

На правах рукописи

Козадаев Максим Николаевич

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ
ПРИ СУБКУТАННОЙ ИМПЛАНТАЦИИ СКАФФОЛДОВ НА ОСНОВЕ
ПОЛИКАПРОЛАКТОНА И ГИДРОКСИАПАТИТА

14.03.03 – патологическая физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой
степени кандидата медицинских наук

Москва – 2017

Работа выполнена в ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России

Научный руководитель:

Иванов Алексей Николаевич

доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела фундаментальных и клинико-экспериментальных исследований ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России.

Официальные оппоненты:

Новочадов Валерий Валерьевич

доктор медицинских наук, директор института естественных наук, профессор кафедры биоинженерии и биоинформатики ФГАОУ ВО «Волгоградский государственный университет»

Темнов Андрей Александрович

доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории редактирования генома ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России

Ведущая организация:

ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2017 года в часов на заседании диссертационного совета Д 212.203.06 при Российском университете дружбы народов по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке и на сайте ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (адрес: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6; сайт: <http://dissovet.rudn.ru>)

Автореферат разослан « ____ » _____ 2017 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 212.203.06

кандидат медицинских наук

В.А. Горячев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Замещение утраченных тканей и стимуляция репаративных процессов в них является одной из наиболее важных проблем современной медицины (Yamashita A. et al., 2013; Delcogliano M. et al., 2014). Особая актуальность разработок эффективной стимуляции регенеративных процессов в скелетных соединительных тканях обусловлена целым рядом факторов, включая, медико-социальную значимость заболеваний костно-мышечной системы, вклад которых в общее бремя болезней на уровне отдельного человека, систем здравоохранения и социального обеспечения признан доминирующим ВОЗ, ООН и Всемирным банком (Миронов С.П. и соавт., 2012; Иванов А.Н. и соавт., 2015). При этом травмы опорно-двигательного аппарата на сегодняшний день обуславливают до 25% от общего объема медицинских расходов (Chehade M., 2008). В современной травматологической практике пластика костных дефектов после переломов длинных костей требуется до 27% пациентов, а при лечении костных кист – в 20-25% случаев (Литвинов С.Д. и соавт., 2000; Ташпулатов А.Г. и соавт., 2010; Цяо Г. и соавт., 2014). Применяемые в настоящее время материалы и имплантаты могут приводить к осложнениям в 20-30% случаев (De Long W.G. Jr. et al., 2007), поэтому за последние годы заметно увеличились и сохраняют тенденцию к росту инвестиции в разработку и изготовление имплантатов для замещения костной ткани (Огородова Л.М., 2013).

Наиболее перспективные решения комплекса проблем, возникающих при восстановлении утраченных тканей, на сегодняшний день связаны с развитием технологий тканевой инженерии. Ключевым аспектом этого направления является создание биodeградируемых трехмерных матриц – скаффолдов, которые могут выступать в качестве субстрата для заселения клетками (Новочадов В.В., 2013; Robert H., 2011; Dhollander A. A. et al., 2012; Kon E. et al., 2012). Следует отметить, что к скаффолдам для стимуляции регенерации скелетных соединительных тканей предъявляется ряд особых требований, включая: длительный период биodeградации, что обусловлено сравнительно медленной регенерацией костных и хрящевых структур, а также связочного аппарата; особые прочностные характеристики, обеспечивающие поддержание опорно-механических функций костно-мышечной системы, а также хондро- и

остеоиндуктивные эффекты для стимуляции репаративного хондро- и остеогистогенеза (Dhollander A.A. et al., 2012; Vaquette C. et al., 2013).

Одним из основных свойств скаффолдов, наличие которых является обязательным вне зависимости от планируемой области их применения, является биосовместимость (Новочадов В.В. 2013; Dorj V. et al., 2013). В этой связи не только разработка, но и тщательная доклиническая апробация скаффолдов для стимуляции регенерации скелетных соединительных тканей имеет непосредственное практическое значение в развитии технологий регенеративной медицины.

Степень разработанности темы. В настоящее время разработка скаффолдов для стимуляции регенерации скелетных тканей и замещения их дефектов базируется на использовании синтетических полимеров, которые имеют ряд доказанных преимуществ по сравнению с естественными аналогами, в частности, отсутствие набухания при имплантации, более длительный период биodeградации и повышенная прочность, а также возможность модификации этих свойств (Woodruff M.A. et al., 2010; Lotfi M. et al., 2013). Одним из таких полимеров является поликапролактон (ПКЛ), который не обладает цитотоксическими свойствами, обеспечивает хорошую адгезию и пролиферацию клеток, в связи с чем был одобрен в странах Евросоюза и США для применения в медицинских целях (Видяшева И.В. и соавт., 2014; Иванов А.Н. и соавт., 2015; Schagemann et al., 2010; Lotfi et al., 2013).

Высокая минерализация костной ткани, не позволяет создавать скаффолды, соответствующие ее механическим характеристикам, используя только синтетические полимеры, что обуславливает целесообразность введения в состав таких матриц минеральных компонентов (Schantz J.T. et al., 2006; Schuckert K.H. et al., 2008; Low S.W. et al., 2009). Значительные перспективы для обеспечения как остеоиндуктивных, так и остеоиндуктивных свойств скаффолдов представляет включение в их состав гидроксиапатита (ГА), так как на сегодняшний день подтверждена его способность стимулировать дифференцировку остеобластов как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* (Mavis B. et al., 2009; Nandakumar A. et al., 2010; Seyedjafari E. et al., 2010; Polini A. et al., 2011; Vaquette C. et al., 2013). В этой связи лабораторией «Материалы специального назначения» Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского был разработан и изготовлен отечественный

оригинальный скаффолд на основе поликапролактона ПКЛ и ГА для стимуляции регенерации костной ткани. Апробация данного скаффолда в культуре дермальных фибробластов человека свидетельствует от высокой степени его биосовместимости (Видяшева И.В. и соавт., 2014). В соответствии со стандартом ISO (ГОСТ 10993-1-2011) дальнейшая доклиническая апробация подобных изделий включает проведение имплантационных тестов, в том числе субкутанных, с морфологическим контролем тканей зоны имплантации.

