

БИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ НОВОГО ГИБРИДНОГО ПОЛИОЛИГОМЕРА: МОДЕЛИ *in vitro* и *in vivo*

DOI: 10.17691/stm2020.12.6.05

УДК 616.379–008.64–053.2–036.22

Поступила 25.08.2020 г.



А.Е. Боков, к.м.н., зав. отделением онкологии и нейрохирургии Университетской клиники¹;
А.А. Булкин, врач-нейрохирург Университетской клиники¹;
Д.В. Давыденко, к.б.н., научный сотрудник группы патологической анатомии Университетской клиники¹;
Н.Ю. Орлинская, д.м.н., профессор, зав. отделением патологической анатомии Университетской клиники¹;
М.Н. Егорихина, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории регенеративной медицины
 НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹;
Ю.П. Рубцова, к.б.н., научный сотрудник лаборатории регенеративной медицины
 НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹;
И.Н. Чарыкова, врач лаборатории биотехнологий Университетской клиники¹;
Р.С. Ковылин, к.х.н., научный сотрудник лаборатории фотополимеризации и полимерных материалов²;
В.В. Юдин, младший научный сотрудник лаборатории фотополимеризации и полимерных материалов²;
С.А. Чесноков, д.х.н., ведущий научный сотрудник лаборатории фотополимеризации
 и полимерных материалов²;
А.Г. Морозов, к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории поисково-прикладных исследований²;
С.Г. Млявых, к.м.н., руководитель Института травматологии и ортопедии¹;
Д.Я. Алейник, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории регенеративной медицины
 НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹

¹Приволжский исследовательский медицинский университет, пл. Минина и Пожарского, 10/1,
 Н. Новгород, 603005;

²Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН, ул. Тропинина, 49,
 Н. Новгород, 603137

Цель исследования — оценить биосовместимость нового гибридного полиолигомера на моделях *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы. Цитотоксичность материала исследовали с помощью МТТ-теста, используя в качестве тестовых культур дермальные фибробласты человека. Для характеристики прямого взаимодействия гибридного полимера с клетками фибробласты культивировали на образцах полимера в течение 96 ч, оценивая состояние культуры каждые 24 ч с помощью метода флуоресцентной микроскопии. Для изучения реакции тканей в области поверхности соприкосновения с донорским ложем и морфологических особенностей перестройки образцов использовали модель костного дефекта у кролика. Образцы гибридного полиолигомера были имплантированы в сформированный дефект крыла левой подвздошной кости у 10 кроликов. В качестве контроля в аналогичный дефект 10 животных трансплантировали заранее заготовленные образцы аллокости. Кроликов выводили из эксперимента через 4 и 8 нед после операции. Для оценки состояния тканей в области дефекта использовали стандартный морфологический метод с окраской гематоксилином и эозином и метод иммуногистохимии с применением маркера пролиферации Ki-67.

Результаты. Показано, что гибридный полиолигомер не цитотоксичен (ранг по шкале цитотоксичности — 0–1), на его поверхности клетки хорошо адгезируются, сохраняют жизнеспособность и типичную морфологию в течение всего срока наблюдения. Не выявлено отрицательного воздействия имплантации материала на состояние и поведение животных. При морфологическом исследовании отмечены отсутствие воспалительных изменений, образование тонкостенных капиллярных сосудов и

Для контактов: Алейник Диана Яковлевна, e-mail: daleynik@yandex.ru

выраженная пролиферативная активность мезенхимальных клеток в зоне дефекта, которые проявляются интенсивнее, чем в контрольной группе.

Заключение. Отсутствовали признаки воспаления к 8-й неделе эксперимента. Наблюдалось начало формирования новой кости. Полученные данные позволяют считать разработанный гибридный материал перспективным для дальнейших исследований в качестве заменителя костной ткани.

Ключевые слова: олигоэфирметакрилат; полилактид; гибридный пористый полимер; модель костного дефекта; ремоделирование тканей; цитотоксичность; биосовместимость.

Как цитировать: Bokov A.E., Bulkin A.A., Davydenko D.V., Orlinskaya N.Yu., Egorikhina M.N., Rubtsova Yu.P., Charykova I.N., Kovylin R.S., Yudin V.V., Chesnokov S.A., Morozov A.G., Mlyavykh S.G., Aleynik D.Ya. Biological response to a novel hybrid polyoligomer: *in vitro* and *in vivo* models. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2020; 12(6): 36–46, <https://doi.org/10.17691/stm2020.12.6.05>

English

Biological Response to a Novel Hybrid Polyoligomer: *in vitro* and *in vivo* Models

A.E. Bokov, MD, PhD, Head of the Department of Oncology and Neurosurgery, University Clinic¹;

A.A. Bulkin, Neurosurgeon, University Clinic¹;

D.V. Davydenko, PhD, Researcher, Pathological Anatomy Group, University Clinic¹;

N.Yu. Orlinskaya, MD, DSc, Professor, Head of Pathological Anatomy Department, University Clinic¹;

M.N. Egorikhina, PhD, Leading Researcher, Laboratory of Regenerative Medicine, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹;

Yu.P. Rubtsova, PhD, Researcher, Laboratory of Regenerative Medicine, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹;

I.N. Charykova, Physician, Biotechnology Laboratory, University Clinic¹;

R.S. Kovylin, PhD, Researcher, Laboratory of Photopolymerization and Polymer Materials²;

V.V. Yudin, Junior Researcher, Laboratory of Photopolymerization and Polymer Materials²;

S.A. Chesnokov, DSc, Leading Researcher, Laboratory of Photopolymerization and Polymer Materials²;

A.G. Morozov, PhD, Senior Researcher, Applied Research Laboratory²;

S.G. Mlyavykh, MD, PhD, Director of the Institute of Traumatology and Orthopedics¹;

D.Ya. Aleynik, MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Regenerative Medicine, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹

¹Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia;

²G.A. Razuvaev Institute of Organometallic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 49 Tropinina St., Nizhny Novgorod, 603137, Russia

The aim of the study is to evaluate biocompatibility of a novel hybrid polyoligomer in *in vitro* and *in vivo* models.

Materials and Methods. Cytotoxicity of the material was investigated using the MTT assay with human dermal fibroblasts as test cultures. To study direct interaction of the hybrid polyoligomer with cells, the fibroblasts were cultured on the polymer samples for 96 h, the cultures were assessed every 24 h using fluorescence microscopy. To study the tissue reaction in the area of contact with the donor bed and the morphological features of the implanted sample restructuring, a case-control study was performed using a rabbit model. Samples of hybrid polyoligomer were implanted into the bone defect formed in the left iliac crest in 10 rabbits. In the control group, the prepared allograft samples were transplanted into similar defects in 10 animals. The rabbits were sacrificed 4 and 8 weeks after the operation. The standard morphological methods with hematoxylin and eosin staining and immunohistochemical Ki-67 proliferation marker evaluation were used to assess the state of tissues in the defect area.

