

ID: 2019-05-25-A-18742

Краткое сообщение

Тяпкина Д.А.<sup>1</sup>, Кустодов С.В.<sup>1</sup>, Грабенко Е.П.<sup>1</sup>, Монастырло Ю.А.<sup>1</sup>, Куртукова М.О.<sup>1</sup>, Козадаев М.Н.<sup>2</sup>, Попрыга Д.В.<sup>2</sup>

## Оценка воспалительных реакций у белых крыс при субкутанной имплантации поликапролактоновых матриц, минерализованных ватеритом

1 ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России

2 ГУЗ Областная клиническая больница г. Саратова Минздрава России

### Резюме

Целью данного исследования являлась оценка биосовместимости матриц, изготовленных из поликапролактона и минерализованных ватеритом, путем изучения системных проявлений воспалительной реакции при субкутанных имплантационных тестах у белых крыс. Воспалительные реакции оценивались по концентрации фактора некроза опухоли альфа (ФНО) и интерлейкина-1-бета (ИЛ-1) в сыворотке крови с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Данные матрицы не вызывают развитие интенсивной воспалительной реакции, которая была отмечена в группе отрицательного контроля и сопровождалась системными проявлениями в виде статистически значимого увеличения концентрации в сыворотке крови ФНО и ИЛ-1. Таким образом, полученные в ходе исследования данные подтверждают биосовместимость ПКЛ/СаСО<sub>3</sub>-скаффолдов.

**Ключевые слова:** регенерация, скаффолды, ватерит, биосовместимость, поликапролактон

### Введение

Одним из важнейших направлений тканевой инженерии на сегодняшний день является создание трехмерных скаффолдов, применяемых для стимуляции процессов регенерации тканей. Матрицы - это трехмерные пористые структуры, которые выполняют функцию внеклеточного каркаса и которых происходит активная пролиферация клеточных структур [2].

В настоящее время для изготовления скаффолдов используются как синтетические, так и природные полимеры в комплексе – то есть создаются многокомпонентные матрицы [1]. Так, поликапролактон (ПКЛ) обладает высокой многофункциональностью и способен к биодegradации в условиях *in vivo* образованием продуктов, не оказывающих токсического воздействия на окружающие участки тканей и на весь организм в целом [4]. А ватерит (СаСО<sub>3</sub>) способен активировать размножение клеток костной ткани и при переходе в кальцит участвовать в адресной доставке веществ, высвобождая в области дефекта предварительно адсорбированные биологически активные молекулы [3,5].

Одним из основных требований, предъявляемых к скаффолдам, является биосовместимость. Субкутанные имплантационные тесты являются одним из важных и обязательных этапов оценки биосовместимости матрицы [6].

### Материал и методы

Эксперимент был выполнен на 40 белых нелинейных крысах-самцах массой 200-250 г., которые были разделены на четыре равные группы: контрольная группа, состоящая из 10 интактных крыс, группа сравнения – 10 ложнооперированных животных, которым выполнялось полное по объему оперативное вмешательство, но без имплантации матриц, группа отрицательного контроля, состоящая из 10 животных, которым имплантировались матрицы на основе ПКЛ с адсорбированным чужеродным белком, не обладающие биосовместимостью, опытная группа – 10 крыс, которым субкутанно имплантировались ПКЛ/СаСО<sub>3</sub>-скаффолды.

На 21-е сутки после имплантации матриц или её имитации у ложнооперированных животных под наркозом проводился забор крови путем пункции правых отделов сердца. Кровь забирали в объеме 5 мл. Концентрацию ФНО и ИЛ-1 определяли в сыворотке крови экспериментальных животных методом ИФА с использованием наборов реактивов IL-1 $\beta$  rat и TNF- $\alpha$  rat фирмы eBioscience (BenderMedSystems, Австрия) на микропланшетном спектрофотометре Anthos2020 (Biochrom, Великобритания).

После забора крови животные выводились из эксперимента путём передозировки препаратов наркоза.

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

### Результаты

В ходе исследования группы сравнения концентрации провоспалительных цитокинов в группе ложнооперированных животных на 21-е сутки эксперимента не имели статистически значимых отличий от уровня ФНО и ИЛ-1 у интактных крыс.

