

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ МАТРИЦ НА ОСНОВЕ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА И ГИДРОКСИАПАТИТА В УСЛОВИЯХ IN VIVO

© А. Н. Иванов,¹ М. Н. Козадаев, Н. В. Богомолова, О. В. Матвеева,
Д. М. Пучиньян, И. А. Норкин, Ю. Е. Сальковский, Г. П. Любунь

Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии
Министерства здравоохранения РФ;

¹ электронный адрес: lex558452@rambler.ru

Биосовместимость матрицы является одним из основных требований, предъявляемых к скаффолдам. Настоящее исследование посвящено изучению динамики заселения клетками оригинального скаффолда на основе поликапролактона и гидроксиапатита в условиях *in vivo*, а также реакций окружающих тканей на имплантацию для оценки биосовместимости данной матрицы. В результате проведенных исследований установлено, что при подкожной имплантации скаффолда на основе поликапролактона и гидроксиапатита белым крысам реактивные изменения в перифокальной зоне полностью купируются к 21-м сут эксперимента. Матрица активно заселяется клетками соединительной ткани в период с 7-х по 21-е сут эксперимента. Вместе с тем отмечается интенсивная васкуляризация скаффолда с 14-х сут после имплантации. Полученные данные позволяют сделать вывод о высокой степени биосовместимости скаффолда на основе поликапролактона и гидроксиапатита.

Ключевые слова: скаффолд, поликапролактон, гидроксиапатит, биосовместимость.

Принятые сокращения: ГА — гидроксиапатит, ПКЛ — поликапролактон.

Современные технологии тканевой инженерии, включающие в себя создание трехмерных матриц (скаффолдов), представляют собой перспективный способ решения проблемы замещения утраченных тканей. Использование трехмерных матриц позволяет добиться не только структурного замещения дефекта, но и восстановления функций поврежденной ткани (Grayson et al., 2009; Dvir et al., 2011; Новочадов, 2013). На сегодняшний день одним из разрабатываемых в рамках данного направления подходов является имплантация бесклеточных биодеградируемых матриц, которые могут выступать в качестве субстрата для заселения собственными клетками организма из перифокальной зоны дефекта, а другим — имплантация тканеинженерных конструкций, содержащих культивированные клетки в условиях *in vitro* (Dhollander et al., 2012; Yamashita et al., 2013).

Для создания скаффолдов используется обширный спектр материалов, имеющих как природное, так и искусственное происхождение, а также их гибриды (Ko et al., 2010; Martel-Estrada et al., 2012; Иванов и др., 2014), позволяющие добиться наиболее оптимальных характеристик матрицы. Причины возрастающего интереса разработчиков к синтетическим скаффолдам для тканевой инженерии заключаются в простоте их изготовления и химической модификации, высокой универсальности, возможности регуляции механических свойств и параметров биодеградации (Новочадов, 2013). Механические свойства матрицы имеют особое значение при ее использовании для стимуляции регенерации хрящевой и костной тканей. Для этих тканей наиболее перспективно ис-

пользование гибридных скаффолдов на основе синтетических полимеров с включением в их состав минеральных компонентов (Shor et al., 2013). Одним из синтетических полимерных материалов, которые могут быть использованы в качестве основы матрицы, является поликапролактон (ПКЛ). Этот полимер был одобрен в странах Евросоюза и США для применения в медицинских целях, в частности для изготовления шовного материала «Монокрил» фирмы Johnson & Johnson (США) и эндодонтических материалов для стоматологии «Resilon» (Lotfi et al., 2013). Отсутствие цитотоксических эффектов ПКЛ, хорошая адгезия и пролиферация клеток на матрицах из этого материала в условиях *in vitro* определяют перспективы его использования в тканевой инженерии (Serrano et al., 2004; Sasmazel et al., 2008; Schagemann et al., 2010). Гидроксиапатит (ГА) является кристаллохимическим аналогом минеральной составляющей тканей скелета животных и людей, а применение его для создания комбинированных матриц позволяет добиться требуемых структурно-механических параметров, в частности жесткости, а также улучшить остеоиндуктивные свойства скаффолда (Стариков, Рудченко, 2010). В условиях *in vitro* было установлено, что включение в матрицу на основе ПКЛ ГА стимулирует пролиферацию и дифференцировку остеобластов (Thadavirul et al., 2014). В этой связи лабораторией Материалы специального назначения Саратовского государственного университета им. Н. Г. Чернышевского Министерства образования и науки РФ методом электроформования были разработаны и изготовлены оригинальные скаффолды на основе ПКЛ и

ГА для стимуляции регенерации костной и хрящевой тканей.