Results. The results demonstrate that the hybrid polyoligomer is not cytotoxic (cytotoxicity score 0–1), cells adhere well to its surface, retain their viability and typical morphology throughout the entire observation period. No negative impact of material implantation on the health state and behavior of animals was detected. Morphological examination showed the absence of inflammatory changes, formation of thin-walled capillary vessels, and considerable proliferative activity of mesenchymal cells in the defect area, even though it was more intense than in the control group.

Conclusion. No inflammation signs were detected by 8th week of the experiment. It was defined that new bone was beginning to form. The results of analysis support the conclusion that the developed hybrid materials are prospective for further research as potential bone substitute.

Key words: oligoester di(meth)acrylate; polylactide; hybrid porous polyoligomer; bone defect model; tissue remodeling; cytotoxicity; biocompatibility.

Введение

Проблема замещения дефектов костной ткани, образовавшихся в результате различных заболеваний, травм или сложных хирургических вмешательств, остается актуальной. Недостаток донорского материала для получения ауто- и аллотрансплантатов [1–4], различные проблемы при использовании ксеногенных биоматериалов [5, 6] привлекают все большее внимание к биосовместимым полимерам. Благодаря своим достоинствам, таким как низкая масса, возможность использовать мономеры и/или полимеры в качестве чернил для 3D-печати с целью изготовления персонализированных имплантатов, получение и хранение любого необходимого количества материала и стандартных изделий, способность в широком интервале варьировать заданные характеристики, полимеры выгодно отличаются от других материалов. Описано использование целого ряда полимеров в медицине. Это и биodeградируемые полимеры, наиболее перспективными из которых считаются материалы на основе полилактидов и их сополимеров, и имплантаты из биостабильных материалов, которые могут иметь неизменную жесткую сетчатую структуру, обеспечивающую возможность для адгезии и последующего функционирования клеток реципиента [7–9].

Известно, что наряду с прочностью, моделируемостью, osteoconдуктивностью и osteoиндуктивностью одним из ключевых требований к костно-замещающим материалам является пористость. Система взаимосвязанных пор должна обеспечивать эффективную циркуляцию тканевой жидкости с последующим вращением мелких кровеносных сосудов и рекрутированием клеток реципиента в трансплантируемые конструкции. Для создания стабильных имплантатов с требуемыми значениями прочности и необходимым объемом пор перспективными являются сшитые (сетчатые) пористые полимеры. Изделия заданной геометрии на их основе могут быть получены с использованием новейших подходов в рамках аддитивных технологий [10]. Полимеры на основе олигоэфир(мет)акрилатов не токсичны, поэтому широко используются в пломбировочных материалах, «костном цементе», контактных линзах [11–13].

Нами были получены полиолигомерные пористые матрицы, продемонстрировавшие отсутствие цитотоксичности, высокую адгезию и пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток на их поверхности [14, 15]. Разработанная технология формирования материала обеспечила получение пористого полимера с системой открытых связанных пор различного размера и с различной пористостью, что позволяет приблизить его характеристики к пористости различных костных сегментов. Использование биосовместимых каталитических систем на основе щелочноземельных элементов (магний, кальций) методом полимеризации с раскрытием цикла D,L-лактида позволило получить атактический полилактид, кото-

рый, как было установлено в экспериментах *in vitro*, демонстрирует отсутствие цитотоксичности по отношению к дермальным фибробластам человека. Кроме того, выделяющиеся в процессе гидролиза растворимые продукты распада полимера выступают в качестве стимуляторов роста, обеспечивая устойчивую клеточную пролиферацию [16].

Представляло также интерес получить материал, сочетающий свойства полиолигомера и полилактида, что может обеспечить оптимизацию характеристик данного материала. Для решения этой задачи был разработан материал из гибридного полиолигомера (ГПО) на основе полиолигомера и полилактида с пористостью 65–70% и размером пор от 5 до 20 мкм. Каждый новый материал, планируемый для медицинского применения, прежде всего должен быть исследован на биологических моделях, что и предопределило задачу настоящего исследования.

Цель исследования — оценить биосовместимость разработанного материала из гибридного полиолигомера на биологических моделях *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы

Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом и утвержден Ученым советом Приволжского исследовательского медицинского университета (Н. Новгород). Все процедуры с животными проводили в условиях вивария с соблюдением требований Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006), и в соответствии с приказом Минздравсоцразвития России №199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» (2016).

Опытные образцы. Материал из ГПО для исследования получен из пористой полиолигомерной матрицы путем нанесения на поверхность пор слоя полилактида (мол. масса — $2 \cdot 10^4$ Да). Поровые характеристики материала определяли методом ртутной порометрии с помощью порозиметра PASCAL EVO 140/440 ULTRA MACRO (Thermo Fisher Scientific, США). Пористость материала составляла 68,1%, средний размер пор — 10,7 мкм. Образцы представляли собой непрозрачные пластины белого цвета. Размеры образцов соответствовали размеру предполагаемого дефекта у животных.

Характеристика тестовой культуры. На первом этапе работы исследовали взаимодействие образцов гибридного материала с культурой клеток, используя в качестве тестовой культуры дермальных фибробластов человека. Культуры были стерильны, проверены на контаминацию микоплазмами и вирусами методом ПЦР. Перед вводом в эксперимент клетки культур были морфологически однородны, преимущественно веретеновидной формы, формировали субконфлюэнтный монослой. Жизнеспособность клеток в культурах составляла 98–99%. Доля клеток с фено-

типом CD90⁺, CD105⁺, CD73⁺, CD10⁺, CD45⁻, CD34⁻, CD14⁻, CD HLA-DR⁻, типичным для клеток мезенхимного ряда, составляла 99%. Для исследования использовали культуры 4-го пассажа.

Оценка цитотоксичности материала. Для ее проведения использовали МТТ-тест. В основе этого теста лежит способность живых клеток восстанавливать желтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (МТТ) в пурпурные внутриклеточные кристаллы МТТ-формаза, растворимые в изопропанолу или диметилсульфоксиду. Количество восстановленного продукта измеряется фотометрически при длине волны 540 нм. Статистически значимое уменьшение оптической плотности опытных проб по сравнению с контрольными пробами, регистрируемое на планшетном ридере, дает возможность оценки цитотоксического действия исследуемого вещества на клетки [17].

При проведении исследований испытываемые образцы заливали средой α -МЕМ с антибиотиками и 2% телячьей эмбриональной сыворотки на 1 и 7 сут и помещали в инкубатор при стандартных условиях. Через сутки и/или через 7 сут экстракт над образцами отбирали. Параллельно готовили тестовую культуру. Для этого фибробласты в концентрации $1 \cdot 10^5$ засеивали на лунки плоскостонного 96-луночного планшета в среде α -МЕМ с антибиотиками и 10% инактивированной телячьей эмбриональной сыворотки и культивировали в стандартных условиях в течение 3 дней. По истечении этого срока ростовую среду над клетками заменяли экстрактом от образцов и его разведениями (1:1; 1:2; 1:4; 1:8). Через 24 ч среду в лунках заменяли раствором МТТ и клетки инкубировали с МТТ еще 4 ч. Раствор МТТ готовили в концентрации 1 мг/мл в сбалансированном растворе Хенкса. Через 4 ч инкубации супернатант осторожно аспирировали, добавляли диметилсульфоксид (200 мкм) и регистрировали оптическую плотность при 540 нм на анализаторе Sunrise (Tecan Austria GmbH, Австрия).

