

УДК 577.1.08:611.36.018:615.37:616-089.943
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-63-71>

Местная биосовместимость и биохимические маркеры цитолиза гепатоцитов при подкожной имплантации полилактидных матриц

Иванова Е.А., Дзюман А.Н., Дворниченко М.В.

Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

РЕЗЮМЕ

Цель. Исследование местной биосовместимости и системных эффектов нетканых полилактидных (PLA) матриц на показатели крови и печени после подкожной имплантации крысам стока Wistar.

Материалы и методы. Биodeградируемые волокнистые PLA матрицы изготовлены методом электро-спиннинга, имели размеры (10×10 мм², толщина не более 0,5 мм; диаметр волокон в матриксе ~1 мкм), пригодные для подкожного введения белым лабораторным крысам. Полимерные изделия стерилизовали в парах этиленоксида. Через 30 сут после имплантации PLA матриц изучены местная биосовместимость согласно ГОСТ ISO 10993-6-2011, клеточные (общее количество лейкоцитов, гемограмма, число эритроцитов, концентрация гемоглобина) и биохимические показатели крови (концентрация лактата, активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ)), определена стандартная гистологическая оценка состояния печени. Проведены компьютерная морфометрия цифровых изображений гистологических срезов и статистическая обработка результатов.

Результаты. Образцы PLA матрикса являлись легкими местными раздражителями в шкале 1–1,9 балла согласно критериям ГОСТ ISO 10993-6-2011 через 30 сут после подкожной имплантации. Медианная плотность распределения гигантских многоядерных клеток инородных тел (ГМКИТ) в соединительной ткани вокруг и в структуре PLA матриц составила 1 500 (1 350; 1 550) на 1 мм² среза. Имела место выраженная лейкоцитарная реакция крови, обусловленная лимфоцитозом (в 1,7 раза по сравнению с ложнооперированным (ЛО) контролем, $p < 0,02$). Отсутствие значительного нейтрофилии крови свидетельствовало об асептическом характере воспаления, протекающего в подкожной клетчатке вокруг PLA материалов. В крови отмечена нормализация маркеров цитолиза гепатоцитов (активности АЛТ и АСТ), повышенных у ЛО животных (АЛТ – до 123% и АСТ – до 142%, $p < 0,001$ в сравнении с интактными значениями), без выраженных изменений структуры печени и числа двуядерных гепатоцитов.

Заключение. Нетканые PLA матрицы биосовместимы с подкожной клетчаткой, подвергаются биорезорбции ГМКИТ, обладают дистантным протекторным действием на функциональное состояние печени у лабораторных животных. Обсуждены гипотезы обнаруженного системного эффекта при подкожной имплантации PLA матриц. Однако конкретные механизмы требуют дальнейшего изучения.

Ключевые слова: нетканый матрикс из полимолочной кислоты, крысы, сыворотка крови, аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, клетки крови, двуядерные гепатоциты

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Исследование выполнено в рамках Программы стратегического академического лидерства «Приоритет – 2030».

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом СибГМУ (протокол № 7693/1 от 30.09.2019).

Для цитирования: Иванова Е.А., Дзюман А.Н., Дворниченко М.В. Местная биосовместимость и биохимические маркеры цитолиза гепатоцитов при подкожной имплантации полилактидных матриц. *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(4):63–71. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-63-71>.

✉ Дворниченко Марина Владимировна, dochic@yandex.ru

Local biocompatibility and biochemical profile of hepatic cytolysis in subcutaneous implantation of polylactide matrices

Ivanova E.A., Dzyuman A.N., Dvornichenko M.V.

Siberian State Medical University
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

The aim of the study was to investigate local biocompatibility and systemic effects of nonwoven polylactide (PLA) matrices on blood and liver parameters after their subcutaneous implantation in Wistar rats.

Materials and methods. Bioabsorbable fibrous PLA matrices were produced by electrospinning and had dimensions ($10 \times 10 \text{ mm}^2$, thickness of no more than 0.5 mm; fiber diameter in the matrix $\sim 1 \text{ }\mu\text{m}$) appropriate for subcutaneous implantation in white laboratory rats. Polymer implants were sterilized in ethylene oxide vapor. Thirty days after the implantation of PLA matrices, local biocompatibility according to GOST ISO 10993-6-2011, cellular parameters (total leukocyte count, hemogram, erythrocyte count, hemoglobin concentration), and biochemical blood parameters (lactate concentration, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels) were studied, and a standard histologic evaluation of the liver was performed.

