

УДК 616-074:616-002:616-092.4:616-091.8

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ИНТЕНСИВНОСТИ СИСТЕМНОЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ В ОЦЕНКЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ СКАФФОЛДОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА И ВАТЕРИТА

Е.А. Галашина¹, Ю.А. Чибрикова², А.Н. Иванов¹, Е.В. Гладкова¹, И.А. Норкин¹

¹ НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Саратов

² ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Саратов

Резюме. В работе определяли динамику параметров системной воспалительной реакции в оценке биосовместимости скаффолдов на основе поликапролактона и ватерита. Выявлены повышение уровня СРБ на 7-е сутки и отсутствие изменений ФНО- α и ИЛ-1 β на 7-е и 21-е сутки, что свидетельствует о слабовыраженной непродолжительной воспалительной реакции и является патогенетической составляющей биосовместимости матриц.

Ключевые слова: скаффолды, поликапролактон, ватерит, системный воспалительный ответ.

Для цитирования: Галашина Е.А., Чибрикова Ю.А., Иванов А.Н., Гладкова Е.В., Норкин И.А. Биохимические параметры интенсивности системной воспалительной реакции в оценке биосовместимости скаффолдов на основе поликапролактона и ватерита // Вестник медицинского института «Реавиз». – 2020. – № 2. – С. 98–103.

BIOCHEMICAL PARAMETERS OF THE INTENSITY OF SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE IN THE ASSESSMENT OF BIOCOMPATIBILITY OF POLYCAPROLACTONE/VATERITE SCAFFOLDS

Е.А. Galashina¹, Yu.A. Chibrikova², A.N. Ivanov¹, E.V. Gladkova¹, I.A. Norkin¹

¹ Research Institute of Traumatology, Orthopedics, and Neurosurgery, Federal State Budgetary Institution of Higher Education 'V.I. Razumovsky Saratov State Medical University,' Ministry of Health of the Russian Federation, Saratov

² Federal State Budgetary Institution of Higher Education 'V.I. Razumovsky Saratov State Medical University,' Ministry of Health of the Russian Federation, Saratov

Abstract. In this study, we analyzed biocompatibility of polycaprolactone/vaterite scaffolds by assessing the dynamics of systemic inflammatory response. We detected an increase in the CRP level after 7 days and no changes in the level TNF- α and IL-1 β after 7 and 21 days, which indicates a weak and short-term inflammatory reaction and is a pathogenetic component of matrix biocompatibility.

Key words: scaffolds, polycaprolactone, vaterite, systemic inflammatory response.

For citation: Galashina E.A., Chibrikova Yu.A., Ivanov A.N., Gladkova E.V., Norkin I.A. Biochemical parameters of the intensity of systemic inflammatory response in the assessment of biocompatibility of polycaprolactone/vaterite scaffolds // Bulletin of Medical Institute Reaviz. – 2020. – № 2. – P. 98–103.

Введение

В настоящее время одним из важнейших направлений медицины, в частности, травматологии и ортопедии, является создание композитных материалов, представляющих собой трёхмерные пористые структуры, которые позволяют решить проблему замещения утраченных тканей, а

также моделировать биомеханические свойства имплантируемой конструкции, что является одним из ключевых моментов тканевой инженерии. Для стимуляции регенерации костной ткани перспективным представляется использование различных материалов с высокой степенью механической прочности, устойчивости, способно-

стью к управляемой биорезорбции [1, 2]. Одним из таких синтетических материалов является поликапролактон, который обладает хорошими адгезивными, пролиферативными свойствами и способен к медленной деградации в организме реципиента [3]. Кроме того, учитывая высокую степень минерализации межклеточного вещества для структурного восстановления участка поврежденной ткани включают ватерит, обладающий высокой способностью к пролиферации и дифференцировки остеобластов [4]. Важным условием, предъявляемым к скаффолдам, является их биологическая совместимость, то есть способность к заселению клетками и васкуляризации, отсутствие иммунологического отторжения. Сроки биodeградации матриц должны быть сопоставимы со сроками регенерации костной ткани, а продукты их биологического разложения не должны оказывать токсического воздействия на организм [5, 6]. Одним из патогенетических аспектов биологической совместимости матриц является интенсивность проявлений локальной воспалительной реакции, возникающей при субкутанных имплантационных тестах у крыс [7]. Представляется актуальным изучить уровни некоторых провоспалительных цитокинов, белка острой фазы в сыворотке крови при подкожной имплантации поликапролактоновых скаффолдов, минерализованных ватеритом для оценки выраженности системного воспалительного ответа.