Одним из основных требований, предъявляемых к скаффолдам, является их биосовместимость (Новоцадов, 2013). Согласно межгосударственному стандарту ГОСТ ISO 10993-1-2011, рекомендуемые методы оценки биологического действия изделий медицинского назначения включают в себя имплантационные тесты, целью которых является установление местного патогенного действия на живую ткань. При разработке скаффолдов, в том числе для регенерации костной и хрящевой тканей, проведение оценки биосовместимости матриц в условиях *in vivo* выполняют путем их гетеротопической имплантации в подкожную клетчатку крысам (Dorj et al., 2013). Это связано с тем, что подкожная клетчатка включает в себя все основные соединительнотканые элементы, имеет большую скорость метаболизма по сравнению с костной и хрящевой тканями, а кроме того, хорошо васкуляризована (в то время как здоровый суставной хрящ является аваскулярной тканью). Указанные особенности подкожной клетчатки крыс позволяют быстро выявить воспалительную реакцию на имплантируемую матрицу, оценить возможность заселения скаффолда соединительноткаными элементами, а также его биодеградацию и ремоделирование (Dorj et al., 2013). Следует также отметить, что, согласно межгосударственному стандарту ГОСТ ISO 10993-1-2011, при оценке биосовместимости рекомендуется имплантация бесклеточных скаффолдов.

В связи с этим целью данного исследования являлось изучение заселения клетками оригинального скаффолда на основе поликапролактона и гидроксиапатита в условиях *in vivo*, а также реакций окружающих тканей на имплантацию для оценки биосовместимости данной матрицы.

Материал и методика

Выполненная экспериментальная работа была проведена в соответствии с принципами биоэтики и правилами лабораторной практики (GLP), Конвенцией по защите животных, используемых в эксперименте и других научных целях (принятой Советом Европы в 1986 г.), приказом МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики». Исследование соответствует этическим нормам, изложенным в Женевской конвенции (1971), «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985), «Хельсинкской декларации по вопросам медицинской этики» и «Международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с использованием лабораторных животных» (1989).

Экспериментальное исследование выполнено на 90 белых нелинейных крысах-самцах массой 200—260 г. Экспериментальные животные были разделены на 3 группы по 30 особей в каждой. 1-я группа — группа сравнения — состояла из животных, которых подвергали хирургическому вмешательству, включающему в себя формирование «кармана» в подкожной клетчатке и наложение швов, но без имплантации скаффолда. 2-я группа состояла из животных, которым выполняли подкожную гетеротопическую имплантацию скаффолда на основе ПКЛ, на поверхности которого был адсорбирован чужеродный белок с целью провокации воспалительной реакции (отрицательный контроль — скаффолд, не обладающий биосовместимостью). 3-я группа — опытная — была

представлена животными, которым проводили подкожную гетеротопическую имплантацию скаффолда на основе ПКЛ и ГА в область холки.

Всем животным за 5 мин до проведения манипуляций вводили внутримышечно комбинацию золетила (Virbac Sante Animale, Франция) в дозе 0.1 мл/кг и ксилазина (Interchemie, Нидерланды) в дозе 1 мг/кг для достижения наркоза.

Для имплантации использовали оригинальные скаффолды на основе ПКЛ, а также ПКЛ и ГА, разработанные и изготовленные в отделе электроформования Образовательно-научного института наноструктур и биосистем Саратовского государственного университета им. Н. Г. Чернышевского. Состав матрицы включал в себя 95 % ПКЛ и 5 % ГА. Диаметр волокон скаффолдов — 50—500 нм, пористость — не менее 90 %.

Скаффолды в форме диска диаметром 15 мм, толщиной 0.1 мм имплантировали экспериментальным животным в подкожную клетчатку межлопаточной области по методике, описанной ранее (Dorj et al., 2013).

Выведение животных из опыта осуществляли путем декапитации по 10 особей из каждой группы на 7, 14 и 21-е сут эксперимента.

Для проведения морфологического исследования проводили забор мягких тканей области имплантации, включая в себя скаффолд, единым блоком. Материал для морфологического исследования фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина (Биовитрум, Россия), обезжизняли в спиртах возрастающей концентрации, после чего для выполнения срезов препараты заливали в парафин. Срезы толщиной 5—10 мкм окрашивали гематоксилином Майера (Биовитрум, Россия) и эозином (Биовитрум, Россия). Для покрытия срезов применяли среды Bio-Monht и Bio-Clear (Bio Optica, Италия).

