

УДК 616-018. 616-002. 616-092.9

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ЗАСЕЛЕНИЯ КЛЕТОЧНЫМИ ЭЛЕМЕНТАМИ И БИОСОВМЕСТИМОСТИ СКАФФОЛДА НА ОСНОВЕ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА В УСЛОВИЯХ IN VIVO

**Иванов А.Н., Козадаев М.Н., Богомолова Н.В., Матвеева О.В.,
Пучиньян Д.М., Норкин И.А.**

*Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии,
Саратов, e-mail: lex558452@rambler.ru*

Одним из значимых направлений развития тканеинженерных технологий в настоящее время является создание материалов, способных обеспечивать замещение и восстановление дефектов тканей. При этом особое значение для регенеративной медицины имеет разработка специальных матриц, или скаффолдов, функциональное назначение которых заключается в создании структурной поддержки, а также оптимальных условий для метаболизма и дифференцировки клеток, возможностей васкуляризации и ремоделирования регенерирующей ткани. В данной экспериментальной работе представлены результаты оценки одного из главных критериев, предъявляемых к материалам для тканевой инженерии, – биосовместимости оригинальных матриц на основе поликапролактона (ПКЛ). Кроме того, описана динамика заселения ПКЛ-скаффолда элементами соединительной ткани при подкожной имплантации матрицы белым крысам. Результаты исследования позволяют сделать заключение о том, что данный тип матриц обладает хорошей биосовместимостью и активно заселяется клеточными элементами в условиях *in vivo*.

Ключевые слова: скаффолд, регенерация, поликапролактон, биосовместимость

INVESTIGATION OF CELL SEEDING DYNAMICS AND BIOCOPATIBILITY OF POLYCAPROLACTONE SCAFFOLD IN IN VIVO

**Ivanov A.N., Kozadaev M.N., Bogomolova N.V., Matveeva O.V.,
Puchinyan D.M., Norkin I.A.**

Saratov Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Saratov, e-mail: lex558452@rambler.ru

Creation of materials that can provide replacement and restoration of tissue defects is one of the most important directions of tissue-engineering development. Elaboration of special matrices or scaffolds which functions are structural support, formation of optimal conditions for metabolism, cell differentiation, as well as vascularization and remodeling abilities during subsequent tissue regeneration and development is particular important for regenerative medicine. This article presents the results of experimental evaluation of the original matrix based on polycaprolactone (PCL) biocompatibility as the main criteria for tissue engineering materials. Moreover, this article contain description of the PCL-scaffold seeding dynamics by elements of connective tissue during subcutaneous implantation in white rats. Results of the study allow to conclude that this type of matrix has good biocompatibility and actively populated by cellular elements *in vivo*.

Keywords: scaffold, regeneration, polycaprolactone, biocompatibility

В настоящее время для изготовления скаффолдов применяются различные материалы, которые являются полимерами синтетического или природного происхождения, а также их гибриды [3]. Растущий интерес к синтетическим материалам для тканевой инженерии обусловлен целым рядом их положительных характеристик, в частности простотой изготовления и химической модификации, высокой универсальностью, способностью к биодegradации и возможностью модуляции механических свойств [1, 4]. Требуемым биомеханическим свойствам и параметрам биодegradации материала для изготовления матриц соответствует поликапролактон [3, 10], поэтому перспективным представляется его использование при изготовлении матриц для стимуляции регенерации поврежденной ткани. Подобные матрицы могут использоваться в качестве субстрата для заселения собственными

клетками из зоны дефекта [3], что позволяет избежать осложнений, которые могут возникнуть при трансплантации культивированных в условиях *in vitro* клеток [6].

На заселение матрицы клетками оказывают влияние такие аспекты, как иммунологические и биомеханические свойства материала, пористость скаффолда и другие, поэтому оценка параметров биосовместимости предлагаемых матриц имеет особое значение [1, 3]. Для оценки биосовместимости могут быть использованы клеточные культуры, которые, однако, не позволяют оценить иммунную реакцию целого организма [8]. Поэтому при оценке биосовместимости методы, проводимые *in vitro*, обязательно дополняются имплантационными тестами, в том числе морфологическим исследованием биоптатов тканей, полученных из области имплантации скаффолдов у экспериментальных животных [8].