Цель: выявить значимые изменения маркеров системного воспалительного ответа для оценки биологической совместимости скаффолдов на основе поликапролактона и ватерита.

Материалы и методы

Эксперимент был проведен на 40 белых нелинейных крысах массой 200–250 г, которые были разделены на 4 равнозначные группы по 10 особей в каждой. Группа сравнения – 10 ложнооперированных живот-

ных, которым проводилось хирургическое вмешательство в полном объеме, включающее в себя формирование «кармана» в подкожной клетчатке и наложение швов; группа отрицательного контроля – 10 животных, которым имплантировался скаффолд на основе поликапролактона с адсорбированным чужеродным белком с целью провокации воспалительной реакции, не обладающий биосовместимостью; опытная группа – 10 крыс, которым субкутанно имплантировался поликапролактон/ватерит-скаффолд; контрольная группа – 10 интактных крыс. Эксперимент проводился в соответствии с «Хельсинской декларацией по вопросам медицинской этики» (1964) и документом «Положение об использовании животных в биомедицинских исследованиях», принятым 41-й Генеральной Ассамблеей Всемирной медицинской ассоциации (1989). Всем животным перед выполнением манипуляций вводилась внутримышечно комбинация препаратов телазола («*Zoetis Manufacturing & Research Spain, S.L.*», Испания) в дозе 0,1 мл/кг и ксизалина («*Interchemie*», Нидерланды) в дозе 1 мг/кг.

Для осуществления эксперимента проводили разрез предварительно депилированной и обработанной антисептиком кожи межлопаточной области крыс. Далее скаффолд в форме диска диаметром 10 мм имплантировался в подкожно-жировую клетчатку, после чего в третьей и четвертой группах на рану накладывались швы. Животным второй группы проводилось полное по объёму хирургическое вмешательство, но без имплантации скаффолда. На 7-е и 21-е сутки после имитации имплантации матриц у ложнооперированных животных под наркозом проводился забор крови путём пункции правых отделов сердца. Забор крови осуществлялся в пробирки *Vacurette* в объёме 5 мл с активатором свёртывания и разделительным гелем. Для получения сыворотки крови производили центрифугирование при 3000 об/мин 600 секунд, после чего полученные образцы замораживали и хранили при температуре –20 °С. Выведение

животных из опыта осуществляли путём передозировки препаратов для наркоза.

Для оценки системного воспалительного ответа проводилось определение в сыворотке крови экспериментальных животных концентраций фактора некроза опухоли – альфа (ФНО- α), интерлейкина-1-бета (ИЛ-1 β) и С-реактивного белка (СРБ) методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов реактивов «IL-1 β rat», «TNF- α rat» и «Rat C-Reactive Protein ELISA» (eBioscience, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, США). ИФА выполнялся на микропланшетном спектрофотометре Anthos 2020 (Biochrom, Великобритания).

Статистическую обработку полученных данных осуществляли при помощи пакета программ Statistica 10.0. Большинство наших данных не соответствовало 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

Для оценки системных проявлений воспалительной реакции в организме белых крыс проводилось сопоставление концентраций провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1 β) и СРБ в сыворотке крови, забранной на 7-е и 21-е сутки эксперимента у животных групп сравнения, отрицательного контроля и опытной группы с аналогичными показателями интактной группы.

