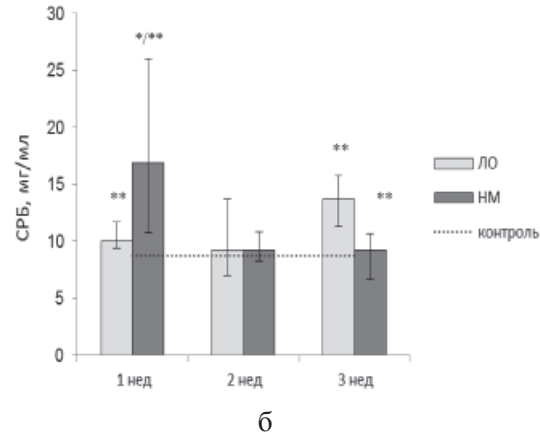
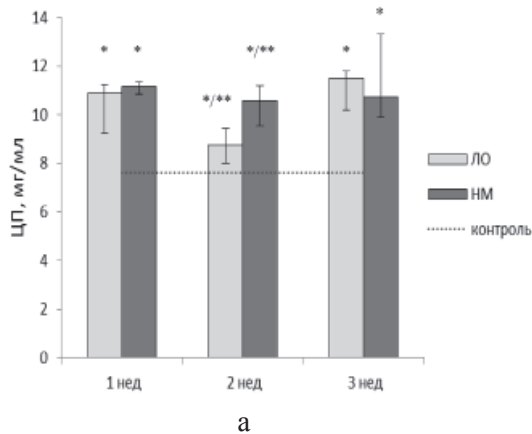
Таким образом, нивелирование воспалительной реакции в группе с имплантированными матриксами происходило быстрее, чем в группе ложноперированных животных, что может быть обусловлено как антипролиферативным эффектом в зоне «матрикс – сердце» после имплантации матриц, так и антиоксидантными свойствами природных биосовместимых полимеров [6].

При изучении динамики ЦП в различные послеоперационные периоды в группах НМ и ЛО в сравнении с контролем выявлено, что между группой контроля и ЛО-группой были достоверные различия (рисунок, б). Так, через 1 неделю после проведения ложной операции концентрация ЦП у животных оказалась в 1,4 раза выше ($10,9 (9,03–11,42)$ мг/мл), чем в группе интактных здоровых животных ($7,63 (5,28–7,94)$ мг/мл), $p < 0,05$. Через 2 недели наблюдения сохранялось достоверное различие показателей с разницей в 1,2 раза, $p < 0,05$. Однако к 3 суткам отмечено повышение уровня ЦП в группе ЛО ($11,48 (9,90–12,09)$ мг/мл), что оказалось в 1,5 выше, чем в контроле ($7,63 (5,28–7,94)$ мг/мл), $p < 0,05$. На наш взгляд, сочетанное повышение СРБ и ЦП через 3 недели после операции в группе ЛО может быть объяснено активными процессами репарации с образованием спаек к этому периоду.

При изучении концентрации ЦП в группе НМ выявлено, что на протяжении всего послеоперационного периода присутствовала достоверная разница концентраций ЦП относительно группы контроля (см. рисунок, б). Значимые различия наблюдались через 1 неделю после имплантации НМ, когда уровни ЦП ($11,16 (10,22–11,59)$ мг/мл)

в 1,5 раза превысили контрольные значения (7,63 (5,28–7,94) мг/мл), $p < 0,05$, с тенденцией к нивелированию данной разницы через 3 недели имплан-

тации. В данный период уровни ЦП (10,74 (9,9–13,32) мг/мл) в 1,2 раза превысили значения в контрольной группе (7,63 (5,28–7,94) мг/мл), $p < 0,05$.



Динамика сывороточных маркеров воспаления в группах ЛО и НМ на различных этапах позднего послеоперационного периода:

а – динамика СРБ; б – динамика церулоплазмينا; в – динамика МСР-1; г – вид нетканого матрикса, имплантированного на переднюю поверхность сердца крысы.

Примечание: ЛО – группа ложнооперированных животных; НМ – группа с фиксацией нетканого матрикса. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ** – $p < 0,05$ между группами ЛО и НМ

При сравнении концентраций ЦП в группах НМ (11,16 (10,22–11,59) мг/мл) и ЛО (10,9 (9,03–11,42) мг/мл) через 1 неделю наблюдения достоверных различий между показателями не выявлено: они были выше, чем в контроле. Спустя 2 недели после операций уровень ЦП в группе НМ начал закономерно снижаться, однако оставался в 1,2 раза выше (10,58 (9,16–11,57) мг/мл), чем в группе ЛО (8,76 (6,73–9,45) мг/мл), $p < 0,05$. Но через 3 недели после проведения операций значения в группе ЛО возросли, а в группе НМ остались практически неизменными, что привело к отсутствию достоверных отличий в этот период.

Таким образом, имплантация нетканых матриксов из ПГБВ/ПКЛ не способствовала усилению воспалительной реакции и была

сродни реакции на операционную травму. Все это свидетельствует о высокой биосовместимости сополимерной композиции, использованной для изготовления нетканого матрикса.