В тоже время следует отметить, что современные скаффолды представляют собой многокомпонентные системы, которые могут содержать элементы с различными параметрами биodeградации, а также неравномерно высвобождаемые биологически активные вещества, что требует оценки биосовместимости в динамике, реализация которой с помощью морфологических методов технически затруднена. Ряд исследований последних лет, свидетельствует, что в процессе биоинтеграции скаффолдов решающее значение принадлежит функциональным изменениям и структурному ремоделированию микроциркуляторного русла (Santos S.G. et al., 2013; Spiller K.L. et al., 2014; Crupi A. et al., 2015), которые, с одной стороны, обеспечивают трофику формирующейся ткани, а с другой – могут быть индикатором гистопатогенного влияния имплантированной тканеинженерной конструкции. В этой связи исследование изменений параметров микроциркуляции и патогенетическое обоснование их использования в качестве критериев динамической оценки биосовместимости открывает новые возможности модернизации и оптимизации доклинической апробации скаффолдов.

Цель исследования. Разработать микроциркуляторные критерии неинвазивной динамической оценки биосовместимости скаффолдов при субкутанной имплантации и патогенетически обосновать применение матриц из поликапролактона и гидроксиапатита для стимуляции процесса регенерации.

Задачи исследования:

1. Изучить изменения перфузии микроциркуляторного русла кожи, а также активности эндотелиального, нейрогенного и миогенного механизмов ее модуляции над областью субкутанной имплантации матриц с адсорбированным чужеродным белком и скаффолдов на основе ПКЛ и ГА для выявления критериев неинвазивной динамической оценки биосовместимости.

2. Верифицировать микроциркуляторные критерии биосовместимости путем выявления их взаимосвязи с интенсивностью заселения соединительнотканными элементами и выраженностью альтеративных и экссудативных процессов в зоне субкутанной имплантации скаффолдов на основе ПКЛ и ГА в сравнении с матрицами, содержащими чужеродный белок.

3. Исследовать изменения концентраций церулоплазмينا и С-реактивного белка в сыворотке крови и оценить их соответствие локальным микроциркуляторным реакциям при подкожной имплантации матриц с адсорбированным чужеродным белком и скаффолдов на основе ПКЛ и ГА у белых крыс.

4. Оценить влияние биосовместимости матриц на динамику концентрации эндотелиального фактора роста в сыворотке крови как основного стимулятора ангиогенеза во взаимосвязи с интенсивностью васкуляризации скаффолдов при подкожной имплантации у белых крыс.

Научная новизна. Впервые выявлены критерии биосовместимости матриц, основанные на патогенетических взаимосвязях изменений показателя перфузии и активных механизмов модуляции кровотока микроциркуляторного русла кожи над областью субкутанной имплантации скаффолдов с локальными тканевыми реакциями и системными проявлениями воспалительного ответа.

Отсутствие биосовместимости матриц проявляется стойким повышением перфузии, реализуемым преимущественно за счет снижения миогенного тонуса микрососудов кожи над областью имплантации, что сопровождается выраженной локальной лейкоцитарной инфильтрацией и отеками, а также формированием отграничивающего соединительнотканного барьера, препятствующим колонизации скаффолда клетками фибробластического ряда. При этом стойкое повышение перфузии и снижение миогенного тонуса сосудов кожи, также ассоциировано с системными проявлениями воспалительного ответа, которые характеризуются значительным и пролонгированным увеличением концентрации в крови церулоплазмينا и С-реактивного белка. Это патогенетически обосновывает выявление указанных изменений микроциркуляции кожи над областью субкутанной имплантации в качестве критерия отсутствия биосовместимости скаффолдов.

Установлено, что имплантация скаффолдов на основе ПКЛ и ГА сопровождается умеренным транзиторным повышением перфузии без

выраженных изменений активных механизмов модуляции локальной микроциркуляции кожи. Сочетание этих признаков с активной васкуляризацией, а также колонизацией матриц на основе ПКЛ и ГА клетками соединительной ткани без интенсивных локальных признаков воспаления и системных проявлений воспалительного ответа, обосновывают использование данных микроциркуляторных изменений в качестве критериев биосовместимости скаффолдов.

Научную новизну подтверждает выдача Федеральной службой по интеллектуальной собственности РФ патента на изобретение «Способ оценки биосовместимости скаффолдов» № 2571232 от 19.11.15 г.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты исследования расширяют представления о реакциях организма при имплантации скаффолдов на основе ПКЛ и ГА за счёт получения новых данных о патогенетических взаимосвязях биосовместимости матриц и процессов их колонизации клеточными элементами, васкуляризации с состоянием механизмов регуляции ангиогенеза.

При выполнении работы впервые проведена доклиническая апробация отечественных скаффолдов на основе ПКЛ и ГА в условиях *in vivo*. Выявленные микроциркуляторные критерии биосовместимости в комплексе со способностью к заселению клеточными элементами и васкуляризации на фоне отсутствия выраженных проявлений системного воспалительного ответа при субкутанной имплантации доказывают возможность применения оригинальных отечественных скаффолдов на основе ПКЛ и ГА для стимуляции процесса регенерации и позволяют рекомендовать клиническую апробацию данных матриц.

Выявленные микроциркуляторные критерии могут быть оценены в динамике при субкутанных имплантационных тестах с помощью неинвазивной методики – лазерной доплеровской флоуметрии. Данный подход реализован в виде программного обеспечения («Программа для динамической оценки биосовместимости скаффолдов», свидетельство о регистрации № 2015612745, приор. от 26.12.14 г., зарегистрирована в реестре 25.02.15 г.). Разработанные программа и способ оценки биосовместимости скаффолдов методом ЛДФ могут быть применены в экспериментальных исследованиях при создании новых конструкций для тканевой инженерии.

Методология и методы диссертационного исследования. Исследование биосовместимости оригинальных скаффолдов на основе ПКЛ и ГА было проведено на модели субкутанных имплантационных тестов у белых крыс. Дизайн исследования заключался в сопоставлении исследуемых параметров у животных опытной группы, с результатами групп сравнения (ложнооперированные животные) и отрицательного контроля (крысы, которым имплантировали скаффолд содержащий чужеродный белок). При выполнении работы использованы функциональное исследование микроциркуляции методом лазерной доплеровской флоуметрии, в комплексе с морфологической верификацией путем микроскопии и морфометрии гистологических препаратов зоны имплантации или ее имитации, а также биохимических исследований, реализованных методами иммуноферментного анализа и иммунотурбидиметрии.

Положения, выносимые на защиту:

1. Изменение перфузии и активных механизмов модуляции микроциркуляции кожи над областью размещения матриц, регистрируемые неинвазивным методом лазерной доплеровской флоуметрии взаимосвязаны с локальными и системными проявлениями воспалительной реакции, процессами заселения клетками соединительной ткани и васкуляризацией скаффолдов. Это является основанием для использования микроциркуляторных изменений в качестве критериев динамической оценки биосовместимости при субкутанных имплантационных тестах.