В результате проведённых исследований установлено, что у ложнооперированных животных на 7-е сутки исследования не отмечается статистически значимых изменений концентрации изученных провоспалительных цитокинов ($p > 0,05$) в сыворотке крови, однако, зафиксировано статистически достоверное повышение содержания СРБ в 1,19 раз ($p < 0,05$) в сыворотке крови

по сравнению с животными контрольной группы. К 21-м суткам исследования концентрации ФНО- α , ИЛ-1 β и СРБ в группе сравнения не имели статистически значимых отличий от уровня изучаемых параметров у интактных крыс ($p > 0,05$), однако, отмечено снижение уровня СРБ по сравнению с данными, полученными на 7-е сутки эксперимента ($p < 0,05$) (табл. 1).

У животных группы отрицательного контроля через 7 суток после имплантации скаффолдов, не обладающих биосовместимостью, по отношению к данным группы интактных животных концентрации ФНО- α , ИЛ-1 β статистически значимо повышались в 1,69 раз ($p < 0,05$) и в 1,79 раз ($p < 0,05$); по сравнению с данными группы ложнооперированных животных уровни ФНО- α и ИЛ-1 β статистически достоверно увеличились в 2,01 раз ($p < 0,05$) и в 1,91 раз ($p < 0,05$). Содержание СРБ повысилось в 1,66 раз ($p < 0,05$) как по сравнению со значениями, зарегистрированными у группы контроля, так и в 1,39 раз ($p < 0,05$) по отношению к данным группы сравнения. На 21-е сутки эксперимента по сравнению с контрольными значениями зафиксировано статистически достоверное повышение уровней ФНО- α , ИЛ-1 β в 1,65 раз ($p < 0,05$) и в 1,71 раз ($p < 0,05$); по отношению к группе сравнения концентрации ФНО- α и ИЛ-1 β статистически достоверно увеличились в 2,18 раз ($p < 0,05$) и 1,85 раз ($p < 0,05$), кроме того, по сравнению с данными, полученными на 7-е сутки эксперимента статистически достоверных изменений не обнаружено. Уровень СРБ по сравнению со значениями группы контроля статистически достоверно повысился в 1,26 раз ($p < 0,05$), по сравнению с данными группы ложнооперированных животных в 1,18 раз ($p < 0,05$), кроме того, зафиксировано снижение уровня СРБ в 1,32 раз ($p < 0,05$) по сравнению с данными, полученными на 7-е сутки эксперимента.

Таблица 1

**Концентрация маркеров системного воспалительного ответа
в сыворотке крови экспериментальных животных**

Группы	Показатели		
	ФНО, пг/мл	ИЛ-1, пг/мл	СРБ, мг/л
Контроль (n = 8)	9,5 (5,6; 11,6)	16,1 (13,9; 16,6)	101,37 (96,78; 114,51)
Группа сравнения 7-е сутки (n = 6)	7,97 (6,76; 9,19) p ₁ = 0,795150	15,1 (13,6; 19,6) p ₁ = 0,948362	120,37 (118,44; 126,81) p ₁ = 0,028460
Группа сравнения 21-е сутки (n = 6)	7,2 (6,8; 8,4) p ₁ = 0,561276 p ₂ = 0,810181	14,9 (14,2; 15,6) p ₁ = 0,401388 p ₂ = 0,688921	108,33 (106,48; 117,74) p ₁ = 0,641635 p ₂ = 0,008114
Отрицательный контроль 7-е сутки (n = 8)	16,05 (13,6; 17,67) p ₁ = 0,001591 p ₃ = 0,002415	28,8 (21,6; 34,5) p ₁ = 0,001337 p ₃ = 0,005458	168 (131,7; 203,4) p ₁ = 0,005075 p ₃ = 0,008114
Отрицательный контроль 21-е сутки (n = 9)	15,7 (12,4; 16,5) p ₁ = 0,002437 p ₂ = 0,312322 p ₃ = 0,001790	27,5 (23,6; 31,5) p ₁ = 0,000636 p ₂ = 0,847390 p ₃ = 0,001790	127,48 (125,9; 129,8) p ₁ = 0,003885 p ₂ = 0,029240 p ₃ = 0,001790
Опытная группа 7-е сутки (n = 8)	9,19 (4,3; 10) p ₁ = 0,487454 p ₃ = 0,943057 p ₄ = 0,001460	16,1 (13,6; 17,1) p ₁ = 0,847390 p ₃ = 0,943057 p ₄ = 0,001780	126,9 (108,3; 129,78) p ₁ = 0,041362 p ₃ = 0,769698 p ₄ = 0,008132
Опытная группа 21-е сутки (n = 7)	7,6 (3,5; 8,4) p ₁ = 0,332922 p ₂ = 0,617075 p ₃ = 1,000000 p ₄ = 0,003885	16,6 (12,2; 18,1) p ₁ = 0,948533 p ₂ = 0,775097 p ₃ = 0,630954 p ₄ = 0,001790	106,48 (102,3; 109,7) p ₁ = 0,830324 p ₂ = 0,093339 p ₃ = 0,617075 p ₄ = 0,001033