В связи с этим целью работы являлось изучение биосовместимости и динамики заселения клетками оригинального скаффолда на основе поликапролактона в условиях *in vivo*.

Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования выполнены на 90 белых беспородных крысах-самцах массой 200–250 г. При проведении экспериментов на животных соблюдались этические принципы в соответствии с Женевской конвенцией (Geneva, 1990). Всем животным за 5 минут до проведения манипуляций вводилась внутримышечно комбинация золетила («Virbac Sante Animale», Франция) в дозе 0,1 мл/кг и ксилазина («Interchemie», Нидерланды) в дозе 1 мг/кг для достижения наркоза.

Оригинальные скаффолды на основе ПКЛ были изготовлены лабораторией «Материалы специального назначения» ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» Минобрнауки России. В работе использовали два типа матриц: оригинальный скаффолд на основе ПКЛ (опытный скаффолд) и скаффолд на основе ПКЛ, содержащий чужеродный белок (скаффолд, не обладающий биосовместимостью, для формирования группы отрицательного контроля).

Имплантацию матриц проводили по методике [11], скаффолды толщиной 0,1 мм в форме диска диаметром 15 мм имплантировали в подкожно-жировую клетчатку в области холки животных, после чего на рану накладывались швы. У ложнооперированных животных проводилось оперативное вмешательство соответствующего объема, но без имплантации скаффолда.

Выведение животных из эксперимента проводили путем декапитации по 10 особей из каждой группы на 7, 14 и 21 сутки эксперимента.

Для морфологического исследования осуществляли вырезку мягких тканей области имплантации, включая скаффолд, единым блоком. Материал для морфологического исследования фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина (ООО «Биовитрум», Россия), обезжировали в спиртах восходящей крепости, после чего для выполнения срезов препараты фиксировали в твердом парафине. 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).

Исследование препаратов проводили при помощи микроскопа Axiolmager Z2 (производство CarlZeiss, Германия), оценивая структуру, клеточный состав, состояние микроциркуляторного русла окружающих матрицу мягких тканей, динамику заселения скаффолда клеточными элементами и состав клеточной популяции матрицы.

Дизайн экспериментальной работы включал в себя разделение животных на 3 группы, по 30 особей в каждой: группа сравнения (ложнооперированные животные) – крысы, которым выполнялось хирургическое вмешательство в полном объеме, но без имплантации скаффолда; отрицательный контроль – животные, которым был имплантирован скаффолд на основе ПКЛ с адсорбированным на его поверхности чужеродным белком (матрица, не обладающая биосовместимостью), и опытная группа – животные, которым выполнялась имплантация оригинального скаффолда на основе ПКЛ.

Результаты исследования и их обсуждение

Данные проведенных морфологических исследований свидетельствуют, что у животных группы сравнения на 7-е сутки после оперативного воздействия отмечается умеренное полнокровие сосудов микроциркуляторного русла, а также отек подкожной жировой клетчатки. В некоторых сосудах определяется десквамация клеток эндотелия. В подкожно-жировой клетчатке обнаруживаются единичные лимфоциты и незначительное количество нейтрофильных лейкоцитов.

На 14-е сутки эксперимента у животных группы сравнения в зоне оперативного вмешательства выявляется умеренное кровенаполнение сосудов микроциркуляторного русла. В мягких тканях определяется незначительное количество нейтрофильных лейкоцитов и единичные лимфоциты. На 21-е сутки эксперимента определяется умеренное кровенаполнение сосудов с интактным эндотелием.