Results. PLA matrix samples were mild local irritants on a scale of 1–1.9 points according to GOST ISO 10993-6-2011 criteria 30 days after the subcutaneous implantation. The median density of distribution of multinucleated giant cells (MNGCs) in the connective tissue around and in PLA matrices was 1,500 (1,350; 1,550) per 1 mm^2 of a slice. Pronounced leukocytic reaction due to lymphocytosis was noted (an increase by 1.7 times compared with a sham-operated (SO) control group, $p < 0.02$). The absence of a significant neutrophil count in the blood revealed sterile inflammation proceeding in the subcutaneous tissue around the PLA materials. Normalization of hepatic cytolysis markers (ALT and AST activity) in the blood without pronounced changes in the structure of the liver and the number of binuclear hepatocytes was noted. These markers were increased in SO controls (ALT up to 123% and AST up to 142%, $p < 0.001$ compared with values in the intact group).

Conclusion. Nonwoven PLA matrices are biocompatible with subcutaneous tissue, undergo bioresorption by MNGCs, and have a distant protective effect on the functional state of the liver in laboratory animals. Hypotheses on the detected systemic effect during subcutaneous implantation of PLA matrices were discussed; however, specific mechanisms require further study.

Keywords: nonwoven PLA matrix, rats, blood serum, alanine transaminase, aspartate transaminase, blood cells, binuclear hepatocytes

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious or potential conflict of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was supported by Siberian State Medical University development program “Priority 2030”.

Conformity to the principles of ethics. The study was approved by the local Ethics Committee at Siberian State Medical University (Protocol No. 7693/1 of 30.09.2019).

For citation: Ivanova E.A., Dzyuman A.N., Dvornichenko M.V. Local biocompatibility and biochemical profile of hepatic cytolysis in subcutaneous implantation of polylactide matrices. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(4):63–71. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-63-71>

ВВЕДЕНИЕ

Полимолекулярная кислота (полилактид, polylactic acid), PLA) является одним из синтетических биодеградируемых полимеров, состоящих из аналогов природных мономеров и активно используемых в различных приложениях тканевой инженерии [1] в качестве имплантатов [2], а также в виде матриц для доставки лекарств и клеток [3].

PLA материалы разрешены к клиническому применению. Развитая поверхность нетканых волокнистых матриц позволяет использовать различные способы загрузки и высвобождения существенных концентраций лекарственных средств и биологических молекул [4]. Тем не менее накопление лактата, зависящее от скорости деградации PLA имплантата, может провоцировать локальное воспаление и (или) системную токсичность [5].

Электроспиннинг является динамично развивающейся технологией получения нетканых волокнистых скаффолдов, состоящих из наноразмерных (диаметром 5 нм – 1 мкм) взаимосвязанных волокон, образующих микроразмерные (~100 мкм) поры, связанные между собой [6, 7]. С одной стороны, их архитектура позволяет воспроизводить в определенной степени структуру природного внеклеточного матрикса разных биологических тканей. С другой стороны, большая площадь поверхности при низкой плотности [6] способствует усиленной биодеградации волокнистых PLA материалов [8] с выделением высоких доз молочной кислоты, что может приводить к нежелательным побочным эффектам, маскирующим или нивелирующим терапевтическое действие иммобилизованных на имплантате клеток, лекарственных и биологических молекул.

В связи с этим целью исследования было изучение местной биосовместимости и системных эффектов нетканых PLA матриксов на показатели крови и печени после подкожной имплантации крысам стока Wistar.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальное исследование проведено *in vivo* на 20 половозрелых белых самцах крыс стока Wistar массой 280–300 г, содержащихся в стандартных условиях вивария, на базе лаборатории биологических моделей СибГМУ (г. Томск) на обычном пищевом рационе. Животные содержались в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

В качестве тестируемых изделий использовали нетканые полилактидные (PLA) матриксы (10 × 10 мм², толщина не более 0,5 мм; средний диаметр волокон в матриксе ~1 мкм), полученные в Томском политехническом университете методом электроспиннинга (как описано ранее) [8]. Исходным сырьем служил поли(DL-лактид) PURASORB компании Corbion (Нидерланды). Стерилизацию нетканых PLA матриксов проводили в парах 100%-го этиленоксида при 37 °C в течение 9 ч в газовом стерилизаторе 3M Steri-Vac Sterilizer/Aerator (3M, США) согласно рекомендациям ГОСТ ISO 11135-2017 (Стерилизация медицинской продукции. Этиленоксид. Требования к разработке, валидации и текущему управлению процессом стерилизации).