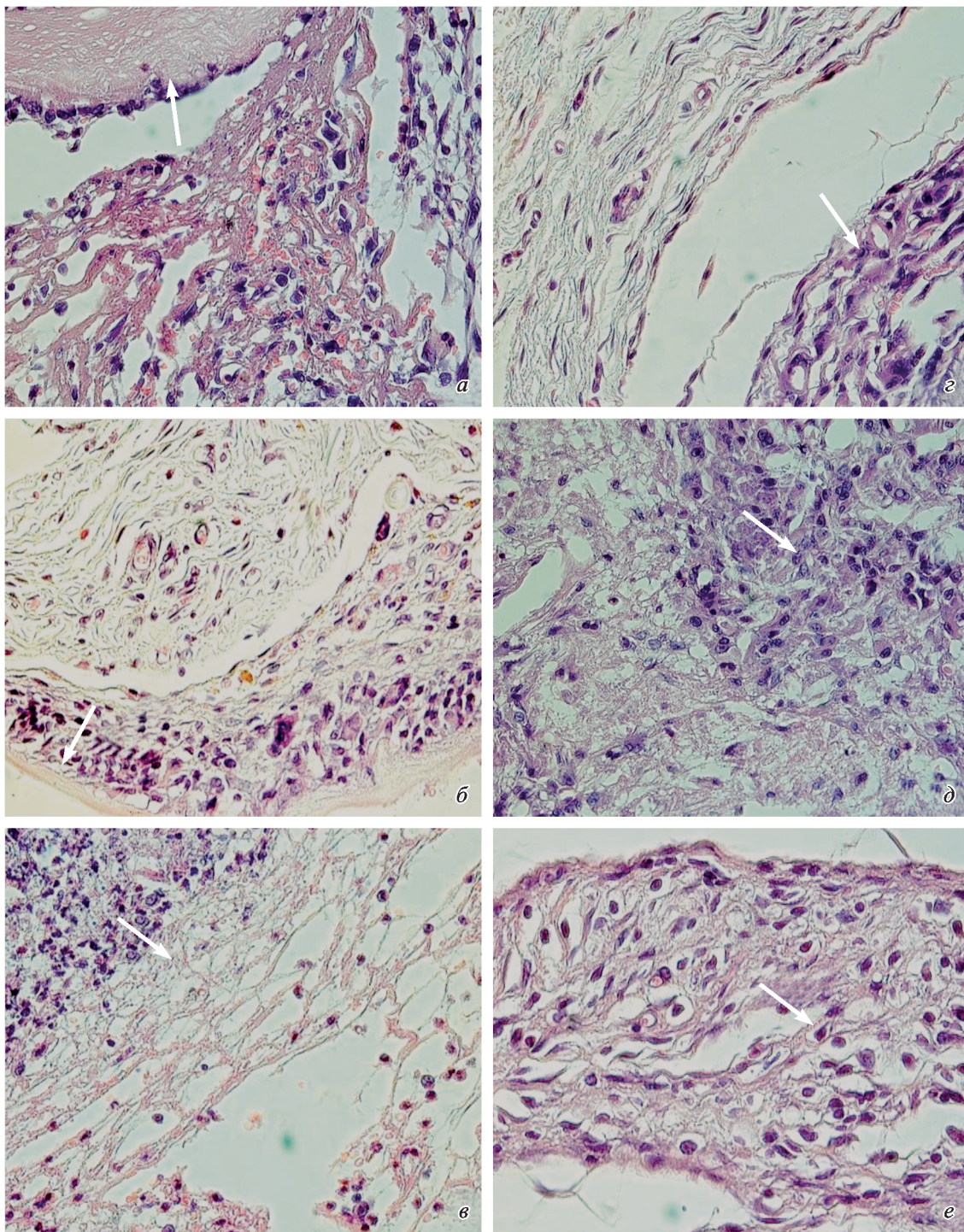
Исследование препаратов проводили при помощи микроскопа AxioImager Z2 (Carl Zeiss, Германия), оценивая структуру, клеточный состав, состояние микроциркуляторного русла окружающих матрицу мягких тканей, динамику заселения скаффолда клеточными элементами и состав клеточной популяции матрицы. При оценке динамики состава клеточной популяции матрицы проводили подсчет количества фибробластов, фиброцитов, нейтрофильных лейкоцитов, моноцитов и макрофагов, а также лимфоцитов на одно поле зрения.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли при помощи пакета программ Statistica 10.0. Проверяли гипотезы о виде распределений (критерий Шапиро—Уилкса). Большинство наших данных не соответствовало закону нормального распределения, поэтому для сравнения значений использовали U-критерий Манна—Уитни, на основании которого рассчитывали Z-критерий и показатель достоверности P . Различия считали статистически значимыми при $P < 0.05$.

Использованные реактивы: Золетил 100 (Virbac Sante Animale, Франция); Ксиланит (Interchemie, Нидерланды); гематоксидин Майера, 1%-ный водный раствор эозина, среды Bio-Monht и Bio-Clear, этиловый спирт, хлороформ и 10%-ный раствор нейтрального формалина (Биовитрум, Россия).

Результаты

В результате проведенных исследований установлено, что у животных группы сравнения (ложнооперированных животных) через 7 сут после хирургическо-



Заселение клетками соединительной ткани скаффолда на основе ПКЛ с адсорбированным на его поверхности чужеродным белком (а—в) и скаффолда на основе ПКЛ и ГА (г—е) и изменения тканей в зоне имплантации на 7-е (а, г), 14-е (б, д) и 21-е (в, е) сут после операции.

Гематоксилин-эозин. Об. 40×. Стрелками обозначен скаффолд.

го вмешательства отмечаются умеренно выраженные полнокровные сосуды микроциркуляторного русла и отек подкожной жировой клетчатки. При этом в отдельных сосудах обнаруживается десквамация эндотелиальных клеток. В подкожной жировой клетчатке выявлены незначительное количество нейтрофильных лейкоцитов, а также единичные лимфоциты. У животных группы сравнения на 14-е сут эксперимента было обнаружено

преимущественно умеренное кровенаполнение сосудов микроциркуляторного русла в зоне оперативного вмешательства. В подкожной жировой клетчатке определяется незначительное количество нейтрофильных лейкоцитов и единичные лимфоциты. На 21-е сут эксперимента у животных группы сравнения не выявлено патологических изменений в области оперативного вмешательства.