2. Васкуляризация скаффолдов и состояние механизмов регуляции ангиогенеза зависят от степени их биосовместимости. Отсутствие биосовместимости скаффолдов за счет интенсивной воспалительной реакции вызывает длительную активацию ангиогенеза, но не сопровождается их васкуляризацией. Имплантация скаффолдов на основе ПКЛ и ГА вызывает слабо выраженные воспалительные изменения, которые стимулируют ангиогенез и, в итоге, обеспечивают их полноценную васкуляризацию.

3. Комплекс микроциркуляторных критериев биосовместимости, способность к заселению клетками и васкуляризации на фоне отсутствия выраженных локальных и системных проявлений воспаления обосновывают возможность применения оригинального скаффолда на основе ПКЛ и ГА в тканевой инженерии для стимуляции регенерации поврежденных тканей.

Степень достоверности результатов исследования. Достоверность результатов исследования определяется достаточным объемом выборки экспериментальных животных (90 белых нелинейных крысы), применением современных информативных методик, выполненных с использованием сертифицированного оборудования и реактивов и включающих комплекс функциональных и биохимических методов в сочетании с морфологической верификацией процесса заселения клеточными элементами оригинальных отечественных скаффолдов. В работе использованы непараметрические методы статистической обработки в соответствии с характеристиками вариационных рядов изучаемых показателей.

Апробация результатов исследования. Основные положения работы доложены и обсуждены на: научно-практической конференции молодых учёных, посвящённой 75-летию профессора В.Г. Нинеля «Вклад молодых учёных в развитие травматологии, ортопедии и нейрохирургии» г. Саратов, 2014 г.; на X Международной конференции «Микроциркуляция и гемореология. Клиника и эксперимент: из лаборатории к постели больного» г. Ярославль, 2015 г.; на заседании регионального общества травматологов-ортопедов г. Саратов, 2015 г.; на Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 70-летию СарНИИТО «Травматология и ортопедия в России: традиции и инновации» г. Саратов, 2015 г.; на VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Цивьяновские чтения» г. Новосибирск, 2015 г.; на Всероссийской научно-практической конференции «Классика и инновации в травматологии и ортопедии» г. Саратов, 2016 г.; на заседании Ученого совета ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России, 2016.

Публикации результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, из них 5 в журналах, включенных в перечень периодических научных и научно-практических изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для публикации результатов диссертационного исследования на соискание ученой степени кандидата медицинских наук; получен 1 патента РФ на изобретение, а также свидетельство государственной регистрации программы для ЭВМ.

Внедрение результатов исследования. Полученные результаты используются в процессе преподавания на кафедре патологической физиологии

имени А.А. Богомольца и кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, курса патологической физиологии на кафедре медико-биологических дисциплин Филиала частного учреждения образовательной организации высшего образования «Медицинский университет «Реавиз» в городе Саратове, научно-исследовательском процессе в ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России.

Личный вклад автора. Автором лично проведен анализ современной отечественной и зарубежной литературы, на основании которого определено научное направление работы, сформулированы цель и задачи исследования, разработан план и методология исследования. Автором проведены эксперименты на животных, функциональное исследование микроциркуляции, забор материала для биохимических и гистоморфологических исследований, выполнение морфометрического анализа гистологических препаратов, обработка результатов исследования, их описание и подготовка публикаций по материалам работы.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 127 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методов, 3 глав результатов собственных исследований, заключения и выводов. Работа иллюстрирована 14 рисунками и 22 таблицами. Библиографический список содержит 201 литературный источник, из них 50 отечественных и 151 зарубежный.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная работа выполнена на 90 белых нелинейных крысах-самцах, массой 180-220 г. Все исследования проведены в соответствии с принципами биоэтики, регламентируемыми действующим законодательством РФ и международными конвенциями по защите лабораторных животных.

Животные были разделены на 3 группы по 10 особей в каждой: 1-я группа сравнения, включала ложнооперированных животных; 2-я группа отрицательный контроль включала экспериментальных животных, которым имплантировали скаффолд на основе ПКЛ с адсорбированным на нем чужеродным белком (скаффолд, заведомо не обладающий биосовместимостью). В 3-й основной группе животным выполняли подкожную имплантацию скаффолда на основе ПКЛ и ГА.

Всем животным за 5 минут 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 и ГА, разработанные и изготовленные в отделе электроформования Образовательно-научного института наноструктур и биосистем ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» Минобрнауки России. Состав скаффолда включал ПКЛ – 95% и ГА – 5%. Средний диаметр волокон скаффолдов – 150-200 нм, пористость – не менее 90%, поверхностная плотность ~2 г/кв.м.

Скаффолды в форме диска диаметром 15 мм, толщиной 0,1 мм имплантировали экспериментальным животным в подкожную клетчатку межлопаточной области по методике, изложенной в работе (Dorj et al., 2013).

Динамику изменения микроциркуляции исследовали методом (ЛДФ) с помощью анализатора «ЛАКК-ОП» (производство НПП «Лазма», Россия). Регистрация ЛДФ-грамм осуществлялась на 7-й, 14-й и 21-й день эксперимента. В качестве контроля использовали ЛДФ-граммы, зарегистрированные у животных до оперативного вмешательства (интактные животные). Световодный зонд фиксировали на коже над областью имплантации скаффолда. Проводилось определение показателя перфузии (М) в перфузионных единицах (пф. ед.). С помощью вейвлет-анализа оценивалось состояние активных механизмов модуляции кровотока по величине нормированных амплитуд эндотелиальных (0,01–0,076 Гц), нейрогенных (0,076–0,2 Гц) и миогенных (0,2–0,74 Гц) осцилляций микроциркуляции.

С целью оценки воспалительных изменений и динамики заселения матриц клетками соединительной ткани проводили исследование препаратов мягких тканей зоны имплантации скаффолда или же области имитации имплантации. Выведение животных из опыта осуществляли путем декапитации по 10 особей из каждой группы на 7, 14 и 21 сутки эксперимента. Срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином Майера и эозином (ООО «Биовитрум», Россия). Исследование микропрепаратов проводили при помощи микроскопа AxioImager Z2 (производство CarlZeiss, Германия). При оценке динамики состава клеточной популяции скаффолда проводили подсчет количества

фибробластов, фиброцитов, нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов и макрофагов в поле зрения при увеличении 400.

Определение концентрации эндотелиального фактора роста (VEGF) проводили в сыворотке крови на микропланшетном спектрофотометре «EpochBioTek Instruments» (США) методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием набора реактивов «VEGF Rat» фирмы RnD Systems (США).