Относительную интенсивность роста (ОИР) определяли по следующей формуле:

$$\text{ОИР(\%)} = \frac{\text{Средняя ОП в тест. культуре}}{\text{Средняя ОП в контроле}} \cdot 100.$$

Выраженность ОИР определяли, ориентируясь на ранговую шкалу оценки цитотоксичности [18].

Оценка адгезии клеток на поверхности материала. Для оценки адгезии на поверхность образцов засеивали суспензию фибробластов 4-го пассажа в концентрации $2 \cdot 10^6$ /мл. Чашки с образцами помещали в CO₂-инкубатор при 37 °С и 5% CO₂ во влажной атмосфере, культивировали в течение 96 ч и контролировали рост культуры каждые 24 ч. Смену ростовой среды проводили через 48 ч. Через 24, 48 и 96 ч культивирования часть образцов отбирали для исследования методом флуоресцентной микроскопии, который был реализован на многофункциональном фотометре-имиджере Cyation 5 (BioTek, США).

Прижизненное окрашивание ядер клеток, адгезированных на материале, выполняли с применением флуорохрома Hoechst 3334 (BD Pharmingen, США), обладающего высокой специфичностью к двухцепочечной молекуле ДНК (длина волны возбуждения — 377 нм, длина волны эмиссии — 447 нм). Для маркировки живых клеток и характеристики их морфологии использовали кальцеин (Calcein AM; BD Pharmingen; длина волны возбуждения — 469 нм, длина волны эмиссии — 525 нм). Окрашивание флуорохромами проводили в соответствии с протоколами производителя.

Экспериментальная модель *in vivo*. В качестве живой модели использовали кроликов породы шиншилла. Выбор данной модели обусловлен тем, что кости кролика имеют характеристики, сходные с биомеханическими характеристиками костей человека [19]. Размеры животного достаточны для имплантации объемных трансплантатов с целью изучения реакции тканей в области поверхности соприкосновения «трансплантат–донорское ложе» и морфологических особенностей перестройки образцов. Для исследования биосовместимости материала из ГПО была выбрана модель дефекта крыла подвздошной кости кролика. Такой выбор позволял минимизировать травматичность доступа к этому костному образованию и смоделировать дефект костной ткани, достаточный для изучения остеоинтеграции костно-замещающего материала. Для замещения дефекта в контрольной группе животных заготавливали образцы из аллокости кролика, так как аллотрансплантаты по своим анатомическим, физико-химическим характеристикам, содержанию морфогенетических белков максимально соответствуют собственной кости реципиента [20]. Для заготовки аллотрансплантата после эфтаназии интактного животного выделяли подвздошные кости и полностью освобождали их от мягких тканей. После этого кости обрабатывали раствором нейтрального 10% формалина в течение месяца. Через месяц из заготовленной кости вырезали образцы, по форме и размеру соответствующие размеру предполагаемого костного дефекта, тщательно отмывали стерильным физиологическим раствором и стерилизовали.

Ход эксперимента. Эксперимент был выполнен на 20 взрослых кроликах-самцах в возрасте 6–8 мес, массой от 2900 до 3500 г, без атеросклеротического поражения сосудов. Для обезболивания использовали внутримышечное введение смеси 1,0 мл КсилаВета (Pharmamagist Ltd, Венгрия) и 1,0 мл Золетила (Virbac Sante Animale, Франция); операционное поле после стрижки и бритья обрабатывали антисептиком Авансепт. Доступ осуществляли линейным разрезом длиной 3 см в проекции гребня подвздошной кости слева. Затем участок гребня скелетировали на протяжении 1,5 см. С помощью фрезы Verticem V+8g (Synthes GmbH, США) формировали бикортикальный костный дефект размером 1,0×0,5×0,5 см с плоскими поверхностями. В этот дефект животным контрольной группы устанавливали аллотрансплантаты,

а экспериментальной группы — имплантаты из гибридного полиолигомерного материала. Образцы плотно подгоняли для обеспечения максимальной площади соприкосновения в области дефекта, после чего фиксировали костным швом нитью VICRYL 2-0. Перед завершением операции осуществляли тщательный гемостаз и выполняли послойный шов раны.

В процессе наблюдения оценивали поведение животных, изменение аппетита, прибавку массы, состояние тканей в зоне операционной раны. Все животные имели свободный доступ к воде, получали достаточное количество кормов.

Через 4 нед (30 дней) выводили из эксперимента по 5 животных экспериментальной и контрольной групп, остальных — через 8 нед (60 дней) после операции. Для эвтаназии использовали введение анестетиков в летальной дозе (в 3 раза превышающей дозу, необходимую для обеспечения наркоза). После эвтаназии у каждого животного как опытной, так и контрольной группы скелетировали левую подвздошную кость в зоне экспериментального дефекта, вырезали фрагмент кости в зоне экспериментальной раны и передавали для морфологического исследования.

Морфологическое исследование. Полученный материал фиксировали в растворе нейтрального 10% формалина. Костную ткань подвергали декальцинации в бескислотном растворе. Стандартную гистологическую проводку осуществляли на аппарате Excelsior ES (Thermo Scientific, США). После проводки изготавливали парафиновые блоки с использованием заливочной станции HistoStar (Thermo Scientific). Срезы толщиной 4–6 мкм получали на микротоме Microm HM 325 (Thermo Scientific), окрашивали гематоксилином и эозином при помощи станции для окраски Gemini AS (Thermo Scientific). Для морфометрической обработки и создания видеоархива полученного материала использовали микроскоп Leica 2500 (Leica Biosystems, Германия), объективы $\times 4$, $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$, $\times 100$, окуляр — $\times 10$.

Иммуногистохимия. Для оценки активности процессов пролиферации в зоне введения материалов проводили иммуногистохимическое исследование с использованием маркера пролиферации Ki-67. Протокол исследования включал инкубацию срезов с первичными антителами — моноклональные мышинные антитела к Ki-67 (clon MIB-1; Dako, Дания) и вторичными козьими антимышиными антителами Goat anti-Mouse IgG H+L, Alexa Fluor 488 (Abcam, США). Для улучшения визуализации ядра клеток докрасивали красителем Hoechst 3334 (BD Pharmingen, США). После получения препаратов подсчитывали долю Ki-67⁺ клеток.

Статистический анализ. Результаты исследований обрабатывали методами непараметрической статистики с применением критериев Манна–Уитни и парных сравнений Вилкоксона, анализ корреляции проводили с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена с помощью пакета программ Statistica 6.0. Результаты приведены в виде $M \pm m$, где

M — среднее арифметическое, m — стандартная ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

Характеристика цитотоксичности образцов материала из гибридного полиолигомера. Образцы материала из ГПО продемонстрировали отсутствие цитотоксичности — ранг 0–1 по шкале [18] (см. таблицу).