Под CO₂-наркозом 10 крысам подкожно (в область живота) вводили по одному матриксу через срединный кожный разрез и сформированный боковой подкожный карман (как описано ранее) [9].

После размещения образцов в подкожном кармане на кожу животных накладывали узловые швы атравматичным шовным материалом, нитью 4.0. Кожа вокруг швов обрабатывалась антисептиком. Контролем служили 10 ложнооперированных (ЛЮ) крыс, которым выполняли срединный разрез кожи, подкожно вводили пинцет, формировали боковой карман и зашивали рану без введения изделий. Биохимические анализы крови определяли также у 10 интактных животных.

После окончания срока исследования (30 сут после имплантации) выведение животных из эксперимента выполняли при помощи ингаляции углекислым газом с соблюдением правил и норм Европейского общества (86/609/ЕЕС), Хельсинкской декларации и приказов Министерства здравоохранения СССР (№ 742 от 13.11.1984 и № 48 от 23.01.1985).

У декапитированных животных собирали кровь для получения сыворотки в пробирки Vacuette (BD Diagnostics, США), определяли концентрацию лактата, активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) с применением наборов к биохимическому анализатору Rendom Access A-25 (BioSystems S.A., Испания) согласно инструкциям фирмы-производителя. Показатели крови (общее количество лейкоцитов (ОКЛ), гемограмма, число эритроцитов, гемоглобин) изучали с помощью стандартных гематологических методов [10].

В соответствии с рекомендациями ГОСТ ISO 10993-6-2011 (Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследования местного действия после имплантации) макроскопически оценивали локальную тканевую реакцию (местную биосовместимость *in vivo*) мягких тканей подкожной клетчатки, окружающих зону имплантации: наличие или отсутствие признаков воспаления (альтерация, экссудация, пролиферация), васкуляризации (гиперемии) сосудов рецепиентного ложа и инкапсуляции образцов. Результаты полуколичественной макроскопической оценки локальной реакции на PLA матриксы фиксировали по следующей шкале (в баллах): образцы не имеют раздражающего действия (0–0,9 балла); легкие раздражители (1–1,9 балла); умеренные раздражители (2–2,9 балла); тяжелые раздражители (3–4 балла).

Для проведения микроскопического анализа имплантаты с окружающими тканями аккуратно извлекали из подкожного кармана; после вскрытия брюшной полости у животных забирали часть печени для гистологической оценки ее состояния после подкожной имплантации PLA матриксов. Анализируемые фрагменты фиксировали в 10%-м нейтральном формалине. Обезжизвование проводили в восьми сменах

дегидратирующего раствора на основе изопропанола (IsoPrep, БиоВитрум, Россия) по схеме производителя. Заливали объекты исследования в парафиновую среду ГИСТОМИКС (БиоВитрум, Россия), на микротоме готовили тонкие (5–7 мкм) срезы перпендикулярно поверхности тканевых пластинок и исследуемых образцов.

Смонтированные на предметных стеклах срезы окрашивали гематоксилином Джилла (БиоВитрум, Россия) и эозином для гистологических исследований в стандартных условиях. С каждого тканевого образца было получено, окрашено и исследовано по 10 серийных срезов. Микропрепараты изучали в проходящем свете с помощью микроскопа Zeiss Axio Observer A1 (Германия) с различным увеличением (40–400). Цифровые изображения окрашенных гистологических срезов получали с помощью аппаратно-программного комплекса AxioVision 4.8 (Zeiss, Германия). В 10 случайно выбранных полях зрения на каждом гистологическом препарате определяли интенсивность клеточной резорбции PLA матриц (по числу гигантских многоядерных клеток инородных тел (ГМКИТ)); оценивали активность регенераторных процессов в печени (по числу двуядерных гепатоцитов) при помощи компьютерной морфометрии срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, как описано [11].