Определение концентрации С-реактивного белка (СРБ) проводили в сыворотке крови иммунотурбидиметрическим тестом DiaSys Diagnostic Systems GmbH (Германия) с помощью анализатора Sapphire-350 (Ирландия).

Активность церулоплазмينا (ЦП) определялась по степени окисления раствора пара-фенилендиамина в сыворотке крови модифицированным методом Ревина и выражалась в условных единицах (Пишак В.П. и соавт., 1998).

Статистическую обработку полученных данных осуществляли при помощи пакета программ Statistica 10.0. Проверяли гипотезы о виде распределений (критерий Шапиро-Уилкса). Большинство наших данных не соответствуют закону нормального распределения, поэтому для сравнения значений использовался U-критерий Манна-Уитни, на основании которого рассчитывался Z – критерий Фишера и показатель достоверности p.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Местные и системные реакции организма в ответ на хирургическую травматизацию мягких тканей, имитирующую имплантацию скаффолда

Полученные данные свидетельствуют, что у животных группы сравнения (ложнооперированные животные) оперативное вмешательство вызывает умеренные транзиторные изменения локального кровотока, которые наиболее выражены на 7-е сутки, что проявляется увеличением перфузионного показателя в среднем на 27%, и полностью исчезают к 21-м суткам эксперимента. Изменения активных механизмов модуляции микроциркуляции проявляются увеличением абсолютных значений амплитуд нейрогенных и миогенных колебаний, которые полностью нормализуются на 14-е сутки эксперимента.

При морфологическом исследовании зоны имитации имплантации скаффолдов обнаружены локальные транзиторные сосудистые и тканевые

реакции, характерные для процесса асептического воспаления: отек подкожной жировой клетчатки, инфильтрация единичными лейкоцитами. Однако так же, как и сдвиги перфузии кожи над областью имплантации, локальные воспалительные изменения достигают максимального развития на 7-е сутки эксперимента и полностью исчезают к 21-м суткам.

Оперативное вмешательство в объеме имплантации скаффолда вызывает увеличение концентрации в сыворотке крови СРБ и ЦП на 7-е сутки после оперативного вмешательства. К 14-м суткам эксперимента содержание белков острой фазы в крови полностью нормализуются.

Таким образом, оперативное вмешательство в объеме, соответствующем имплантации скаффолда, вызывает умеренные локальные сосудистые и тканевые реакции, характеризующиеся повышением перфузии кожи, отеком и лейкоцитарной инфильтрацией подкожной жировой клетчатки, а также увеличением концентрации белков острой фазы воспаления в крови. Данные изменения, обусловленные травматизацией тканей, наиболее выражены на 7-е сутки и полностью нивелируются к 21-м суткам эксперимента.

Местные и системные реакции организма при субкутанной имплантации скаффолдов, не обладающих биосовместимостью

В результате проведенных исследований обнаружено, что на 7-е сутки эксперимента над областью имплантации скаффолда, содержащего чужеродный белок (группа отрицательного контроля), происходит значительное (на 80% контрольной величины) увеличение перфузионного показателя кожи (рис. 1). В отличие от группы сравнения у животных группы отрицательного контроля выраженная и стойкая гиперемия зарегистрирована в период с 7-х по 21-е сутки (рис. 1).



Рис. 1. Изменения показателя перфузии кожи в области имплантации скаффолдов у экспериментальных животных

Примечание. - различия статистически значимы по сравнению с контролем (p < 0,05)*

Повышение показателя перфузии в данной группе животных сопровождается увеличением амплитуд нейрогенных и миогенных осцилляций микроциркуляции кожи. При этом снижение нейрогенного тонуса сосудов вариабельно, а миогенного – регистрируются в период с 7-х по 21-е сутки эксперимента (рис. 2).

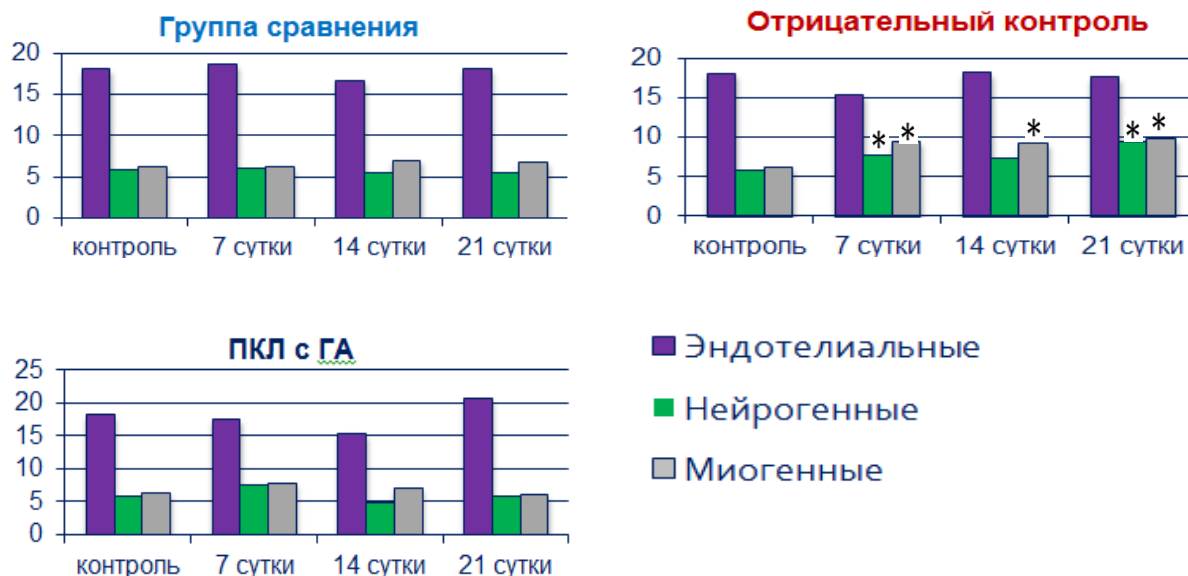


Рис. 2. Изменения активных механизмов модуляции микроциркуляции кожи в области имплантации скаффолдов у экспериментальных животных (амплитуда активных механизмов модуляции микроциркуляции, по вертикальной оси - условные единицы).

*Примечание:**-различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

Следовательно, стойкое повышение перфузии кожи над зоной имплантации скаффолда с адсорбированным чужеродным белком реализуется преимущественно за счет снижения миогенного тонуса микрососудов, что позволяет выделить увеличение перфузионного показателя и амплитуды миогенных колебаний в качестве критериев отсутствия биосовместимости.