Согласно ранговой шкале оценки цитотоксичности [18], уровни 0 и 1 соответствуют отсутствию цитотоксичности материала, а уровни 2–5 — различной степени токсичности. Разработанный гибридный материал предназначался для использования в условиях длительного контакта с кровью и тканями, и потому отмеченное отсутствие цитотоксичности послужило необходимым условием его дальнейшего использования.

При культивировании фибробластов непосредственно на образцах исследуемого материала через 24 ч клетки хорошо адгезировались и распластывались на поверхности образцов (рис. 1, а) и уже через 96 ч формировали субконфлюэнтный монослой (рис. 1, б).

Использование метода флуоресцентной микроскопии позволило отчетливо визуализировать не только выраженную адгезию культивированных фибробла-

Цитотоксичность гибридного полимера ($M \pm m$)

Материал	Показатели	Срок экстракции	
		1-е сутки	7-е сутки
Контроль (n=8)	Оптическая плотность	0,39±0,01	0,47±0,02
	ОИР, %	100	100
	Уровень цитотоксичности	0	0
Экстракт (n=8)	Оптическая плотность	0,37±0,01	0,42±0,01
	ОИР, %	95	89
	Уровень цитотоксичности	1	1
Экстракт 1:1 (n=8)	Оптическая плотность	0,37±0,01	0,47±0,02
	ОИР, %	95	100
	Уровень цитотоксичности	1	0
Экстракт 1:2 (n=8)	Оптическая плотность	0,33±0,01	0,50±0,01
	ОИР, %	85	106
	Уровень цитотоксичности	1	0
Экстракт 1:4 (n=8)	Оптическая плотность	0,39±0,01	0,47±0,01
	ОИР, %	100	100
	Уровень цитотоксичности	0	0
Экстракт 1:8 (n=8)	Оптическая плотность	0,35±0,01	0,49±0,01
	ОИР, %	90	104
	Уровень цитотоксичности	1	0

стов непосредственно на поверхности исследуемых образцов, но и показать морфологию клеток, а также сохранение ими жизнеспособности в течение всего периода наблюдения.

Таким образом, исследование продемонстрировало отсутствие цитотоксичности гибридного полиолигомерного материала и тем самым доказало его перспективность для дальнейшего использования в биомедицинских целях.

Состояние экспериментальных животных в процессе наблюдения. Все экспериментальные животные перенесли оперативное вмешательство удовлетворительно, в процессе послеоперационного наблюдения оставались активными, прибывали в массу. Какие-либо инфекционные заболевания, осложнения общего или местного характера не наблюдались.

Морфологическая характеристика кости в зоне имплантации. Результаты проведенных морфологических исследований показали, что процессы заживления костных дефектов у экспериментальных и контрольных животных протекали с общими закономерностями, включая фазы посттравматических изменений тканевых элементов, регенерации и адаптивного ремоделирования. Видимых признаков воспалительной реакции в ответ на введение импланти-

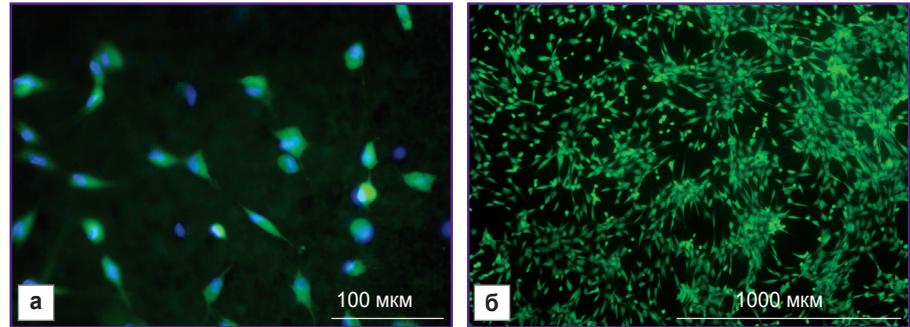


Рис. 1. Дермальные фибробласты человека на поверхности материала из гибридного полиолигомера:

а — 24 ч культивирования — веретеновидные клетки с выраженными отростками; б — 96 ч культивирования — субконфлюэнтный монослой фибробластов, сформированный клетками веретеновидной формы. Флуоресцентная микроскопия; синим цветом окрашены ядра клеток (флуорохром Hoechst 3334 (BD Pharmingen)); длина волны возбуждения — 377 нм, волны эмиссии — 447 нм); зеленое окрашивание — цитоплазма жизнеспособных клеток (флуорохром Calcein AM (BD Pharmingen)); длина волны возбуждения — 469 нм, волны эмиссии — 525 нм); а — $\times 200$; б — $\times 40$

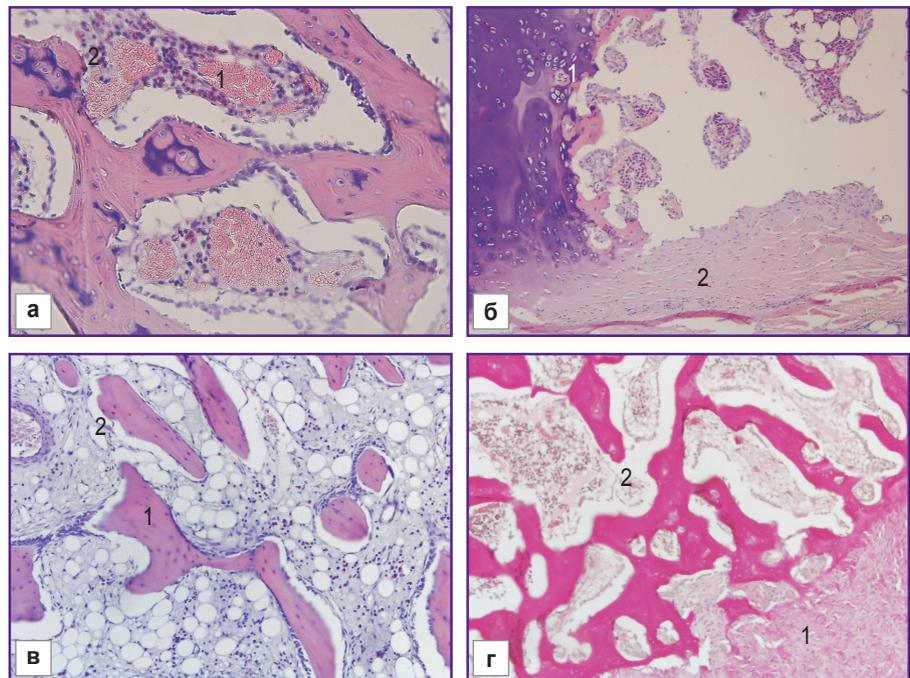
рованных материалов ни в контрольной, ни в опытной группах не наблюдали.

В контрольной группе (n=5) с использованием аллокости гистологическая картина в области дефекта костной ткани на 30-е сутки опыта свидетельствовала об активности непрямого перихондрального остеогенеза с формированием костных пластинок, пролиферацией остеобластов и разрастанием мезенхимальных клеток. Также отмечалось образование соединительнотканной капсулы вокруг зоны имплантата (рис. 2).