При оценке полученных данных были использованы методы статистического описания, а также методы проверки статистических гипотез, использующиеся в стандартных пакетах программы Statistica (версия 13.3). Для анализа имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (критерий Шапиро – Уилка). Вследствие отличия распределения признаков от нормального результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха $Me (Q_1; Q_3)$. Для оценки статистических различий выборок применяли непараметрический критерий Манна – Уитни. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Имплантаты помимо выполнения своей основной функции способны активировать местные регенераторные процессы, вызывать системную реакцию организма, опосредованную через систему крови. При этом биodeградируемые изделия, например полилактиды, способны влиять на организм не только за счет свойств своей поверхности, но и продуктов биodeградации и биорезорбции [5]. Исследование локальной биосовместимости PLA матриц показало, что через 30 сут после подкожного введения тестиру-

емых образцов не отмечалось макроскопических признаков воспаления (альтерация, экссудация) тканей, окружающих имплантаты (рис. 1). Выраженность кровенаполнения (гиперемии) кровеносных сосудов реципиентного ложа и инкапсуляции (реакция пролиферации клеток) образцов в исследуемых группах соответствовала, преимущественно, отсутствию реакции (0 баллов), слабой (1 балл) реакции, в редких случаях (при инкапсуляции) – умеренной реакции (2 балла) (табл. 1). Таким образом, исследуемые образцы PLA матрикса являлись легкими раздражителями в шкале 1–1,9 балла согласно критериям ГОСТ ISO 10993-6-2011.

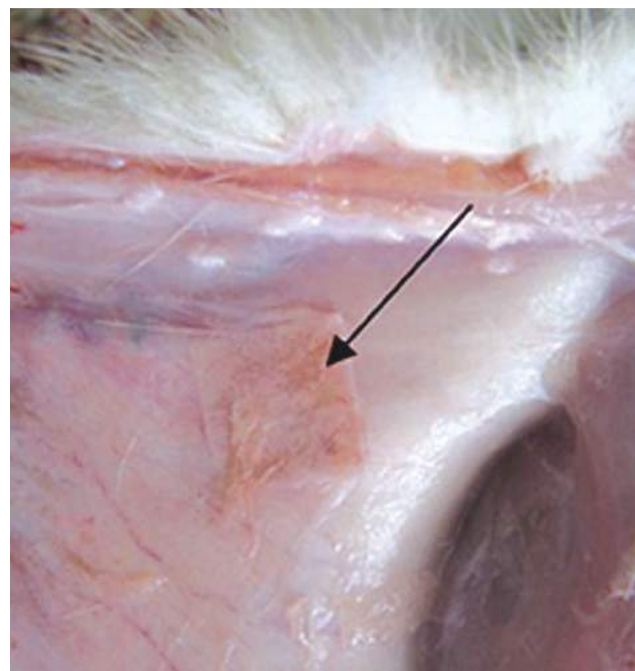


Рис. 1. Состояние тканей, окружающих PLA матрикс в подкожном подкожном кармане, у крыс через 30 сут после имплантации

Таблица 1

Макроскопические признаки изменений в тканях, окружающих PLA матрикс, через 30 сут подкожной имплантации крысам Wistar, баллы, $Me (Q_1; Q_3)$			
Группы исследования	Воспаление	Гиперемия вокруг образца (послеоперационного рубца)	Инкапсуляция матрикса
Ложная операция, $n = 10$	0 (0; 0)	0 (0; 1)	–
Имплантация PLA матрикса, $n = 10$	0 (0; 0)	1 (1; 1,5)	1,5 (1; 1,5)

При изучении микроскопических изменений выявлено наличие хорошо сформированной соединительнотканной капсулы вокруг имплантатов (рис. 2). В капсуле хорошо идентифицировались два

слоя: тонкий (толщина не более 50 мкм) внутренний, контактирующий с PLA матриксом, образованный плотной волокнистой соединительной тканью. Инкапсуляция тонким слоем соединительной ткани характерна для относительно биоинертных искусственных материалов [5]. Тонкие пучки коллагеновых волокон располагались параллельно поверхности имплантата и врастали в структуру имплантатов, преимущественно с торца тестируемых изделий.

Второй слой капсулы располагался снаружи от предыдущего, непосредственно контактировал с окружающими тканями и был образован рыхлой неоформленной соединительной тканью с микрососудами. Пучки коллагеновых волокон расходились в разных направлениях независимо от поверхности имплантата, между ними встречались как фибробласты, так и воспалительные клетки (полиморфноядерные лейкоциты, лимфоциты и макрофаги).