При изучении концентрации МСР-1 (рисунок, в) через 1 неделю после имплантации нетканых матриксов уровень данного хемоаттрактанта (180,7 (160,5–211,2) пг/мл) в 1,6 раза выше, чем в контрольной группе (114,7 (105,82–117) пг/мл), $p < 0,05$. В последующие сроки концентрация МСР-1 снизилась и перестала отличаться от контрольных значений.

При сравнении уровня МСР-1 между группами НМ и ЛО через 1 неделю после операции выявлено, что концентрация МСР-1 в группе НМ (180,7 (160,5–211,2) пг/мл)

в 1,4 раза превышала значения в группе ЛО (127,39 (114,92–137,14) пг/мл), $p < 0,05$. Через 2 и 3 недели после операции уровни МСР-1 в изучаемых группах снизились и достоверно не отличались друг от друга. Однако к сроку 3-недельного наблюдения значения МСР-1 в группах вновь увеличились. При этом достоверных отличий между значениями МСР-1 через 2 и 3 недели в группе ЛО выявить не удалось, а в группе НМ уровень МСР-1 спустя 3 недели после имплантации (138,05 (123,74–146,68) пг/мл) возрос в 1,3 раза по сравнению с 2-недельным сроком (104,55 (100,74–111,54) пг/мл), $p < 0,05$. Следует отметить, что значения МСР-1 через 3 недели в группе ЛО (137,96 (116,76–172,48) пг/мл) были в 1,3 раза выше, чем в контроле (114,7 (105,82–117) пг/мл), $p < 0,05$. При этом в данный же период уровни МСР-1 в контрольной группе и НМ достоверно не различались. Таким образом, нарастание концентрации МСР-1 в сыворотке крыс с имплантированными матриксами спустя 3 недели после имплантации могло свидетельствовать о начале привлечения клеток моноцитарно-макрофагальной системы, ответственных за резорбцию биodeградируемых полимеров в организме, что, однако, оказалось менее выраженным, чем при репарации операционной раны и образования спаек (на примере группы ЛО). Уровни IL-6, IL-1 β и TNF- α в группах НМ и ЛО во все периоды наблюдения не отличались между собой и от данных группы контроля. Все вышесказанное вновь указывает на биологическую безопасность матриксов на основе ПГБВ/ПКЛ.

Заключение

Динамика сывороточных маркеров воспаления при имплантации нетканых матриксов на основе 5% ПГБВ/10% ПКЛ продемонстрировала высокую биосовместимость изготовленных матриксов, что подтверждалось выраженным снижением воспалительного ответа в позднем послеоперационном периоде. Ускоренное нивелирование воспалительной реакции на имплантацию нетканых матриксов, вероятно, обусловлено свойствами полимеров, входящих в их состав.

Список литературы

1. Абдрашитова Э.Х., Зайцев Т.И., Комаровская Т.П. Стандартизация лабораторных животных по состоянию здоровья // Ланималогия. – 1993. – № 1. – С. 7–12.
2. Волков А.В. Синтетические материалы на основе полимеров органических кислот в тканевой инженерии // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2005. – № 2. – С. 43–45.
3. Шехтер А.Б., Розанова И.Б. Тканевая реакция на имплант // Биосовместимость / под ред. В.И. Севастьянова. – М., 1999. – С. 174–211.
4. Шишаккая Е.И., Еремеев А.В., Гительзон И.И. Исследование свойств биodeградируемых полимеров (полиоксисилканоатов) в культуре животных клеток // Перспективные материалы. – 2001. – № 3. – С. 40–47.
5. Шишаккая Е.И. Клеточные матриксы из резорбируемых полигидроксиалканоатов // Клет. Транспл. и ткан. инж. – 2007. – Т II. – № 2. – С. 68–72.
6. Luzier W.D. Materials derived from biomass/biodegradable materials // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – Vol. 89. – P. 839–842.
7. Pankajakshan D., Krishnan K., Krishnan L. Vascular tissue generation in response to signaling molecules integrated with a novel poly(ϵ -caprolactone)-fibrin hybrid scaffold // J. Tissue Eng. Regen. Med. – 2007. – № 1. – P. 389–397.

References

1. Abdrashitova Je.H., Zajcev T.I., Komarovskaja T.P. *Lanimalogija*. 1993. no. 1. pp. 7–12.
2. Volkov A. V. *Kletochnaja transplantologija i tkanevaja inzhenerija*. 2005. no. 2. pp. 43–45.
3. Shehter A.B., Rozanova I.B. *Tkanevaja reakcija na implant // v kn.: Biosovmestimost' / pod redakciej V.I.Sevast'janova*. M. 1999. pp. 174–211.
4. Shishackaja E.I., Eremeev A.V., Gitel'zon I.I. *Perspektivnye materialy*. 2001. no. 3. pp. 40–47.
5. Shishackaja E.I. *Klet. Transpl. i tkan. inzh. 2007. T II*. no. 2. pp. 68–72.
6. Luzier W.D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. Vol. 89. pp. 839–842.
7. Pankajakshan D., Krishnan K., Krishnan L. *J. Tissue Eng. Regen. Med*. 2007. no. 1. pp. 389–397.

Рецензенты:

Лисаченко Г.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой патологической физиологии ГОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Кемерово;

Будаев А.В., д.м.н., профессор кафедры патологической физиологии ГОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Кемерово.

Работа поступила в редакцию 14.08.2013.