У животных группы отрицательного контроля на 21-е сутки эксперимента обнаружено статистически значимое повышение концентрации ФНО по сравнению с контролем – в 1,7 раз, а по сравнению с ложнооперированными крысами – в 2 раза. Также выявлено увеличение концентрации ИЛ-1 в 1,7 и 1,9 раза по сравнению с контролем и группой ложнооперированных животных соответственно.

Концентрации ФНО и ИЛ-1 в крови у животных опытной группы не отличаются от таковых у крыс групп сравнения и контроля. Концентрации ФНО и ИЛ-1 в сыворотке крови крыс на 21-е сутки после имплантации ПКЛ/СаСО<sub>3</sub>-скаффолдов в 2,1 и 1,7 раза меньше, чем у животных группы отрицательного контроля.

### Заключение

Локальные тканевые реакции ассоциированы с системными проявлениями воспалительного ответа, характеризующегося повышением концентрации провоспалительных цитокинов – ФНО и ИЛ-1. При имплантации ПКЛ/СаСО<sub>3</sub>-скаффолдов системных признаков воспаления не отмечается.

Таблица 1. Концентрация провоспалительных цитокинов в сыворотке крови экспериментальных животных

Показатели/Группы	ФНО, пг/мл	Ил-1, пг/мл
Контроль (n=8)	9,5 (5,6; 11,6)	16,1 (13,9; 16,6)
Группа сравнения (n=6)	7,2 (6,8; 8,4) $p_1=0,561276$	14,9 (14,2; 15,6) $p_1=0,401388$
Отрицательный контроль (n=8)	15,7 (12,4; 16,5) $p_1=0,002437$ $p_2=0,001790$	27,5 (23,6; 31,5) $p_1=0,000636$ $p_2=0,001790$
Опытная группа (n=8)	7,6 (3,5; 8,4) $p_1=0,332922$ $p_2=1,000000$ $p_3=0,003885$	16,6 (12,2; 18,1) $p_1=0,948533$ $p_2=0,630954$ $p_3=0,001790$

Примечание: в каждом случае приведены медиана, нижний и верхний квартили;  $p_1$ - по сравнению с животными группы контроля;  $p_2$ - по сравнению с ложнооперированными животными;  $p_3$ - по сравнению с животными группы отрицательного контроля

Совокупность данных исследований позволяют подтвердить высокую степень биосовместимости ПКЛ/СаСО<sub>3</sub>-скаффолдов и экспериментально обосновывать возможность их использования для тканевой инженерии.

#### Литература

1. Chesnutt B. M., Viano A. M., Yuan Y., Yang Y., Guda T., Appleford M. R., Ong J. L., Haggard W. O., Bumgardner J. D. 2009a. Design and characterization of a novel chitosan/nanocrystalline calcium phosphate composite scaffold for bone regeneration. *J. Biomed. Mater. Res.* 88 : 491–502.
2. Do AV, Khorsand B, Geary SM, et al. 3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications. *Adv. Healthcare Mater* 2015; 4: 1742–1762.
3. El-Fiqi A, Kim JH, Kim HW. Osteoinductive fibrous scaffolds of biopolymer/mesoporous bioactive glass nanocarriers with excellent bioactivity and long-term delivery of osteogenic drug. *ACS Appl Mater Interfaces* 2015;7(2): 1140-1152.
4. Mkhabela V, Ray SS. Biodegradation and bioresorption of poly (ε-caprolactone) nanocomposite scaffolds. *International Journal of Biological Macromolecules* 2015;79: 186–192.
5. Saveleva MS, Ivanov AN, Kurtukova MO, et al. Hybrid PCL/CaCO<sub>3</sub> scaffolds with capabilities of carrying biologically active molecules: synthesis, loading and in vivo applications. *Materials Science & Engineering C-Materials for biological applications* 2018; 85: 57–67.
6. Иванов А.Н., Козадаев М.Н., Пучиньян Д.М. и др. Изменения микроциркуляции при стимуляции регенерации тканей скаффолдом на основе поликапролактона. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция* 2015; 14(2(54)): 70-75.