В ходе морфологического исследования препаратов в группе отрицательного контроля установлено, что через 7 суток эксперимента наблюдается выраженная воспалительная реакция, сопровождающаяся полнокровием сосудов мягких тканей на границе с имплантатом. Выявляется умеренный отек элементов соединительной ткани и выраженная инфильтрация на границе с имплантатом клетками лейкоцитарного ряда: нейтрофилами, моноцитами, макрофагами, лимфоцитами. Кроме того, обнаружено набухание эндотелиальных клеток, десквамация отдельных эндотелиоцитов и множественные мелкоочаговые кровоизлияния. В структуре скаффолда определяются лейкоциты, преимущественно нейтрофилы. Отмечаются явления отека и диапедеза эритроцитов.

Через 14 суток после имплантации матрицы, не обладающей биосовместимостью, в перифокальной зоне выявлена пролиферация клеток фибробластического ряда и формирование ограничивающего соединительнотканного барьера, который инфильтрирован нейтрофилами, моноцитами, макрофагами, лимфоцитами. Стенки сосудов микроциркуляторного русла утолщены, отмечается активация адвентициальных клеток с частично десквамированным эндотелием. В структуре скаффолда и в перифокальной области имеются сидерофаги, а также свободнолежащие глыбки гемосидерина. Заселение матрицы соединительнотканными элементами протекает слабо. В структуре имплантата определяются нейтрофильные лейкоциты, единичные лимфоциты и моноциты. В отдельных участках

скаффолда выявлено формирование единичных тонкостенных сосудов.

В группе отрицательного контроля на 21-е сутки наблюдается сформированный барьер грануляционной ткани, отделяющий скаффолд. Отграничивающий барьер инфильтрирован лейкоцитами: нейтрофилами, макрофагами, моноцитами с единичными плазматическими клетками. В сосудах микроциркуляторного русла окружающих мягких тканей неравномерный кровоток, местами отмечаются мелкоочаговые кровоизлияния и диапедез эритроцитов. В структуре скаффолда выявляются: моноциты и макрофаги, нейтрофилы, единичные плазматические клетки, лимфоциты, небольшое количество фибробластов и фиброцитов, а также единичные сосуды микроциркуляторного русла.

В ходе морфологического исследования установлено, что у животных через 7 суток после имплантации скаффолда на основе ПКЛ воспалительные изменения проявляются полнокровием сосудов микроциркуляторного русла. При этом отмечается незначительный отек элементов соединительной ткани с умеренной инфильтрацией перифокальной зоны единичными нейтрофилами и лимфоцитами. Стенки сосудов утолщены, отмечается набухание эндотелиальных клеток и десквамация эндотелиоцитов, а также активация адвентициальных клеток. Выраженность воспалительных изменений через 7 суток после имплантации ПКЛ-скаффолда сопоставима с реакцией, обнаруженной у ложнооперированных животных. Так же, как и у животных групп сравнения и отрицательного контроля, определяются единичные мелкоочаговые кровоизлияния. В структуре матрицы присутствуют единичные лейкоциты на фоне преобладающих фибробластических элементов. Определяется неравномерность заселения скаффолда соединительнотканью элементами, скопление которых наиболее выражено на границе матрицы с тканями.

Через 14 суток после имплантации скаффолда на основе ПКЛ установлено, что у животных сохраняется незначительное воспаление, которое сопровождается полнокровием кровеносных сосудов. В отдельных сосудах отмечается активация адвентициальных клеток, однако, в отличие от 7-х суток эксперимента, воспалительные изменения эндотелиальных клеток не обнаружены. На границе скаффолда и мягких тканей незначительная инфильтрация клетками лейкоцитарного ряда, представленная единичными нейтрофилами и лимфоцитами. В перифокальной зоне обнаруживаются единичные сидерофаги и свободнолежащие глыбки гемосидерина. В отличие от 7-х суток эксперимента фибробластические

элементы равномерно распределены по структуре имплантата. В составе клеточной популяции скаффолда присутствуют единичные лейкоциты: нейтрофилы, макрофаги, лимфоциты. В отличие от группы отрицательного контроля на 14-е сутки отмечается интенсивная васкуляризация матрицы с умеренным кровенаполнением новообразованных сосудов матрицы.