Через 60 дней в контрольной группе (n=5) происходило формирование незрелой костной ткани, состоящей из остеобластов и остеоцитов

Рис. 2. Морфологические изменения в контрольной группе с применением аллокости, 30-е сутки эксперимента:

а — в области расположения аллотрансплантата выраженное полнокровие сосудов, кровоизлияния (1), пролиферация остеобластов и разрастание мезенхимальных клеток (2); б — формирование незрелой костной ткани с присутствием хрящевых элементов (1) и соединительнотканной капсулы вокруг дефекта (2); в — пролиферация остеобластов (1) и разрастание мезенхимальных клеток (2); г — образование соединительнотканной капсулы (1) вокруг зоны дефекта (2); а-в — окраска гематоксилином и эозином; г — по Ван-Гизону; $\times 100$



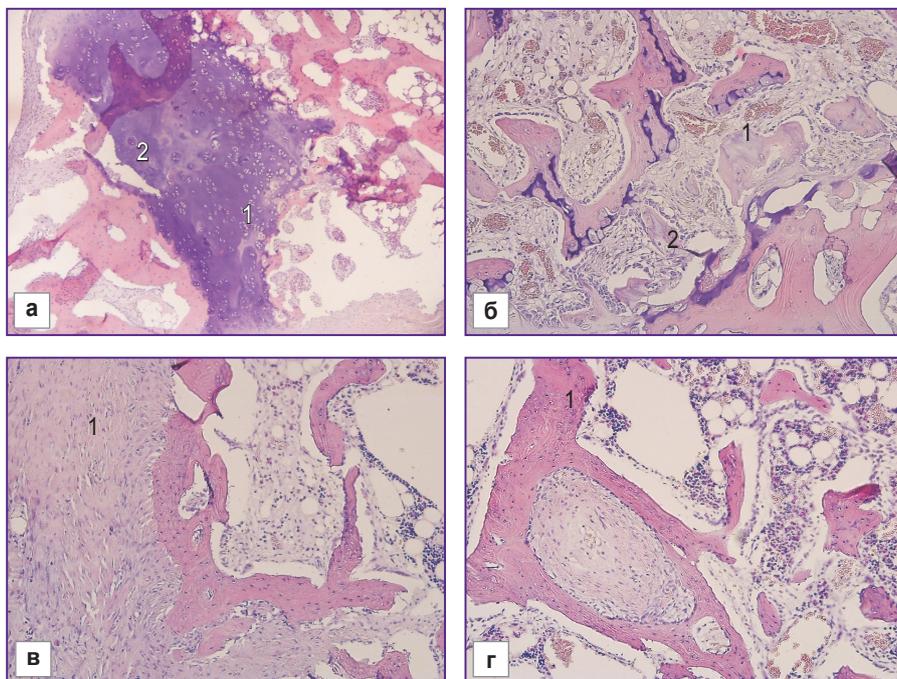


Рис. 3. Морфологические изменения в контрольной группе с применением аллокости, 60-е сутки эксперимента:

а — формирование незрелой костной ткани с присутствием хрящевых элементов (1) и новообразованной кости (2); **б** — формирование незрелой костной ткани с присутствием хрящевых элементов (1), формирование в лакунах новообразованной кости, состоящей из остеобластов и остеоцитов (2); **в** — разрастание соединительнотканной капсулы вокруг зоны дефекта (1); **г** — формирование новообразованной кости (1); окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

с присутствием хрящевых элементов. Вокруг зоны дефекта продолжалось разрастание соединительнотканной капсулы (рис. 3).

При использовании имплантатов из ГПО в репаративной регенерации костной ткани наблюдались некоторые отличия. Через 30 дней эксперимента, кроме формирования соединительнотканной капсулы вокруг зоны имплантата, отмечались разрастание нежно-волокнистой соединительной ткани вокруг мелкогранулярных структур материала с большим количеством тонкостенных новообразованных сосудов капиллярного типа, пролиферация остеогенных клеток, трансформация их в остеобласты и формирование новой костной ткани в виде костных трабекул, с образованием в межтрабекулярных пространствах сосудов капиллярного типа. В костных лакунах содержались фрагменты гибридного полимера.

На 30-е сутки эксперимента в зоне повреждения отмечалась частичная биодеградация имплантируемых образцов на фоне активного образования соединительной ткани. В отдельных участках исследуемых

препаратов наблюдалось слабовыраженное разрастание мезенхимальной ткани вокруг имплантата с пролиферацией остеобластов и образованием

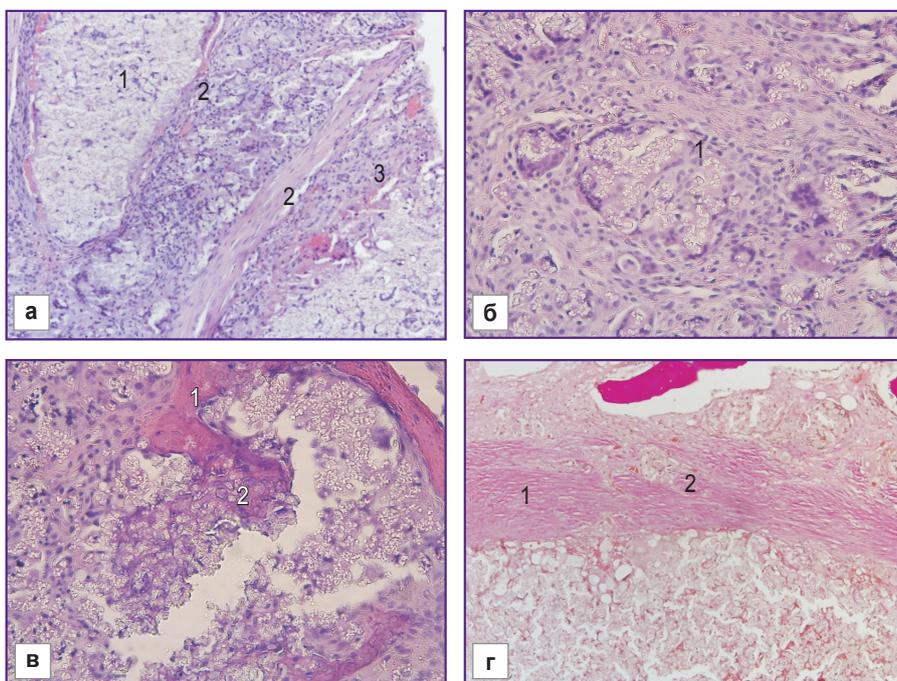


Рис. 4. Морфологические изменения в экспериментальной группе с применением гибридного полиолигомера, 30-е сутки эксперимента:

а — формирование вокруг зоны имплантата (1) зрелой соединительной ткани (2), грануляционной ткани, новообразованных сосудов (3); **б** — диффузное прорастание структур имплантата соединительнотканью с началом формирования сосудов (1); **в** — формирование в участках разрастания соединительнотканых волокон (1) незрелой костной ткани, интимно связанной со структурами имплантата (2); **г** — зрелая волокнистая соединительная ткань (1), формирующая капсулу и прорастающая структуры имплантата (2); **а-в** — окраска гематоксилином и эозином; **г** — специальная окраска по Ван-Гизону; $\times 100$

остеоида, которое было более выражено в экспериментальной группе, чем в контрольной. При этом частицы тестируемого материала из ГПО не включались в состав остеогенной ткани и находились отдельно от нее в форме кластеров (рис. 4).