В ходе морфологического исследования обнаружено, что через 7 суток после имплантации скаффолда с адсорбированным на нем чужеродным белком наблюдается выраженная воспалительная реакция, проявляющаяся полнокровием сосудов микроциркуляции, отеком и лейкоцитарной инфильтрацией тканей на границе с имплантатом. В период с 14-х по 21-е сутки воспаление переходит в пролиферативную фазу, что сопровождается формированием вокруг имплантированного скаффолда соединительнотканного барьера с неравномерно кровенаполненными сосудами, инфильтрированного

клетками лейкоцитарного ряда, среди которых присутствуют макрофаги, моноциты, лимфоциты и плазматические клетки. Клеточный состав скаффолда у животных данной группы на всех сроках наблюдения представлен преимущественно лейкоцитами: нейтрофилами, лимфоцитами и макрофагами (рис. 3). На фоне выраженной лейкоцитарной инфильтрации скаффолда заселение его клетками соединительной ткани происходит крайне слабо.

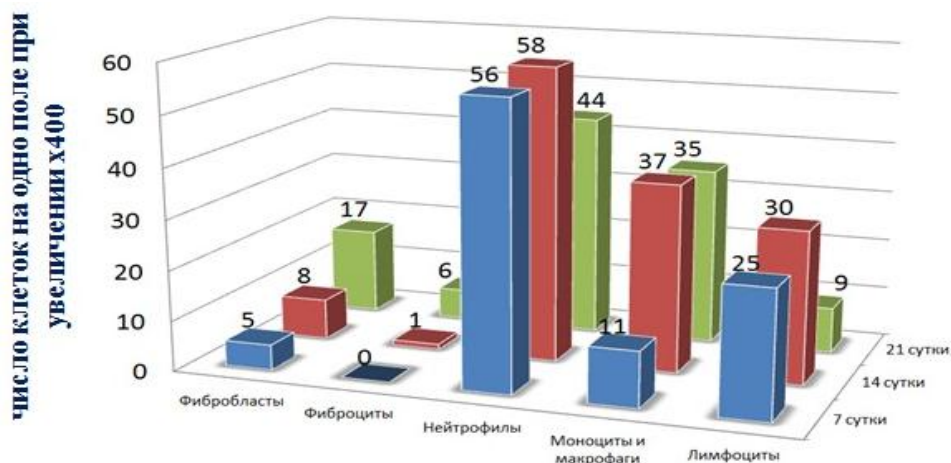


Рис. 3. Динамика клеточных популяций скаффолдов, не обладающих биосовместимостью

Васкуляризация скаффолда также не выражена. Следовательно, при подкожной имплантации белым крысам матриц, содержащих чужеродный белок, стойкое повышение перфузии и снижение миогенного тонуса микрососудов кожи соответствуют интенсивной локальной воспалительной реакции с преобладанием альтерации и экссудации, которые проявляются выраженной лейкоцитарной инфильтрацией и отеками, а пролиферативные процессы характеризуются формированием отграничивающего соединительнотканного барьера, препятствующим колонизации скаффолда клетками соединительной ткани, что подтверждает отсутствие биосовместимости.

При имплантации скаффолдов, не обладающих биосовместимостью, обнаружено выраженное увеличение СРБ и ЦП на 7-е сутки эксперимента. В период с 14-х по 21-е сутки происходит снижение концентрации ЦП и СРБ, однако данные показатели не достигают контрольных значений (табл. 1).

Следовательно, отсутствие биосовместимости скаффолда характеризуется выраженным системным воспалительным ответом с увеличением концентрации в крови белков острой фазы на протяжении всего

эксперимента, что совпадает с динамикой миогенного тонуса сосудов микроциркуляторного русла кожи в области имплантации, интенсивностью локальной лейкоцитарной инфильтрации и сопровождается крайне медленно протекающим заселением матрицы клеточными элементами.

Таблица 1

Уровень белков острой фазы воспаления в крови у животных группы отрицательного контроля

Группа		Уровень белков острой фазы крови	
		ЦП, усл. ед.	СРБ, мг/л
Контроль (n=10)		16,5 (15,8; 18,1)	37,1 (37,0; 38,2)
После оперативного вмешательства	7 сутки (n=10)	25,9 (24,8; 28,0) p ₁ = 0,001745.	64,3 (62,8; 65,3) p ₁ = 0,002628
	14 сутки (n=10)	26,4 (23,2; 28,0) p ₁ = 0,001745 p ₂ = 0,948948	46,7 (46,1; 47,3) p ₁ = 0,001685 p ₂ = 0,002664
	21 сутки (n=10)	23,1 (22,1; 25,8) p ₁ = 0,001745 p ₂ = 0,034607 p ₃ = 0,047158	44,0 (42,7; 45,0) p ₁ = 0,001685 p ₂ = 0,002664 p ₃ = 0,001705

Примечания: в каждом случае приведены медиана, верхний и нижний квартили;
p₁, p₂, p₃ – по сравнению с контролем 7 и 14 сутками после операции соответственно.

При имплантации скаффолдов, не обладающих биосовместимостью, у животных выявлено увеличение концентрации VEGF в сыворотке крови во все сроки наблюдения. При этом концентрация VEGF достигает своего пика только к 21-м суткам после имплантации, превышая контрольные значения в 4 раза. Следовательно, интенсивная воспалительная реакция при имплантации скаффолда, не обладающего биосовместимостью, сопровождается выраженной стимуляцией ангиогенеза, но не приводит к их васкуляризации.

Таким образом, при субкутанных имплантационных тестах установлено, что микроциркуляторные критерии отсутствия биосовместимости скаффолдов – стойкое повышение перфузии кожи над зоной имплантации и снижение миогенного тонуса микрососудов, соответствуют интенсивным локальным и системным проявлениям воспаления, а также продолжительной стимуляции ангиогенеза, но торможению васкуляризации матрицы и заселения ее клеточными элементами.

Местные и системные реакции организма при подкожной имплантации скаффолдов на основе поликапролактона и гидроксиапатита

Полученные данные свидетельствуют, что при имплантации животным скаффолда на основе ПКЛ и ГА наиболее выраженные изменения перфузии кожи над областью размещения матриц так же, как и в группе сравнения, отмечаются на 7-е сутки эксперимента. Изменения перфузионного показателя не превышают таковые у ложнооперированных животных и полностью нивелируются к 21-м суткам (рис. 1). При имплантации оригинальных скаффолдов на основе ПКЛ и ГА изменения активных механизмов (нейрогенного и миогенного тонуса) модуляции микроциркуляции носят транзиторный характер, полностью исчезая к 14-м суткам эксперимента (рис. 2). Следовательно, умеренное транзиторное повышение перфузии кожи над областью размещения скаффолда на основе ПКЛ и ГА без выраженных изменений активных механизмов модуляции локальной микроциркуляции характеризует биосовместимость матриц данного типа.