Т а б л и ц а 1

Динамика состава клеточной популяции скаффолда у животных группы отрицательного контроля

Клетки	Число клеток в поле зрения после имплантации через		
	7 сут	14 сут	21 сут
Фибробласты	5 (3; 6)	8 (6; 9) $Z_1 = 2.98$; $P_1 = 0.002827$	17 (14; 23) $Z_1 = 3.74$; $P_1 = 0.000183$; $Z_2 = 3.70$; $P_2 = 0.000212$
Фibroциты	0 (0; 0)	1 (0; 2) $Z_1 = 1.62$; $P_1 = 0.104111$	6 (4; 9) $Z_1 = 3.70$; $P_1 = 0.000212$; $Z_2 = 3.43$; $P_2 = 0.000583$
Нейтрофилы	56 (46; 65)	58 (44; 67) $Z_1 = 0.11$; $P_1 = 0.909722$	44 (42; 56) $Z_1 = 1.32$; $P_1 = 0.185878$; $Z_2 = 1.47$; $P_2 = 0.140466$
Моноциты и макрофаги	11 (9; 13)	37 (32; 39) $Z_1 = 3.74$; $P_1 = 0.000183$	35 (28; 41) $Z_1 = 3.74$; $P_1 = 0.000183$; $Z_2 = 0.26$; $P_2 = 0.791337$
Лимфоциты	25 (22; 35)	30 (23; 35) $Z_1 = 0.56$; $P_1 = 0.570751$	9 (7; 12) $Z_1 = 3.74$; $P_1 = 0.000183$; $Z_2 = 3.74$; $P_2 = 0.000183$

П р и м е ч а н и е. В каждом случае приведены медиана, верхний и нижний квартили (25 %; 75), Z-критерий, рассчитанный на основании U-критерия Манна—Уитни, и показатель достоверности (P). Z_1, P_1 — по сравнению с 7-ми сут; Z_2, P_2 — по сравнению с 14-ми сут. Клетки считали при увел. об. и ок. $40\times$ и $10\times$ соответственно.

Таким образом, у животных группы сравнения выявлены умеренные реактивные изменения в зоне оперативного вмешательства, наиболее выраженные на 7-е сут эксперимента, переходящие в подострую стадию на 14-е сут и полностью исчезающие к 21-м сут.

В ходе исследования морфологических препаратов группы отрицательного контроля выявлено, что через 7 сут после имплантации скаффолда с адсорбированным на нем чужеродным белком наблюдается выраженная воспалительная реакция (см. рисунок, *a*). В мягких тканях на границе с имплантатом сосуды микроциркуляторного русла полнокровны. Соединительная ткань на границе со скаффолдом отечна, инфильтрирована клетками лейкоцитарного ряда — нейтрофилами, макрофагами и лимфоцитами. В большинстве сосудов выявлены набухание эндотелиальных клеток и их очаговая десквамация. Также отмечаются набухание адвентиции сосудов и ее лейкоцитарная инфильтрация. В области имплантации обнаружены множественные мелкоочаговые кровоизлияния.

В структуре самой матрицы выявлены лейкоцитарная инфильтрация и отек, в отдельных участках — диapedез эритроцитов. В составе лейкоцитарной инфильтрации скаффолда преобладают нейтрофилы (табл. 1).

У животных группы отрицательного контроля к 14-м сут после имплантации скаффолда, не обладающего биосовместимостью, в перифокальной зоне отмечаются пролиферация клеток фибробластического ряда и формирование отграничивающего соединительнотканного барьера, который инфильтрирован лейкоцитами — нейтрофилами, моноцитами, макрофагами и лимфоцитами (см. рисунок, *b*). Так же как и на 7-е сут, отмечаются отек тканей в зоне имплантации скаффолда и выраженное полнокровие сосудов микроциркуляторного русла. Стенки сосудов микроциркуляторного русла утолщены, эндотелий частично десквамирован, отмечается активация адвентициальных клеток. В мягких тканях, окружающих скаффолд, и в нем самом определяются сидерофаги, а также свободнолежащие глыбки гемосидерина.

В структуре скаффолда выявляются единичные клетки соединительной ткани, на фоне выраженной лейкоцитарной инфильтрации, в составе которой преобладают нейтрофилы, также обнаруживаются моноциты, макрофаги и лимфоциты. При этом количество нейтрофильных лейкоцитов и лимфоцитов не претерпевает статистически значимых изменений, а количество макрофагов статистически значимо увеличивается по сравнению с 7-ми сут эк-

сперимента (табл. 1). В отдельных участках скаффолда выявлено формирование единичных тонкостенных сосудов.