На 60-е сутки при имплантации в костный дефект образцов ГПО происходило формирование в области дефекта незрелой костной ткани. Следует отметить, что количество остеогенных клеток по сравнению с контрольной группой значительно увеличилось, при этом костная ткань имела более организованную структуру. Масса остеогенной ткани заметно возросла, но строение костных пластин оставалось хаотичным. Количество полимера на единицу костной ткани на 60-е сутки эксперимента уменьшалось на 22,4% по сравнению с 30-ми сутками (рис. 5), что может свидетельствовать о биодеградации материала.

Новообразованная костная ткань имела рыхлую структуру и разнонаправленность пластинок. Частицы полимера образовывали агрегаты, состоящие из большого количества мелких частиц. Часть этих агрегатов была окружена клетками мезенхимальной природы и кровеносными сосудами капиллярного типа. Полимер не взаимодействовал с окружающими клетками и не вызывал воспалительной реакции (рис. 6).

Образование соединительной ткани в зоне имплантата у животных контрольной и опытной групп имело свои особенности. В контрольной группе формировалась соединительнотканная капсула вокруг зоны имплантата, а в экспериментальной, кроме этого, отмечалось прорастание волокон соединительной ткани через имплантат с активным образованием грануляционной ткани.

Интересно сравнить индексы пролиферативной активности Ki-67 в контрольной и опытной группах, свидетельствующие об активности процессов регенерации (рис. 7, 8).

В контрольной группе доля Ki-67-позитивных клеток за время эксперимента увеличивалась от 1,75% (4 нед) до 8% (8 нед). В экспериментальной группе доля Ki-67-позитивных клеток изначально находилась на более высоком уровне — 9,5% и возрастала к 60-му дню до 21%, что могло свидетельствовать о способности гибридного полимера активизировать процессы клеточной пролиферации.

Анализ полученных данных

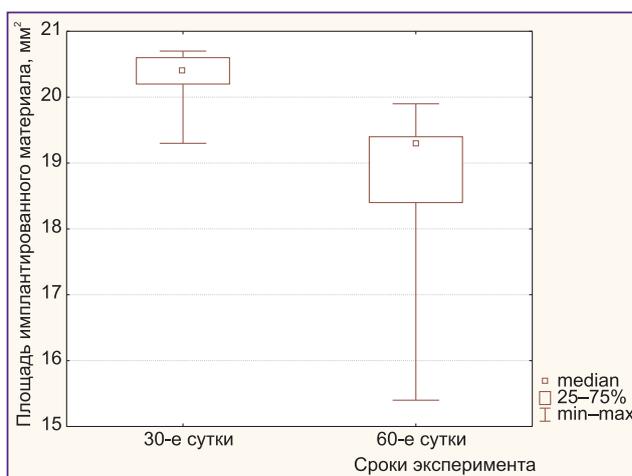


Рис. 5. Показатель биодеградации имплантата из гибридного полиолигомера в эксперименте: уменьшается на 22,4% к 60-м суткам, $p=0,031$

показал, что пролиферативная активность клеток, мигрировавших и функционирующих в зоне введения ГПО на 4-й неделе эксперимента, была более чем в 5 раз выше, чем в зоне введения аллотрансплантата

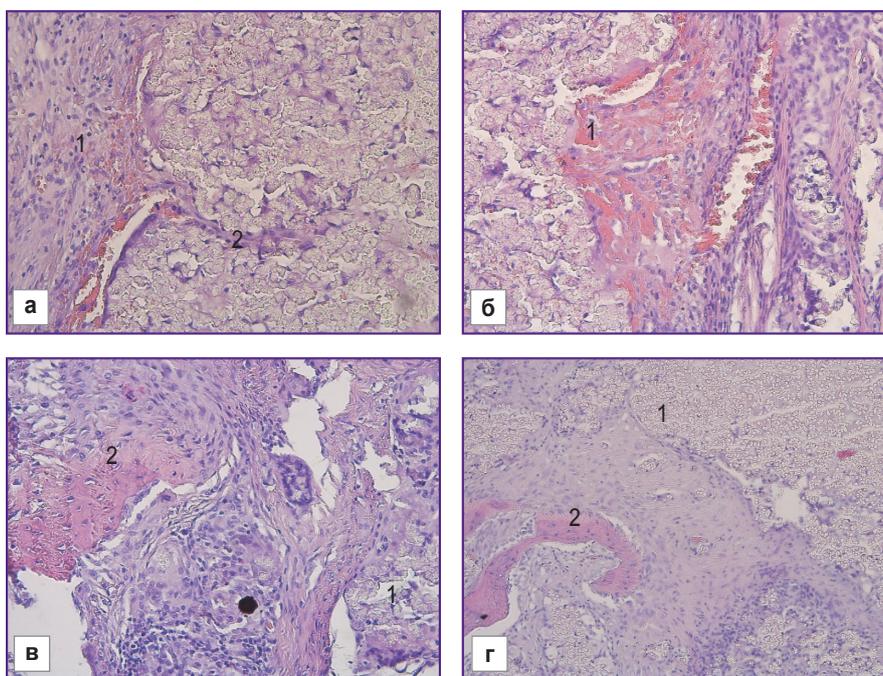


Рис. 6. Морфологические изменения в группе с применением гибридного полиолигомера, 60-е сутки эксперимента:

а — грануляционная ткань и новообразованные сосуды (1), прорастание соединительной ткани между фрагментами имплантата (2); б — постепенное «зарастание» структур имплантата нежно-волоконистой соединительной тканью и новообразованными сосудами (1); в — вокруг мелкогранулярных структур материала наблюдается пролиферация остеогенных клеток (1), трансформация их в остеобласты и формирование новой костной ткани в виде костных трабекул, с образованием в межтрабекулярных пространствах сосудов капиллярного типа (2); г — в зоне имплантата (1) начала формироваться новая костная ткань в виде костных трабекул (2); окраска гематоксилином и эозином; $\times 100$