При морфологическом исследовании наибольшие реактивные изменения тканей, окружающих скаффолд, выявлены на 7-е сутки и проявляются умеренным полнокровием сосудов и отеком, а также инфильтрацией перифокальной зоны единичными нейтрофилами и лимфоцитами. Реактивные изменения мягких тканей зоны имплантации скаффолда на основе ПКЛ и ГА полностью купируются к 21-м суткам эксперимента.

Заселение скаффолда на основе ПКЛ и ГА клетками соединительной ткани протекает активно на 7-е, 14-е и 21-е сутки эксперимента. Обнаружена интенсивная васкуляризация скаффолда с 14-х суток после имплантации. Инфильтрация скаффолда лейкоцитами при этом выражена слабо (рис 4). Следовательно, транзиторные изменения перфузии кожи при субкутанных имплантационных тестах у белых крыс сочетаются с активным заселением скаффолдов на основе ПКЛ и ГА соединительнотканными элементами, его васкуляризацией на фоне слабовыраженных реактивных изменений окружающих тканей, что доказывает биологическую совместимость данного типа матриц.

Имплантация скаффолдов на основе ПКЛ и ГА вызывает у животных увеличение в сыворотке крови концентрации СРБ и ЦП на 7-е сутки эксперимента (табл. 2).

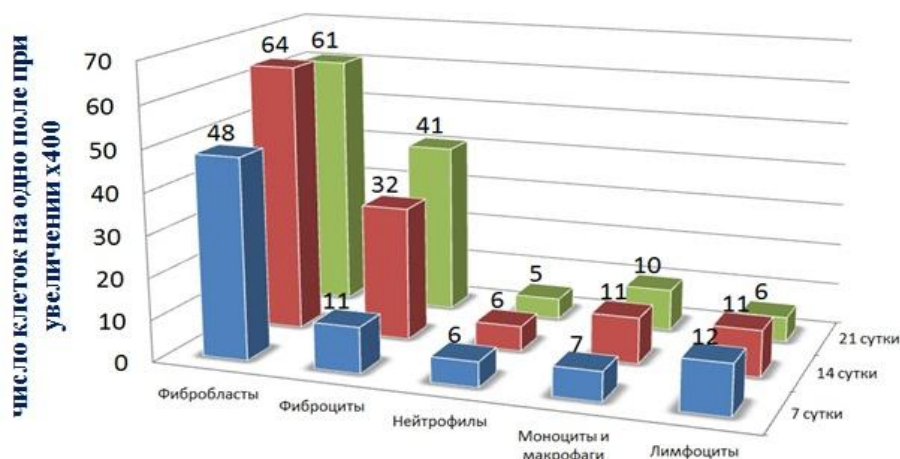


Рис. 4. Динамика клеточных популяций скаффолдов на основе поликапролактона и гидроксиапатита

Таблица 2

Уровень белков острой фазы воспаления в крови у животных при имплантации скаффолда на основе поликапролактона и гидроксиапатита

Группа		Уровень белков острой фазы крови	
		ЦП, усл.ед.	СРБ, мг/л
Контроль (n=10)		16,5 (15,8; 18,1)	37,1 (37,0; 38,2)
После оперативного вмешательства	7 сутки (n=10)	21,3 (20,1; 22,1) $p_1 = 0,001745$	43,0 (41,1; 44,1) $p_1 = 0,005790$
	14 сутки (n=10)	19,1 (17,3; 20,8) $p_1 = 0,063920$ $p_2 = 0,025348$	38,2 (36,5; 42,7) $p_1 = 0,564012$ $p_2 = 0,025901$
	21 сутки (n=10)	17,5 (16,6; 19,2) $p_1 = 0,200842$ $p_2 = 0,001745$ $p_3 = 0,306154$	37,8 (37,6; 38,4) $p_1 = 0,109441$ $p_2 = 0,001705$ $p_3 = 0,001725$

Примечания: в каждом случае приведены медиана, верхний и нижний квартили (25%;75); p_1, p_2, p_3 – по сравнению с контролем, 7-ми и 14-ми сутками соответственно.

Однако концентрация СРБ и ЦП у животных данной группы на 7-е сутки эксперимента не имеет различий с показателями группы сравнения и статистически значимо ниже уровня группы отрицательного контроля. В период с 7-х по 21-е сутки концентрация СРБ и ЦП в сыворотке крови у животных опытной группы снижается, и в отличие от группы отрицательного контроля, достигает контрольных значений на 14-е сутки эксперимента (табл. 2). Следовательно, транзиторные микроциркуляторные изменения при имплантации скаффолдов на основе ПКЛ и ГА соответствуют кратковременным сдвигам концентрации белков острой фазы в первую неделю

эксперимента, степень выраженности которых не превышает таковые у ложнооперированных животных, что свидетельствует в пользу их травматического генеза.

В ходе исследования установлено, что при имплантации скаффолда на основе ПКЛ и ГА пиковое увеличение уровня VEGF в сыворотке крови происходит на 14-е сутки эксперимента. К 21-м суткам его концентрация достигает контрольных значений (рис. 5). При этом морфологически обнаружено, что к 21-м суткам после имплантации скаффолд васкуляризован и заселен клетками соединительной ткани. Следовательно, в этом случае транзиторные воспалительные изменения стимулируют васкуляризацию, а к 21-м суткам эксперимента происходит завершение процессов ангиогенеза и стабилизация сосудистого русла.