У животных группы отрицательного контроля на 21-е сут вокруг имплантированного скаффолда наблюдается сформированный барьер грануляционной ткани, инфильтрированный клетками лейкоцитарного ряда, среди которых преобладают нейтрофилы, присутствуют макрофаги, моноциты и единичные плазматические клетки. В перифокальной зоне отмечается неравномерное кровенаполнение сосудов микроциркуляторного русла, а местами отмечаются мелкоочаговые кровоизлияния и диapedез эритроцитов.

На 21-е сут эксперимента скаффолд инфильтрирован клетками лейкоцитарного ряда, определяются моноциты и макрофаги, нейтрофилы, единичные плазматические клетки и лимфоциты (см. рисунок, в). При этом по сравнению с 14-ми сут эксперимента динамика состава лейкоцитарной инфильтрации проявляется только статистически значимым уменьшением числа лимфоцитов в поле зрения (табл. 1). В составе скаффолда кроме лейкоцитов выявляется небольшое количество фибробластов и фиброцитов, количество которых статистически значимо увеличивается по сравнению как с 7-ми, так и с 14-ми сут эксперимента (табл. 1). Васкуляризация скаффолда выражена слабо — в отдельных зонах наблюдаются единичные сосуды микроциркуляторного русла.

Таким образом, у животных группы отрицательного контроля в зоне имплантации скаффолда, не обладающего биосовместимостью, возникает активная воспалительная реакция. В отличие от группы сравнения, где максимально выраженные реактивные изменения сосудов микроциркуляторного русла были выявлены на 7-е сут эксперимента, у животных группы отрицательного контроля ярко выраженные нарушения кровотока в зоне имплантации были обнаружены на различных сроках наблюдения. К 14-м сут воспалительная реакция в зоне имплантации скаффолда, содержащего чужеродный белок, переходит в пролиферативную фазу, что приводит к формированию отграничивающего барьера. Клеточный состав скаффолда у животных данной группы на всех сроках исследования представлен преимущественно лейкоцитами. На фоне выраженной лейкоцитарной инфильтрации скаффолда заселение его клетками соединительной ткани происходит крайне слабо. При этом васкуляризация скаффолда также не выражена.

На 7-е сут после имплантации скаффолда на основе ПКЛ и ГА определяются признаки воспалительной реакции, которая значительно менее выражена в сравнении с отрицательным контролем в те же сроки эксперимента. Изменения микроциркуляторного русла у животных данной группы по степени выраженности сопоставимы с группой сравнения и проявляются полнокровием сосудов, умеренным отеком тканей, а также инфильтрацией перифокальной зоны единичными нейтрофилами на фоне преобладающих лимфоцитов (см. рисунок, з). В отдельных сосудах отмечаются утолщение стенок, очаги десквамации эндотелиоцитов, а также выраженная активация адвентициальных клеток. Выявляются единичные мелкоочаговые кровоизлияния.

В отличие от группы отрицательного контроля обнаружено активное заселение скаффолда клетками фибробластического ряда. Количество фибробластов и фиброцитов в поле зрения у животных данной группы статистически значимо выше по сравнению с отрицательным

контролем в тот же срок наблюдения (табл. 2). При этом отмечается неравномерность заселения скаффолда элементами соединительной ткани — скопление фибробластов и фиброцитов наиболее ярко выражено на границе матрицы с тканями. На фоне заселения скаффолда элементами соединительной ткани его инфильтрация лейкоцитами в отличие от группы отрицательного контроля выражена незначительно. Количество нейтрофилов и лимфоцитов в поле зрения у животных данной группы статистически значимо ниже по сравнению с отрицательным контролем в тот же срок наблюдения (табл. 2).

Через 14 сут после имплантации скаффолда на основе ПКЛ и ГА у животных определяются незначительно выраженные воспалительные изменения подкожной жировой клетчатки. Микроциркуляторные изменения в мягких тканях зоны имплантации в отличие от группы сравнения на 14-е сут эксперимента проявляются умеренно выраженным полнокровием сосудов. Однако при этом в отличие от группы отрицательного контроля на 14-е сут эксперимента полнокровие сосудов у животных данной группы гораздо менее выражено, как и отек мягких тканей, а лейкоцитарная инфильтрация представлена единичными нейтрофилами и лимфоцитами. В сосудах микроциркуляторного русла окружающей соединительной ткани выявляется активация адвентициальных клеток. Кроме того, в перифокальной зоне обнаруживаются единичные сидерофаги и свободно лежащие глыбки гемосидерина.

На 14-е сут эксперимента заселение скаффолда клетками фибробластического ряда различной степени дифференцировки на основе ПКЛ и ГА продолжается также активно, но в отличие от 7-х сут распределение клеток по структуре имплантата становится более равномерным (см. рисунок, д). Количество клеток фибробластического ряда в поле зрения статистически значимо увеличивается по сравнению с 7-ми сут эксперимента и значительно превышает число фибробластов и фиброцитов в случае отрицательного контроля на 14-е сут опыта (табл. 2). Кроме того, в отличие от группы отрицательного контроля на 14-е сут отмечается интенсивная васкуляризация матрицы. Большинство новообразованных сосудов микроциркуляторного русла в структуре скаффолда полнокровно. Лейкоцитарная инфильтрация скаффолда при этом не выражена, обнаруживаются единичные моноциты, макрофаги, нейтрофилы, лимфоциты и плазматические клетки (см. рисунок, д). Статистически значимых количественных изменений состава лейкоцитарной инфильтрации по сравнению с 7-ми сут эксперимента у животных данной группы не выявлено (табл. 2). При этом количество нейтрофильных лейкоцитов, моноцитов и макрофагов, а также лейкоцитов в структуре скаффолда у животных данной группы статистически значимо ниже, чем в случае отрицательного контроля на том же сроке наблюдения (табл. 2).