В ходе морфологического исследования препаратов области имплантации ПКЛ-скаффолда на 21-е сутки эксперимента выявлено умеренное кровенаполнение сосудов микроциркуляторного русла. Скаффолд на основе ПКЛ равномерно заселен фибробластами и фиброцитами, однако популяция клеток фибробластического ряда значительно увеличивается по сравнению как с 7-ми, так и с 14-ми сутками. Кроме того, в отличие от 14-х суток количество фиброцитов превышает число фибробластов в структуре скаффолда. В составе клеточной инфильтрации матрицы выявляются единичные лимфоциты и макрофаги. Активное заселение матрицы фибробластическими элементами является особенностью, характерной для данной группы, в отличие от группы отрицательного контроля в аналогичные сроки имплантации. По сравнению с группой отрицательного контроля в структуре матрицы отмечается интенсивная васкуляризация с умеренным кровенаполнением образованных сосудов. Кроме того, в отличие от группы отрицательного контроля в тот же срок наблюдения, на 21-е сутки после имплантации ПКЛ-матрицы, происходит истончение волокон скаффолда, что свидетельствует о начавшейся биодеградации.

Полученные данные свидетельствуют, что оперативное вмешательство в объеме, соответствующем имплантации скаффолда, вызывает реактивные изменения в мягких тканях, которые наиболее выражены на 7-е сутки эксперимента, переходят в подострую стадию на 14-е сутки и полностью исчезают к 21-м суткам. Полнокровие сосудов и отек подкожной клетчатки у животных после оперативного вмешательства обусловлены тесным сопряжением системы микроциркуляции и тканевого гомеостаза [2].

При подкожной имплантации белым крысам скаффолда, не обладающего биосовместимостью, изменения морфологической картины кардинально отличаются от таковых у группы сравнения. Отек и выраженная лейкоцитарная инфильтрация как самого скаффолда, так и окружающих его тканей свидетельствуют о развитии активной воспалительной реакции. Формирование отграничивающего барьера в зоне имплантации скаффолда к 14-м суткам отражает переход воспалительной реакции в пролиферативную

фазу. На фоне выраженной лейкоцитарной инфильтрации заселение скаффолда клетками соединительной ткани и васкуляризация происходят крайне слабо. Полученные данные подтверждают ключевую роль биосовместимости матриц в процессах ее заселения клеточными элементами при регенерации тканей и согласуются с результатами других исследований [3].

При имплантации скаффолда на основе ПКЛ реактивные изменения окружающих тканей выражены незначительно и полностью купируются к 21-му дню эксперимента так же, как в группе сравнения. Данный факт свидетельствует в пользу того, что реактивные изменения при имплантации ПКЛ-матрицы могут являться следствием механической травматизации тканей. Наличие транзиторных реактивных изменений не противоречит современным концепциям, согласно которым биосовместимость не подразумевает абсолютной инертности матриц [5].

Скаффолд на основе ПКЛ активно заселяется клетками соединительной ткани, в то время как в группе отрицательного контроля заселение протекает крайне слабо вне зависимости от срока имплантации. Вместе с тем выявлена интенсивная васкуляризация скаффолда с 14-х суток после имплантации, что также отличает животных данной группы отрицательного контроля. Полученные данные согласуются с результатами оценки биосовместимости ПКЛ-скаффолдов в условиях *in vitro*, которые свидетельствуют о хорошей адгезии и пролиферации клеток, культивируемых на подобных матрицах [7, 8, 9].

Заключение

Результаты имплантационных тестов свидетельствуют об интенсивном заселении элементами соединительной ткани и васкуляризации оригинальных матриц на основе поликапролактона на фоне слабо выраженных реактивных изменений окружающих тканей, что доказывает биологическую совместимость данного типа матриц и определяет перспективы их использования в технологиях тканевой инженерии.