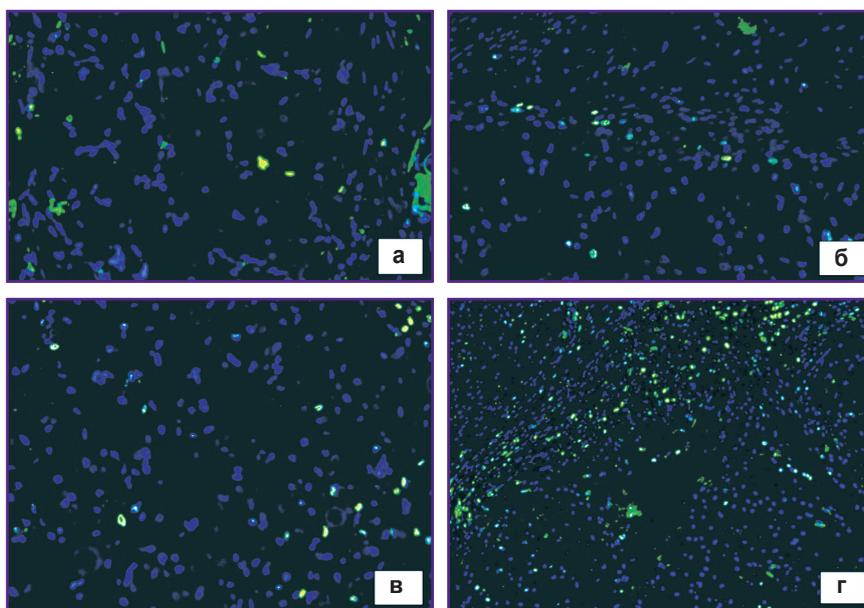


Рис. 7. Ядра клеток в зоне имплантации аллотрансплантата (а, в) и гибридного полиолигомера (б, г): а, б — 30 сут; ×200; в, г — 60 сут; ×100. Флуоресцентная микроскопия: Ki-67-позитивные ядра клеток окрашены зеленым, Ki-67-негативные — синим. Зеленое окрашивание — антитела к Ki-67; Goat Anti-Mouse IgG H+L, Alexa Fluor 488; синее окрашивание — флуорохром Hoechst 33334 (длина волны возбуждения — 377 нм, эмиссии — 447 нм)

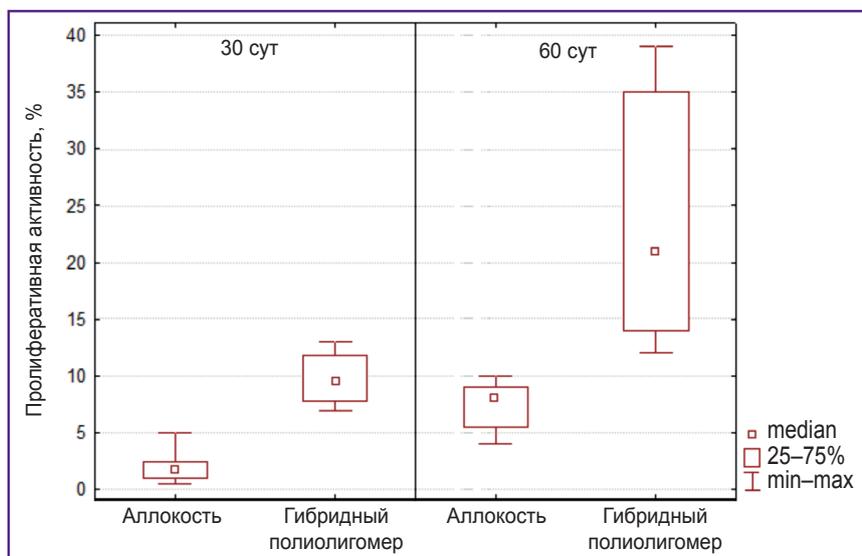


Рис. 8. Проллиферативная активность клеток в исследуемых тканях

($p=0,0002$), а на 8-й неделе — выше в 2,6 раза ($p=0,0058$).

Таким образом, полученные результаты продемонстрировали определенные особенности регенерации костной ткани у животных экспериментальной группы по сравнению с контрольной. Процессы регенерации в экспериментальной группе отличались активным образованием нежно-волоконистой соединительной ткани с активным прорастанием в нее сосудов капиллярного типа, формированием грануляционной ткани и началом прямого остеогенеза уже на ранних сроках эксперимента (30 сут). В контрольной группе отмечали образование соединительнотканной капсулы и непрямого остеогенеза с образованием хрящевой ткани, что увеличивало сроки заживления. Проллиферативная актив-

ность в этой группе уже на ранних сроках исследования (30 сут) была в пять раз ниже, чем в экспериментальной. К концу эксперимента наблюдали уменьшение объема ГПО в зоне имплантации по сравнению с его объемом на 4-й неделе эксперимента.

Особенности восстановления костного дефекта при использовании различных замещающих материалов зависят как от самого материала, так и от экспериментальной модели: вида животного, локализации экспериментального костного дефекта и т.д. [21–23]. При гистологическом исследовании взаимодействия материалов с костной тканью, как правило, оценивают воспалительные реакции, выраженность васкуляризации, об-

разование новой кости и ее созревание с учетом области вокруг имплантатов [24].

В нашем исследовании во всех группах в зоне дефекта не зафиксировано признаков выраженного воспаления, что является одним из важнейших показателей пригодности материалов для использования в костной пластике [25]. Еще одним из подтверждений положительного эффекта взаимодействия использованных материалов с раневым ложем послужило выявленное образование новых сосудов капиллярного типа, что является одним из показателей эффективного ангиогенного ответа нативной ткани на имплантированные материалы. Наличие достаточной васкуляризации обеспечивает адекватное снабжение и обмен питательными веществами, что имеет решающее

значение для миграции, выживания и роста клеток, а также для ремоделирования тканей [26]. Выраженная миграция и пролиферация клеток мезенхимального ряда и начало прямого остеогенеза при имплантации материала из ГПО свидетельствовали о положительном эффекте этого материала.

Установлено, что фрагменты как аллокости, так и ГПО сохранялись в зоне имплантации до окончания эксперимента (60 сут). В то же время содержание полимера в зоне дефекта статистически значимо уменьшалось (на 22,4%). Сохранение фрагментов имплантатов или трансплантатов в зоне дефекта зависит от состава и структуры материала и может не нарушать процесс ремоделирования кости, так как при биосовместимости материала новые костные элементы формируются вокруг его фрагментов [27].

Поскольку разработанный материал состоял из двух полимеров, один из которых биodeградируемый, а второй — более стабильный, можно предположить, что зарегистрированное нами уменьшение объема материала имплантата в экспериментальном дефекте связано как с биodeградацией полилактида, так и с разрушением и вымыванием тканевой жидкостью части полиолигомера. Вместе с тем возможность изменения соотношения составных частей гибридного полимера может в дальнейшем позволить изменять его свойства и адаптировать их к особенностям восстановления костных дефектов различной локализации.

Заключение

Исследуемый материал из гибридного полиолигомера продемонстрировал биосовместимость при взаимодействии с клетками человека на модели *in vitro*: был не токсичен, при культивировании на его поверхности клетки хорошо распластывались, сохраняли типичную морфологию и жизнеспособность. Отсутствие признаков воспаления к 8-й неделе эксперимента *in vivo*, выраженный неoангиогенез, активная пролиферация мезенхимальных клеток в зоне экспериментального дефекта у животных, начало формирования новой кости также подтверждают биосовместимость гибридного материала.

Полученные данные позволяют считать разработанный материал из гибридного полиолигомера перспективным для дальнейших исследований его в качестве заменителя костной ткани.

Финансирование исследования. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант №18-13-00434).