К 21-м сут эксперимента у животных в области имплантации скаффолда на основе ПКЛ и ГА воспалительные изменения не выражены. Так же как и у животных группы сравнения, в этот срок выявляется умеренное кровенаполнение сосудов микроциркуляторного русла. Через 21 сут после имплантации в подкожную клетчатку скаффолд на основе ПКЛ и ГА равномерно заселен фибробластами и фиброцитами (см. рисунок, е). По сравнению с 14-ми на 21-е сут эксперимента не происходит увеличения количества фибробластов в составе клеточной популяции матрицы, однако статистически значимо нара-

Т а б л и ц а 2

Динамика состава клеточной популяции скаффолда на основе ПКЛ и ГА у животных опытной группы

Клетки	Число клеток в поле зрения после имплантации через		
	7 сут	14 сут	21 сут
Фибробласты	48 (39; 54) $Z_0 = 3.74$; $P_0 = 0.000183$	64 (53; 66) $Z_0 = 3.74$; $P_0 = 0.000183$; $Z_1 = 2.68$; $P_1 = 0.007285$	61 (50; 72) $Z_0 = 3.74$; $P_0 = 0.000183$; $Z_1 = 2.98$; $P_1 = 0.002827$; $Z_2 = 0.98$; $P_2 = 0.325752$
Фibroциты	11 (9; 14) $Z_0 = 3.74$; $P_0 = 0.000183$	32 (27; 42) $Z_0 = 3.74$; $P_0 = 0.000183$; $Z_1 = 3.74$; $P_1 = 0.000183$	41 (38; 48) $Z_0 = 3.74$; $P_0 = 0.000183$; $Z_1 = 3.74$; $P_1 = 0.000183$; $Z_2 = 2.22$; $P_2 = 0.025749$
Нейтрофилы	6 (4; 8) $Z_0 = 3.74$; $P_0 = 0.000183$	6 (4; 7) $Z_0 = 3.74$; $P_0 = 0.000183$; $Z_1 = 0.11$; $P_1 = 0.909722$	5 (3; 7) $Z_0 = 3.74$; $P_0 = 0.000183$; $Z_1 = 0.71$; $P_1 = 0.472676$; $Z_2 = 0.60$; $P_2 = 0.545350$
Моноциты и макрофаги	7 (5; 12) $Z_0 = 1.77$; $P_0 = 0.075663$	11 (7; 13) $Z_0 = 3.74$; $P_0 = 0.000183$; $Z_1 = 1.36$; $P_1 = 0.173618$	10 (6; 12) $Z_0 = 3.74$; $P_0 = 0.000183$; $Z_1 = 0.71$; $P_1 = 0.472676$; $Z_2 = 0.56$; $P_2 = 0.570751$
Лимфоциты	12 (7; 13) $Z_0 = 3.74$; $P_0 = 0.000183$	11 (7; 15) $Z_0 = 3.47$; $P_0 = 0.000507$; $Z_1 = 0.11$; $P_1 = 0.909722$	6 (3; 8) $Z_0 = 2.07$; $P_0 = 0.037636$; $Z_1 = 2.53$; $P_1 = 0.011330$; $Z_2 = 2.38$; $P_2 = 0.017258$

Примечание. В каждом случае приведены медиана, верхний и нижний квартили (25 %; 75), Z-критерий, рассчитанный на основании U-критерия Манна—Уитни, и показатель достоверности (P). Z_0 , P_0 — по сравнению с показателями группы отрицательного контроля; Z_1 , P_1 — по сравнению с 7-ми сут; Z_2 , P_2 — по сравнению с 14-ми сут. Клетки считали при увел. об. и ок. $40\times$ и $10\times$ соответственно.

стает количество фиброцитов (табл. 2). В структуре скаффолда обнаруживаются единичные нейтрофилы, макрофаги и лимфоциты. При этом отмечается статистически значимое уменьшение количества лимфоцитов по сравнению с 14-ми сут эксперимента (табл. 2). К 21-м сут эксперимента скаффолд обильно васкуляризован. Отмечается умеренное кровенаполнение сосудов скаффолда. Кроме того, на 21-е сут эксперимента выявляется истончение волокон скаффолда, что свидетельствует о начавшейся биорезорбции матрицы.