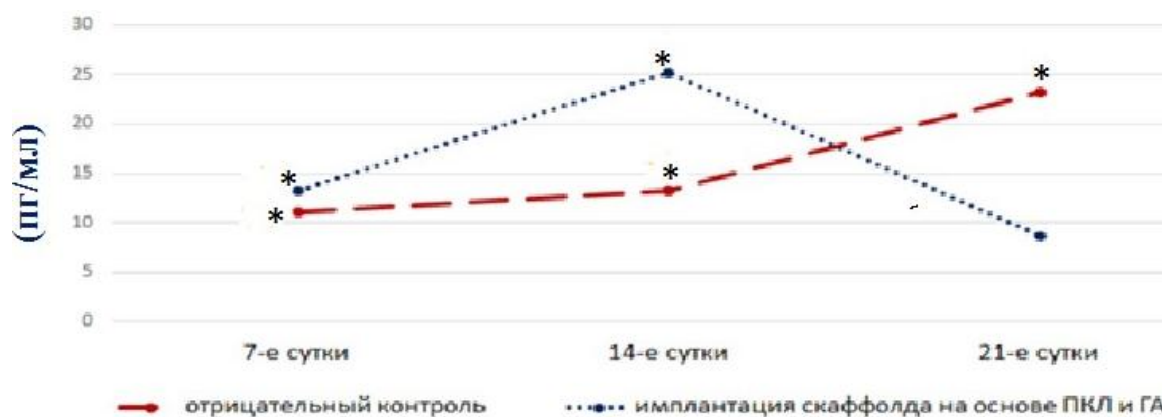


Рис. 5. Концентрация эндотелиального фактора роста в сыворотке крови животных опытной группы и отрицательного контроля

Примечание * - различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

Таким образом, разработанные комбинированные скаффолды на основе ПКЛ и ГА способны к интеграции в соединительную ткань в условиях *in vivo*. Активное заселение исследуемых скаффолдов соединительнотканскими элементами и васкуляризация на фоне незначительных реактивных изменений при подкожной имплантации доказывают их биосовместимость. Транзиторное повышение перфузии без выраженных сдвигов активных механизмов модуляции локальной микроциркуляции кожи над областью имплантации взаимосвязаны с кратковременными слабовыраженными локальными и системными проявлениями воспалительной реакции, которые оказывают стимулирующее влияние на ангиогенез, васкуляризацию и заселение скаффолдов на основе ПКЛ и ГА клетками, что позволяет характеризовать

указанные микроциркуляторные изменения как критерии биосовместимости при субкутаных имплантационных тестах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные в ходе настоящего диссертационного исследования, позволяют подвести *следующие итоги*:

1. Критериями отсутствия биосовместимости скаффолдов при субкутаных имплантационных тестах являются стойкое повышение перфузии кожи над зоной их размещения, реализуемое преимущественно за счет снижения миогенного тонуса микрососудов. Имплантация скаффолда на основе ПКЛ и ГА сопровождается умеренным транзиторным повышением перфузии кожи над областью его размещения без выраженных изменений активных механизмов модуляции микроциркуляции, что характеризует биосовместимость матриц данного типа.

2. Микроциркуляторные критерии отсутствия биосовместимости соответствуют интенсивной лейкоцитарной инфильтрации, отекам и формированию соединительнотканного барьера, препятствующего колонизации скаффолда клетками соединительной ткани. Транзиторные изменения перфузии кожи при субкутаных имплантационных тестах у белых крыс ассоциированы с активным заселением клетками фибробластического ряда скаффолдов на основе ПКЛ и ГА на фоне слабо выраженных воспалительных изменений, что доказывает биологическую совместимость данного типа матриц.

3. Локальные микроциркуляторные реакции при подкожной имплантации матриц, не обладающих биосовместимостью, сопровождаются увеличением концентрации ЦП и СРБ в сыворотке крови на протяжении всего эксперимента. Транзиторные микроциркуляторные изменения при имплантации скаффолдов на основе ПКЛ и ГА соответствуют кратковременным сдвигам травматического генеза концентрации белков острой фазы в первую неделю эксперимента.

4. Интенсивная воспалительная реакция при субкутаной имплантации матриц, не обладающих биосовместимостью, вызывает у белых крыс выраженное увеличение концентрации VEGF на протяжении всего эксперимента, но не приводит к васкуляризации скаффолда. При имплантации скаффолдов на основе ПКЛ и ГА транзиторные воспалительные изменения

индуцируют повышение уровня VEGF в крови в течение двух недель, что стимулирует васкуляризацию матриц, а к 21-м суткам эксперимента концентрация данного фактора нормализуется, свидетельствуя о стабилизации микрососудистого русла.

Практические рекомендации:

1. Выявленные взаимосвязи показателей микроциркуляции кожи над областью имплантации с локальными и системными проявлениями воспалительной реакции, процессами васкуляризации и заселения скаффолдов клетками позволяет рекомендовать использование микроциркуляторных критериев, которые могут быть выявлены неинвазивным методом лазерной доплеровской флоуметрии, для динамической оценки биосовместимости скаффолдов при субкутанных имплантационных тестах.

2. Разработанная «Программа для динамической оценки биосовместимости скаффолдов» (свидетельство о регистрации № 2015612745 от 25.02.2015 г.), осуществляющая анализ микроциркуляторных критериев отсутствия и наличия биосовместимости скаффолдов рекомендуется для применения в экспериментальных исследованиях при разработке новых тканеинженерных конструкций.