Список литературы

1. 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.
2. Коррекция микроциркуляторных нарушений в стратегиях менеджмента остеоартрита и остеохондропатий / А.Н. Иванов, А.С. Федонников, И.А. Норкин, Д.М. Пучиньян // Российский медицинский журнал. – 2015. – Т. 21, № 1. – С. 18–23.
3. 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.
4. 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.

5. Adsorbed fibrinogen leads to improved bone regeneration and correlates with differences in the systemic immune response / S.G. Santos, M. Lamghari, C.R. Almeida, M.I. Oliveira et al // Acta Biomater. – 2013. – Vol. 9, № 7. – P. 7209–7217.

6. Cartilage tissue engineering identifies abnormal human induced pluripotent stem cells / A. Yamashita, S. Liu, K. Woltjen, et al // Scientific Reports 3, Article. – 2013 – available at: <http://www.nature.com/srep/2013/130613/srep01978/full/srep01978.html>.

7. Comparison of Cellular Proliferation on Dense and Porous PCL Scaffolds / H. Şaşmazel, M. Gümüşderelioglu, A. Gürpınar, M.A. Onur // Bio-Medical Materials and Engineering. – 2008. – Vol. 18, № 3. – P. 119–128.

8. 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.

9. 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.

10. 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.

11. 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.

References

1. Ivanov A.N., Norkin I.A., Puchin'yan D.M. Tsitologiya, 2014, Vol. 56, no. 8, pp. 543–548.
2. Ivanov A.N., Fedonnikov A.S., Norkin I.A., Puchin'yan D.M. Rossijskij medicinskij zhurnal, 2015, Vol. 21, no. 1, pp. 18–23.
3. Novochadov V.V. Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo universiteta. 2013, Vol. 1, no. 5, pp. 19–28.
4. Dhollander A.A., Liekens K., Almqvist K.F., Verdonk R., Lambrecht S., Elewaut D., Verbruggen G. Arthroscopy, 2012, no. 28, pp. 225–233.
5. Santos S.G., Lamghari M., Almeida C.R., Oliveira M.I., Neves N., Ribeiro A.C., Barbosa J.N., Barros R., Maciel J., Martins M.C., Gonçalves R.M., Barbosa M.A. Acta Biomater, 2013, Vol. 9, no. 7, pp. 7209–7217.
6. Yamashita A., Liu S., Woltjen K., Thomas B., Meng G., Hotta A., Takahashi K., Ellis J., Yamanaka S., Rancourt D.E. Scientific Reports 3, Article. 2013, available at: <http://www.nature.com/srep/2013/130613/srep01978/full/srep01978.html>.
7. Şaşmazel H., Gümüşderelioglu M., Gürpınar A., Onur, M.A. Bio-Medical Materials and Engineering, 2008, Vol. 18, no. 3, pp. 119–128.
8. Erisken C., Kalyon D.M., Wang H. Biomaterials, 2008, V 29, no 30, pp. 4065–4073.
9. Schagemann J.C., Chung H.W., Mrosek E.H., Stone J.J., Fitzsimmons J.S., O'Driscoll S.W., Reinholz G.G. Biomed Mater Res A, 2010, Vol. 9, no. 2, pp. 454–463.
10. Potter K., Butler J.J., Horton W.E., Spencer R.G.S. Arthritis Rheum, 2000, no. 43, pp. 1580–1590.
11. Dorj B., Won J.E., Kim J.H., Choi S.J., Shin U.S., Kim H.W. J Biomed Mater Res A, 2013, Vol. 101, no. 6, pp. 1670–1681.

Рецензенты:

Бугаева И.О., д.м.н., профессор, проректор по учебно-воспитательной работе, заведующая кафедрой гистологии, ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России, г. Саратов;

Масляков В.В., д.м.н., профессор, проректор по научной работе и связям с общественностью, НГОУ ВПО «Саратовский медицинский институт «РЕАВИЗ», г. Саратов.

Работа поступила в редакцию 02.03.2015.