Таким образом, при имплантации скаффолда на основе ПКЛ и ГА отмечается умеренно выраженная воспали-

тельная реакция окружающих тканей. Наибольшие изменения при этом отмечаются на 7-е сут после имплантации. Реактивные изменения в перифокальной зоне полностью купируются к 21-м сут после имплантации скаффолда на основе ПКЛ и ГА. Скаффолд на основе ПКЛ и ГА активно заселяется клетками соединительной ткани в период с 7-х по 21-е сут эксперимента. Вместе с тем отмечается интенсивная васкуляризация скаффолда с 14-х сут после имплантации. Инфильтрация скаффолда лейкоцитами выражена незначительно. На 21-е сут отмечаются первые признаки биодеградации имплантированной матрицы.

Обсуждение

Полученные данные свидетельствуют о том, что во всех трех экспериментальных группах крыс через 7 сут после оперативного вмешательства с имплантацией скаффолда или имитацией имплантации организм реагирует процессом воспаления, который протекает по-разному в каждой из групп. В группе отрицательного контроля интенсивная и продолжительная воспалительная реакция препятствует заселению скаффолда элементами соединительной ткани, приводя в конечном итоге к отграничению матрицы от окружающей его ткани. В противоположность этому в опытной группе и группе сравнения картина реактивных изменений схожа, особенно на фоне значительно превосходящего по интенсивности воспалительного процесса в группе отрицательного контроля. Это позволяет заключить, что при имплантации скаффолда на основе ПКЛ и ГА воспалительные изменения окружающих тканей в большей степени обусловлены их травматизацией при оперативном вмешательстве. Следует также отметить, что в настоящее время концепция биосовместимости не подразумевает полной инертности матриц (Santos et al., 2013). Было установлено, что отсутствие воспалительного ответа при имплантации матриц из полиуретана сопровождается слабовыраженной васкуляризацией скаффолдов (Laschke et al., 2009). Напротив, введение иммуномодулирующих компонентов на фоне умеренной стимуляции воспаления обеспечивает активацию процессов остео- и ангиогенеза (Santos et al., 2013). В этой связи, вероятно, выявленные в ходе исследования умеренно выраженные реактивные изменения тканей через 7 и 14 сут после имплантации скаффолда на основе ПКЛ и ГА следует рассматривать как фактор, стимулирующий дальнейшее заселение матрицы клетками и ее васкуляризацию. Заселение матрицы на основе ПКЛ и ГА клетками соединительной ткани и ее васкуляризация сопровождаются редукцией реактивных изменений окружающих скаффолд тканей к 21-м сут после имплантации, что позволяет сделать вывод о высокой степени биосовместимости данной матрицы.

Полученные данные согласуются с результатами других авторов, исследовавших биосовместимость матриц на основе ПКЛ. В частности, при подкожной имплантации поликапролактонового скаффолда мышам также было обнаружено заселение его соединительнотканью элементами на фоне умеренной инфильтрации лимфоцитами и макрофагами (Seyednejad et al., 2012). Это позволяет заключить, что параметры биосовместимости разработанного скаффолда на основе ПКЛ и ГА не уступают аналогичным матрицам из ПКЛ.

Таким образом, экспериментально установлено, что разработанный скаффолд на основе ПКЛ (95 %) и ГА (5 %) способен к интеграции в соединительную ткань в условиях *in vivo*. Результаты проведенных исследований доказывают биологическую совместимость оригинального скаффолда на основе ПКЛ и ГА.

Список литературы

Иванов А. Н., Норкин И. А., Пучиньян Д. М. 2014. Возможности и перспективы использования скаффолд-технологий для регенерации костной ткани. Цитология. 56 (8) : 543—548. (Ivanov A. N., Norkin I. A., Puchinyan D. M. 2014. The possibilities and perspectives of using scaffold technology for bone regeneration. Tsitologiya. 56 (8) : 543—548.)

Новочадов В. В. 2013. Проблема управления клеточным заселением и ремоделированием тканеинженерных матриц для восстановления суставного хряща. Вестн. Волгоград. гос. ун-та. 1 (5) : 19—28. (Novochadov V. V. 2013. Problema upravleniya kletochnym zaseleniem i remodelirovaniem tkanceinzhenernykh matrits dlya vosstanovleniya sustavnogo khryashcha. Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo universiteta. 1 (5) : 19—28.)

Стариков В. В., Рудченко С. О. 2010. Оптимизация свойств композита на основе гидроксиапатита и хитозана путем вариации его состава и режимов. Вісник Хмельницького національного університету. 915 : 35—39. (Starikov V. V., Rudchenko S. O. 2010. Optimizatsiya svoystv kompozita na osnove gidroksiapatita i khitozana putem variatsii ego sostava i rezhimov. Visnik Khmel'nits'kogo natsional'nogo universitetu. 915 : 35—39.)

Dholland A. A., Liekens K., Almqvist K. F., Verdonk R., Lambrecht S., Elewaut D., Verbruggen G., Verdonk P. C. 2012. 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. Arthroscopy. 28 : 225—233.

Dorj B., Won J. E., Kim J. H., Choi S. J., Shin U. S., Kim H. W. 2013. Robocasting nanocomposite scaffolds of poly(caprolactone)/hydroxyapatite incorporating modified carbon nanotubes for hard tissue reconstruction. J. Biomed. Mater. Res. A. 101 : 1670—1681.