У белых крыс опытной группы на 7-е сутки не отмечено статистически достоверного повышения содержаний изученных цитокинов ($p > 0,05$) в сыворотке крови как по сравнению с контролем, так и по отношению с данными группы сравнения ($p > 0,05$), кроме того, по сравнению со значениями группы отрицательного контроля зафиксировано снижение данных показателей в 1,75 раз ($p < 0,05$) и в 1,79 раз ($p < 0,05$). В эти же сроки концентрация СРБ статистически достоверно увеличилась в 1,25 раз ($p < 0,05$) в сыворотке крови по сравнению с данными контрольной группы, снизилась в 1,33 раз ($p < 0,05$) по сравнению с данными группы отрицательного контроля, кроме того, отсутствуют статистически достоверные различия по отношению к значениям группы сравнения. На 21-е сутки после имплантации скаффолдов из поикапролактона и ватерита содержание ФНО- α , ИЛ-1 β и СРБ ($p < 0,05$) в сыворотке крови не

имеет отличий от такового у крыс групп сравнения и контроля ($p < 0,05$). Кроме того, нами обнаружено снижение уровней ФНО- α в 2,07 раз ($p < 0,05$), ИЛ-1 β в 1,66 раз ($p < 0,05$) и СРБ в 1,20 раз ($p < 0,05$) в сыворотке крови крыс по сравнению с данными группы отрицательного контроля (табл. 1).

Обсуждение

Полученные нами данные демонстрируют, что при имитации имплантации матрицы отсутствие изменений уровней провоспалительных цитокинов и слабо выраженные изменения содержания СРБ в сыворотке крови можно объяснить незначительными системными проявлениями реакций, происходящих в очаге воспаления, что связано с травматическими повреждениями при оперативном вмешательстве.

Проведённые нами исследования об изменении содержания провоспалительных цитокинов и СРБ в сыворотке крови белых

крыс при подкожной имплантации матриц, содержащих нативный овальбумин, совпадают с мнением исследователей о том, что стабильное увеличение концентрации СРБ в сыворотке крови связано с продукцией в ответ на чужеродный белок исследуемых провоспалительных цитокинов, которые являются основными стимуляторами синтеза данного маркера в печени. Выраженное повышение уровней провоспалительных цитокинов и белка острой фазы в сыворотке крови с 7-х по 21-е сутки наблюдения является подтверждающим фактом развития системной воспалительной реакции, оказывающей влияние на организм в целом [8].

При имплантации скаффолдов из поликапролактона и ватерита, зафиксированное нами отсутствие изменений уровней ФНО- α , ИЛ-1 β в сыворотке крови, повышение концентрации СРБ на 7-е сутки исследования, вероятно, может свидетельствовать о реакции окружающих мягких тканей в ответ на механическую травму при импланта-

ции скаффолда [9, 10]. У животных этой же группы снижение уровней изучаемых показателей в сыворотке крови на 21-е сутки по сравнению с группой отрицательного контроля в очередной раз подтверждает факт того, что имплантация данного вида композитного матрикса не вызывает возникновения интенсивной воспалительной реакции, а также участвует в структурном замещении дефекта и стимуляции остеогенеза.