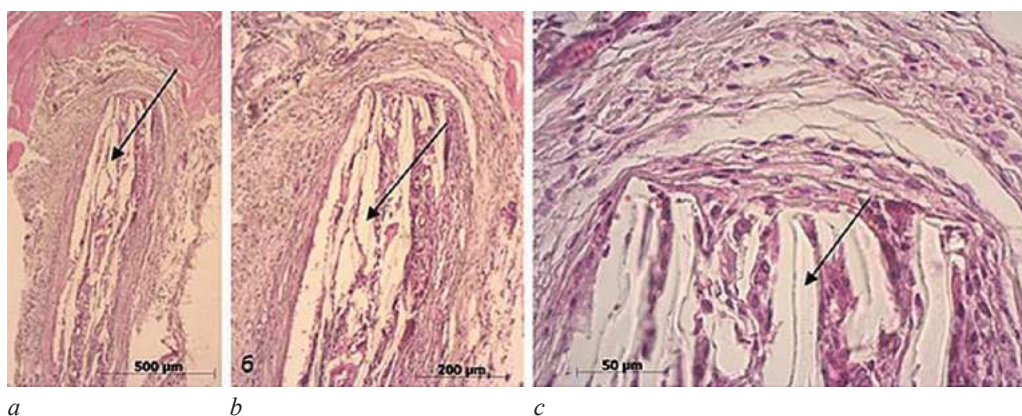


Рис. 2. Состояние соединительнотканной капсулы вокруг и в структуре PLA скаффолда при различном увеличении: *a* – 50, *b* – 100, *c* – 400. Окраска гематоксилином и эозином; стрелками указано прозрачное вещество полимерного скаффолда

Клеточный состав соединительной ткани (рис. 3) представлен, в частности, ГМКИТ. Они часто обнаруживались внутри полости имплантата и располагались одиночно (рис. 3, *a*) либо небольшими скоплениями до трех клеток (рис. 3, *b*). Согласно данным компьютерной морфометрии, медианная плотность распределения ГМКИТ в соединительной ткани вокруг и в структуре PLA матриксов составила 1 500 (1 350; 1 550) на 1 мм² среза. Образование и накопление ГМКИТ в месте введения имплантатов с высо-

ким соотношением площади поверхности к объему является типичной реакцией организма-хозяина и свидетельствует об активной клеточной резорбции вещества матриксов [5].

Между пучками коллагеновых волокон располагались фиброциты и фибробласты (рис. 3, *c*), а также мононуклеарные (лимфоциты, макрофаги) и полиморфноядерные лейкоциты (ПЯЛ), которые обнаруживались преимущественно диффузно, но формировали скопления вблизи ГМКИТ (рис. 3, *a*, *b*).

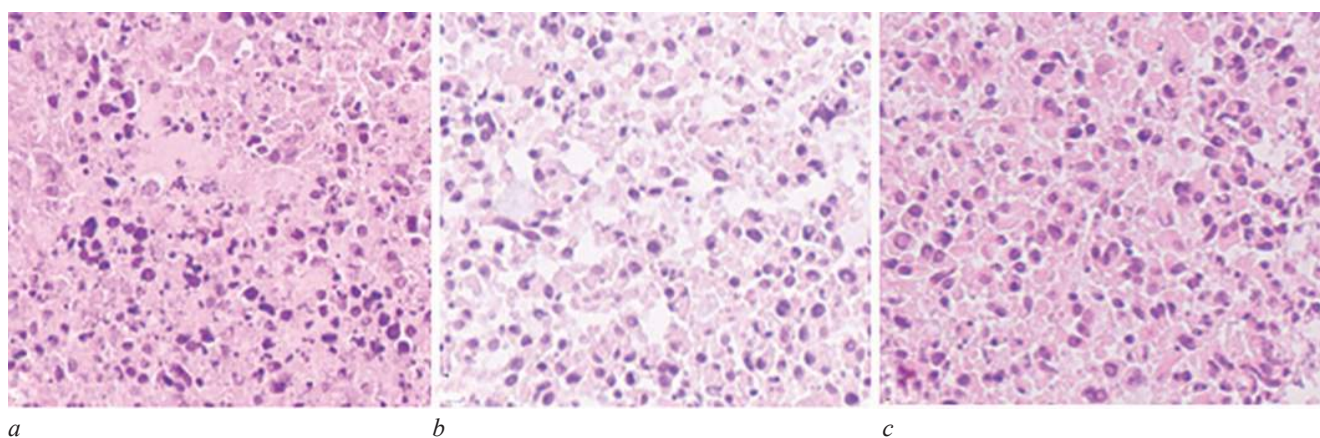


Рис. 3. Тканевая реакция на PLA матрикс через 30 сут после подкожной имплантации крысам Wistar: *a*, *b* – мононуклеарные и полиморфноядерные лейкоциты, гигантские многоядерные клетки инородных тел (отмечены стрелками); *c* – фибробласты между полимерными волокнами имплантата; окраска гематоксилином и эозином