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература/References

1. Kristensen B.B. Autologous tissue transplantations for osteochondral repair. *Dan Med J* 2016; 63(4): B5236.

2. Oryan A., Alidadi S., Moshiri A., Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res* 2014; 9(1): 18, <https://doi.org/10.1186/1749-799x-9-18>.

3. Ehrlert D.M., Vaccaro A.R. The use of allograft bone in lumbar spine surgery. *Clin Orthop Relat Res* 2000; 371: 38–45, <https://doi.org/10.1097/00003086-200002000-00005>.

4. Tadjoeidin E.S., de Lange G.L., Lyaruu D.M., Kuiper L., Burger E.H. High concentrations of bioactive glass material (BioGran®) vs. autogenous bone for sinus floor elevation. *Clin Oral Implants Res* 2002; 13(4): 428–436, <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.2002.130412.x>.

5. Goldstein S.A. Tissue engineering: functional assessment and clinical outcome. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 961: 183–192, <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb03079.x>.

6. Badylak S.F., Gilbert T.W. Immune response to biologic scaffold materials. *Semin Immunol* 2008; 20(2): 109–116, <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.11.003>.

7. Song R., Murphy M., Li C.S., Ting K., Soo C., Zheng Z. Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications. *Drug Des Devel Ther* 2018; 12: 3117–3145, <https://doi.org/10.2147/dddt.s165440>.

8. Ritz U., Gerke R., Götz H., Stein S., Rommens P.M. A new bone substitute developed from 3D-prints of polylactide (PLA) loaded with collagen I: an *in vitro* study. *Int J Mol Sci* 2017; 18(12): 2569, <https://doi.org/10.3390/ijms18122569>.

9. Shen J., Shi D., Shi C., Li X., Chen M. Fabrication of dopamine modified polylactide-poly(ethylene glycol) scaffolds with adjustable properties. *J Biomater Sci Polym Ed* 2017; 28(17): 2006–2020, <https://doi.org/10.1080/09205063.2017.1366250>.

10. Mota C., Camarero-Espinosa S., Baker M.B., Wieringa P., Moroni L. Bioprinting: from tissue and organ development to *in vitro* models. *Chem Rev* 2020; 120(19): 10547–10607, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00789>.

11. LePrince J.G., Palin W.M., Hadis M.A., Devaux J., Leloup G. Progress in dimethacrylate-based dental composite technology and curing efficiency. *Dent Mater* 2013; 29(2): 139–156, <https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.11.005>.

12. Deb S., Aiyathurai L., Roether J.A., Luklinska Z.B. Development of high-viscosity, two-paste bioactive bone cements. *Biomaterials* 2005; 26(17): 3713–3718, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.09.065>.

13. Behl G., Iqbal J., O'Reilly N.J., McLoughlin P., Fitzhenry L. Synthesis and characterization of poly(2-hydroxyethylmethacrylate) contact lenses containing chitosan nanoparticles as an ocular delivery system for dexamethasone sodium phosphate. *Pharm Res* 2016; 33(7): 1638–1648, <https://doi.org/10.1007/s11095-016-1903-7>.

14. Yudin V.V., Kovylin R.S., Baten'kin M.A., Kulikova T.I., Chesnokov S.A., Fedushkin I.L., Egorikhina M.N., Rubtsova Y.P., Charykova I.N., Mlyavykh S.G., Aleynik D.Ya. Visible-light induced synthesis of biocompatible porous polymers from oligocarbonatedimethacrylate (OCM-2) in the presence of dialkyl phthalates. *Polymer* 2020; 192: 122302, <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.122302>.

15. Kovylin R.S., Baten'kin M.A., Kulikova T.I., Egorikhina M.N., Charikova I.N., Gusev S.A., Rubtsova Y.P., Mlyavykh S.G., Aleynik D.Ya., Chesnokov S.A., Fedushkin I.L. Biocompatible non-toxic porous polymeric materials based on carbonate- and phthalate-containing dimethacrylates materials. *ChemistrySelect* 2019; 4: 4147, <https://doi.org/10.1002/slct.201803810>.

16. Morozov A.G., Razborov D.A., Egiazaryan T.A., Baten'kin M.A., Aleynik D.Ya., Egorikhina M.N., Rubtsova Yu.P., Charikova I.N., Chesnokov S.A., Fedushkin I.L. In vitro study of degradation behavior, cytotoxicity, and cell adhesion of the atactic polylactic acid for biomedical purposes. *J Polym Environ* 2020; 28: 2652–2660, <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01803-x>.
17. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1–2): 55–63, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
18. Shanmugam S., Copal B. Antimicrobial and cytotoxicity evaluation of aliovalent substituted hydroxyapatite. *Appl Surf Sci* 2014; 303: 277–281, <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.02.166>.
19. Mapara M., Thomas B.S., Bhat K.M. Rabbit as an animal model for experimental research. *Dental Res J (Isfahan)* 2012; 9(1): 111–118, <https://doi.org/10.4103/1735-3327.92960>.
20. Zimmermann G., Moghaddam A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury* 2011; 42(Suppl 2): S16–S21, <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.06.199>.
21. Myciński P., Zarzecka J., Skórska-Stania A., Jelonek A., Okoń K., Wróbel M. Ceramic-poly lactide composite material used in a model of healing of osseous defects in rabbits. *Pol J Pathol* 2017; 68(2): 153–161, <https://doi.org/10.5114/pjp.2017.69692>.
22. Talley A.D., McEnergy M.A., Kalpakci K.N., Zienkiewicz K.J., Shimko D.A., Guelcher S.A. Remodeling of injectable, low-viscosity polymer/ceramic bone grafts in a sheep femoral defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2017; 105(8): 2333–2343, <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33767>.
23. Ikumi R., Miyahara T., Akino N., Tachikava N., Kasugai S. Guided bone regeneration using a hydrophilic membrane made of unsintered hydroxyapatite and poly(L-lactic acid) in a rat bone-defect model. *Dent Mater J* 2018; 37(6): 912–918, <https://doi.org/10.4012/dmj.2017-385>.
24. Mahmood S.K., Razak I.A., Ghaji M.S., Yusof L.M., Mahmood Z.K., Rameli M.A.B.P., Zakaria Z.A.B. In vivo evaluation of a novel nanocomposite porous 3D scaffold in a rabbit model: histological analysis. *Int J Nanomedicine* 2017; 12: 8587–8598, <https://doi.org/10.2147/ijn.S145663>.
25. Jin H.H., Kim D.H., Kim T.W., Shin K.K., Jung J.S., Park H.C., Yoon S.Y. In vivo evaluation of porous hydroxyapatite/chitosan-alginate composite scaffolds for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 2012; 51(5): 1079–1085, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.08.027>.
26. Li Z., Ramay H.R., Hauch K.D., Xia D., Zhang M. Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2005; 26(18): 3919–3928, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.09.062>.
27. Cai K., Yao K., Yang Z., Qu Y., Li X. Histological study of surface modified three dimensional poly (D, L-lactic acid) scaffolds with chitosan in vivo. *J Mater Sci Mater Med* 2007; 18: 2017–2024, <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3151-1>.