3. В условиях эксперимента на животных доказана биосовместимость отечественных скаффолдов на основе ПКЛ и ГА, что позволяет рекомендовать их к клинической апробации для стимуляции процесса регенерации.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Полученные при выполнении данной работы результаты, доказывают биосовместимость скаффолдов на основе ПКЛ и ГА, что определяет перспективы их использования для стимуляции регенерации скелетных соединительных тканей, поэтому прикладной аспект разработки данной темы связан с клинической апробацией матриц данного типа. Вместе с тем выявленное в работе неоднозначное влияние интенсивности локальных и системных проявлений воспаления на колонизацию скаффолдов клетками, механизмы регуляции ангиогенеза и васкуляризации матриц обуславливают необходимость дальнейшего исследования процессов формирования и стабилизации сосудистого русла в тканеинженерных конструкциях, что определяет перспективы теоретико-экспериментальной разработки данной темы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Козадаев М.Н. Оценка заселения клеточными элементами скаффолда на основе поликапролактона в экспериментальной работе // Теоретические и прикладные вопросы науки и образования: материалы Междунар. науч.-практ. конф. – Тамбов, 2015. – С. 59-60.
2. **Исследование динамики заселения клеточными элементами и биосовместимости скаффолда на основе поликапролактона в условиях *in vivo* / А.Н. Иванов, М.Н. Козадаев, Н.В. Богомолова, О.В. Матвеева, Д.М. Пучиньян, И.А. Норкин // *Фундаментальные исследования*. – 2015. - № 1. – Ч. 2. - С. 275-278.**
3. **Изменения микроциркуляции при стимуляции регенерации тканей скаффолдом на основе поликапролактона. / А.Н. Иванов, М.Н. Козадаев, Д.М. Пучиньян, Ю.Е. Сальковский, И.А. Норкин // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. – 2015. – Т. 14, № 2 (54). – С.70-75.**
4. Козадаев М.Н. Лазерная доплеровская флоуметрия в определении биосовместимости трехмерных матриц // Травматология и ортопедия в России: традиции и инновации: материалы Всерос. науч.-практ. конф., посв. 70-летию СарНИИТО. – Саратов, 2015. – С. 154-157.
5. **Исследование биосовместимости матриц на основе поликапролактона и гидроксиапатита в условиях *in vivo* / А.Н. Иванов, М.Н. Козадаев, Н.В. Богомолова, О.В. Матвеева, Д.М. Пучиньян, И.А. Норкин, Ю.Е. Сальковский, Г.П. Любунь // *Цитология*. – 2015. - Т. 57, № 4. - С. 286-293.**
6. Иванов А.Н., Козадаев М.Н. Лазерная доплеровская флоуметрия в оценке биосовместимости скаффолдов // Микроциркуляция и гемореология (Клиника и эксперимент: из лаборатории к постели больного): материалы междунар. науч.-практ. конф. – Ярославль, 2015. – С. 106.
7. **Сравнительный анализ микроциркуляторных изменений и динамики клеточных популяций скаффолдов на основе поликапролактона и поликапролактона с гидроксиапатитом при субкутанной имплантации / М.Н. Козадаев, А.Н. Иванов, Д.М. Пучиньян, И.А. Норкин // *Современные проблемы науки и образования*. - 2015. - № 5. - URL: www.science-education.ru/128-21447 (дата обращения: 10.09.2015).**
8. ***Biocompatibility of polycaprolactone and hydroxyapatite matrices in vivo* / A.N. Ivanov, M.N. Kozadaev, N.V. Bogomolova, O. V. Matveeva, M.D. Puchin'yan, I.A. Norkin, Y.E. Salkovsky, G.P. Lyubun // *Cell and Tissue Biology*. – 2015. - V. 9, № 5. – P. 422-429.**
9. Козадаев М.Н. Оценка биосовместимости скаффолдов методом лазерной доплеровской флоуметрии // Цивьяновские чтения: материалы VIII Всерос. науч.-практ. конф. молодых ученых с междунар. участ. – Новосибирск, 2015. – Т.1. – С. 252-258.

10. Динамика концентрации маркеров острой фазы воспаления в сыворотке крови у белых крыс при имплантации матриц на основе поликапролактона и гидроксиапатита / М.Н. Козадаев, С.В. Белова, В.В. Блинникова и др. // Сборник трудов по материалам Всероссийской научно-практической конференции, посвящённой 75-летию профессора А.П. Барабаша, «Классика и инновации в травматологии и ортопедии». – Саратов, 2016. – С. 199-201.

11. Экспериментальное обоснование биосовместимости оригинальных отечественных матриц на основе поликапролактона в условиях *in vivo* / М.Н. Козадаев, М.А. Гаврилов, О.Л. Емкужев и др. // Сборник трудов по материалам Всероссийской научно-практической конференции, посвящённой 75-летию профессора А.П. Барабаша, «Классика и инновации в травматологии и ортопедии». – Саратов, 2016. – С. 202-204.

12. Сравнительный анализ перфузии и динамики маркеров острой фазы воспалительной реакции при имплантации матриц на основе поликапролактона и гидроксиапатита / А.Н. Иванов, М.Н. Козадаев, С.В. Белова и др. // Современные проблемы науки и образования. - 2016. - № 4. - URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24821> (дата обращения: 12.09.2016).

Объекты интеллектуальной собственности

1. Пат. 2571232 Российской Федер. МПК А 61В 8/06 Способ оценки биосовместимости скаффолдов / А.Н. Иванов, М.Н. Козадаев, Д.М. Пучиньян; заявитель и патентообладатель ФГБУ "СарНИИТО" Минздрава России - заявл. № 2014150685/14; 16.12.14; опубл. 20.12.15. – Бюл. № 35.

2. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2015612745 РФ. Программа для динамической оценки биосовместимости скаффолдов / М.Н. Козадаев, Е.П. Моисеев, А.Н. Иванов; заявитель и патентообладатель ФГБУ "СарНИИТО" Минздрава России - заявл. № 2014663989; 26.12.2014; дата регистрации 25.02.2015, опубл. 20.03.2015. – Бюл. №3.

Список сокращений

ГА	–	гидроксиапатит
Г-Э	–	гематоксилин - эозин
ЛДФ	–	лазерная доплеровская флоуметрия
ПКЛ	–	поликапролактон
СРБ	–	С-реактивный белок
ЦП	–	церулоплазмин
VEGF	–	эндотелиальный фактор роста (Vascular endothelial growth factor)

РЕЗЮМЕ

диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

М.Н. Козадаева

«Особенности изменений микроциркуляции при субкутанной имплантации скаффолдов на основе поликапролактона и гидроксиапатита»

В представленном диссертационном исследовании было проведено изучение взаимосвязи изменений показателей микроциркуляции кожи над областью размещения оригинального скаффолда на основе поликапролактона и гидроксиапатита с системными и локальными проявлениями воспалительной реакции, процессами заселения матрицы клетками соединительной ткани и её васкуляризацией. Объектом исследования являлись крысы, которым выполнялась имплантация или имитация имплантации скаффолдов. Впервые выявлены микроциркуляторные критерии для динамической оценки биосовместимости скаффолдов методом лазерной доплеровской флоуметрии при субкутанных имплантационных тестах. Доказано, что отечественный оригинальный скаффолд на основе поликапролактона и гидроксиапатита обладает биосовместимостью, хорошо васкуляризуется и заселяется клетками фибробластического ряда, что позволяет рекомендовать его дальнейшую клиническую апробацию.

ABSTRACT

of PhD thesis

«The features of microcirculation changes in subcutaneous implantation of polycaprolactone and hydroxyapatite scaffold»

by M.N. Kozadaev

The present research contains study results of the relationship between skin microcirculation index changes above the PCL and HA scaffold implantation area and the following processes: systemic and local manifestations of inflammatory reaction, connective tissue cell colonization and vascularization processes in the matrix. The investigation was fulfilled on rats which underwent authentic and simulated implantation of the scaffold. The novel method employed in our research allowed identifying microcirculatory criteria for dynamic evaluation of scaffold biocompatibility by laser Doppler flowmetry in subcutaneous implantation tests. It was proved that original PCL and HA scaffold is biocompatible, well vascularized and colonized by fibroblast cells thus it can be recommended for further clinical approbation.