Dvir T., Timko B. P., Kohane D. S., Langer R. 2011. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. Nat. Nanotechnol. 6 : 13—22.

Grayson W. L., Martens T. P., Eng G. M., Radisic M., Vunjak-Novakovic G. 2009. Biomimetic approach to tissue engineering. Semin. Cell Develop. Biol. 20 : 665—673.

Ko H. F., Sfeir C., Kumta P. N. 2010. Novel synthesis strategies for natural polymer and composite biomaterials as potential scaffolds for tissue engineering. Philos. Trans. Math. Phys. Eng. Sci. 368 : 1981—1997.

Laschke M. W., Strohe A., Scheuer C., Eglin D., Verrier S., Alini M., Pohlemann T., Menger M. D. 2009. *In vivo* biocompatibility and vascularization of biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue engineering. Acta Biomater. 5 : 1991—2001.

Lofti M., Ghasemi N., Rahimi S., Vosoughhosseini S., Saghri M. A., Shahidi A. 2013. Resilon: a comprehensive literature review. J. Dent. Res. Dent. Clin. Dent. Prospects. 7 : 119—130.

Martel-Estrada S. A., Olivas-Armendáriz I., Martínez-Pérez C. A., Hernández T., Acosta-Gómez E. I., Chacón-Nava J. G., Jiménez-Vega F., García-Casillas P. E. 2012. Chitosan/poly(DL, lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. J. Mater. Sci. Mater. Med. 23 : 2893—2901.

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., Goncalves R. M., Barbosa M. A. 2013. Adsorbed fibrinogen leads to improved bone regeneration and correlates with differences in the systemic immune response. Acta Biomater. 9 : 7209—7217.

Şaşmaz H., Gümüşdereliöğlü M., Gürpınar A., Onur M. A. 2008. Comparison of cellular proliferation on dense and porous PCL scaffolds. Bio-Medical Materials and Engineering. 18 : 119—128.

Schagemann J. C., Chung H. W., Mrosek E. H., Stone J. J., Fitzsimmons J. S., O'Driscoll S. W., Reinholz G. G. 2010. Poly-epsilon-caprolactone/gel hybrid scaffolds for cartilage tissue engineering. Biomed. Mater. Res. A. 93 : 454—463.

Serrano M. C., Pagani R., Vallet-Regi M., Peña J., Rámila A., Izquierdo I., Portolés M. T. 2004. *In vitro* biocompatibility assessment of poly(epsilon-caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. Biomaterials. 25 : 5603—5611.

Seyednejad H., Gawlitta D., Kuiper R. V., de Bruin A., van Nostrum C. F., Vermonden T., Dhert W. J., Hennink W. E. 2012. *In vivo* biocompatibility and biodegradation of 3D-printed porous scaffolds based on a hydroxyl-functionalized poly(?-caprolactone). Biomaterials. 33 : 4309—4318.

Shor L., Guceri S., Wen X., Gandhi M., Sun W. 2007. Fabrication of three-dimensional polycaprolactone/hydroxyapatite tissue

scaffolds and osteoblast-scaffold interactions *in vitro*. *Biomaterials*. 28 : 5291—5297.

Thadavirul N., Pavasant P., Supaphol P. 2014. Improvement of dual-leached polycaprolactone porous scaffolds by incorporating with hydroxyapatite for bone tissue regeneration. *Biomaterials Science, Polymer Edition*. 25 : 1986—2008.

Yamashita A., Liu S., Woltjen K., Thomas B., Meng G., Hotta A., Takahashi K., Ellis J., Yamanaka S., Rancourt D. E. 2013. Cartilage tissue engineering identifies abnormal human induced pluripotent stem cells. *Sci. Rep.* 3 : 1978. doi: 10.1038/srep01978.

Поступила 22 XII 2014

IN VIVO EVALUATION OF POLYCAPROLACTONE-HYDROXYAPATITE SCAFFOLD BIOCOMPATIBILITY

A. N. Ivanov,¹ M. N. Kozadaev, N. V. Bogomolova, O. V. Matveeva,
D. M. Puchinyan, I. A. Norkin, Yu. E. Sal'kovskii, G. P. Lyubun

Saratov Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopaedics;

¹ e-mail: lex558452@rambler.ru

Biocompatibility is one of the main and very important properties for scaffolds. The aim of the present study was to investigate cells population dynamics *in vivo* in the process of original polycaprolactone-hydroxyapatite scaffold colonization, as well as tissue reactions to the implantation to assess the biocompatibility of the matrix. It has been found that tissue reactive changes in white rats subside completely up to the 21st day after subcutaneous polycaprolactone-hydroxyapatite scaffold implantation. Matrix was actively colonized by connective tissue cells in the period from the 7th to the 21st day of the experiment. However, intensive scaffold vascularization started from the 14th day after implantation. These findings suggest a high degree of the polycaprolactone-hydroxyapatite scaffold biocompatibility.

Key words: scaffold, polycaprolactone, hydroxyapatite, biocompatibility.