Заключение

У белых крыс опытной группы отсутствие статистически значимых изменений уровней ФНО- α и ИЛ-1 β на 7-е и 21-е сутки исследования, незначительное повышение уровня СРБ на 7-е сутки в сыворотке крови свидетельствует о слабовыраженной непродолжительной воспалительной реакции, что является патогенетической составляющей биосовместимости скаффолдов на основе поликапролактона и ватерита.

Список литературы // References

- 1 Kotlyarova M.S. i dr. Biorezorbiruemye skaffoldy na osnove fibroina dlya regeneracii kostnoj tka-ni // Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya Biologiya. – 2017. – № 72 (4). – S. 222–228.
- 2 Dolgalev A.A., Arakelyan N.G. Tkaneyaya inzheneriya pri vosstanovlenii defektov kostnoj tkani // Vestnik molodogo uchyonogo. – 2018. – № 4. – S. 19–24.
- 3 Wang W., Huang B., Byun J.J. et al. Assessment of PCL/carbon material scaffolds for bone regeneration // Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials. – 2019. – No 93. – P. 52–60.
- 4 Schröder R., Besch L., Pohlit H. et al. Particles of vaterite, a metastable CaCO₃ polymorph, exhibit high biocompatibility for human osteoblasts and endothelial cells and may serve as a biomaterial for rapid bone regeneration // Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. – 2018. – No 12 (7). – P. 1754–68.
- 5 Novochadov V.V. Problema upravleniya kletochnym zaseleniem i remodelirovaniem tkaneinzhenernyh matric dlya vosstanovleniya sustavnogo hryashcha // Vestnik Volgograd. gos. un-ta. Ser. 11, Estestv. nauki. – 2013. – № 1 (5). – S. 19–28.
- 6 Vishwakarma A., Bhise N.S., Evangelista M.B. et al. Engineering immunomodulatory biomaterials to tune the inflammatory response // Trends in Biotechnology. – 2016. – № 34 (6). – P. 470–82.
- 7 Prudente A., Favaro W., Filho P. et al. Host Inflammatory Response to Polypropylene Implants: Insights From a Quantitative Immunohistochemical and Birefringence Analysis in a Rat Subcutaneous Model // International Brazilian Journal of Urology. – 2016. – No 42 (3). – P. 585–93.
- 8 Chereshev V.A., Gusev E.Yu. Immunologicheskie i patofiziologicheskie mekhanizmy sistemnogo vospale-niya // Medicinskaya immunologiya. – 2012. – № 14 (1-2). – S. 9–20.
- 9 Vasconcelos D.M., Gonçalves R.M., Almeida C.R. et al. Fibrinogen scaffolds with immunomodulatory properties promote in vivo bone regeneration // Biomaterials. – 2016. – No 111. – P. 163–178.
- 10 Haase T., Krost A., Sauter T. et al. In Vivo Biocompatibility Assessment of Poly (Ether Imide) Electrospun Scaffolds // Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. – 2017. – No 11(4). – P. 1034–44.

Авторская справка

Галашина Елена Анатольевна, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник отдела фундаментальных и клинко-экспериментальных исследований, НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Саратов, Россия, koniuchienko1983@mail.ru

Чибрикова Юлия Андреевна, врач-ординатор кафедры травматологии и ортопедии, ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Саратов, Россия, chibrikova_yulya@mail.ru

Иванов Алексей Николаевич, доктор медицинских наук, доцент, заведующий отделением лабораторной диагностики, главный научный сотрудник отдела фундаментальных и клинко-экспериментальных исследований, НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Саратов, Россия, lex558452@gmail.com

Гладкова Екатерина Вячеславовна, кандидат биологических наук, начальник отдела фундаментальных и клинко-экспериментальных исследований, НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Саратов, Россия, gladkova.katya@yandex.ru

Норкин Игорь Алексеевич, доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по развитию, НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Саратов, Россия, sarniito@yandex.ru

Рукопись получена: 25 марта 2020 г.

Принята к публикации: 7 апреля 2020 г.