Таким образом, местная реакция на PLA матриксы через 30 сут после подкожной имплантации крысам отражает, по-видимому, переход острого в хроническое продуктивное воспаление со сменой лейкоцитов, инфильтрирующих зону повреждения, с ПЯЛ на мононуклеарные формы. После катаболической фазы, способствующей санации очага воспаления, активируются анаболические процессы [12], обусловленные переключением секреции провоспалительных цитокинов на противовоспалительные (регенераторные) факторы [13–15].

С одной стороны, образование и накопление ГМКИТ в месте имплантации свидетельствует о выраженной клеточной резорбции PLA матриксов. При этом они имеют первостепенное значение в развитии местной гранулематозной воспалительной реакции на имплантат, опосредованной, прежде всего, через секретлируемый ими фактор некроза опухоли TNF α [5]. TNF α является системным цитокином, индуцирующим экспрессию рецепторов к эпидермальному фактору роста (ЭФР) [16], активирующим продукцию соматотропного гормона (СТГ) клетками аденогипофиза [17]. В свою очередь, ЭФР и СТГ оказывают анаболический эффект, усиливают регенераторные процессы в органах и тканях [18, 19].

С другой стороны, утилизация полимерной матрицы сопровождается высвобождением молочной кислоты, которая может оказывать системное влияние на организм. Наряду с почками, печень является органом-мишенью для лактата, циркулирующего в кровотоке [20]. Поэтому оценка биохимических индексов крови активно применяется для определения биологической безопасности продуктов биодеградации полимерных скаффолдов, а также функциональной активности печени.

В случае массивной биодеградации полимолочная основа тестируемых материалов могла привести к росту в крови животных содержания мономеров лактата. Однако через 30 сут после имплантации статистически значимые изменения концентрации молочной кислоты в крови не наблюдались (см. табл. 1). Активное пятикратное увеличение *in vitro* растворения тестируемых PLA матриксов отмечалось к 35-м сут иммерсии в питательную среду [8]. Клеточная резорбция имплантата может ускорить его разрушение *in vivo*, однако плотность распределения ГМКИТ в волокнистой матрице была незначительной (см. рис. 3). В совокупности опосредованный через дистантные (стресс-реализующие) регуляторные системы организма путь влияния имплантатов и продуктов их биодеструкции на функцию печени нельзя исключить.

Известно, что подкожная имплантация вызывает у животных стресс-реакцию [21], которая реализуется через локальные (клеточное микроокружение) и дистантные системы жизнеобеспечения организма [19]. В нашем исследовании активность АСТ и АЛТ в крови интактных крыс Wistar (табл. 2) была близка к таковым в других вивариях [22]. Ложная операция через 30 сут после хирургической манипуляции сопровождалась увеличением в сыворотке крови (в сравнении со значениями у интактных животных) активности АЛТ (до 123%) и АСТ (до 142%, $p < 0,001$). Данные функциональные пробы позволяют предполагать повреждение паренхимы печени [23], вызванное послеоперационным стрессом. В то же время подкожное введение PLA матрикса приводило к нормализации (практически до исходного уровня) маркеров цитолиза гепатоцитов, что свидетельствует в пользу дистантного гепатопротекторного эффекта PLA материала при оперативном вмешательстве (см. табл. 2).

Таблица 2

Биохимические показатели крови у крыс Wistar через 30 сут после подкожной имплантации PLA матриксов, Me (Q_1 ; Q_3)			
Группа	Лактат, мМ	АЛТ, Ед/л	АСТ, Ед/л
Интактные животные, $n = 10$	–	67,14 (60,47; 69,59)	185,14 (174,16; 216,07)
Ложная операция, $n = 10$	4,93 (4,5; 5,71)	82,58* (75,61; 84,36) $p < 0,001$	262,90* (246,60; 304,60) $p < 0,001$
Имплантация PLA матрикса, $n = 10$	4,28 (3,50; 5,40)	67,34# (65,61; 72,95) $p < 0,003$	225,10# (209,10; 250,0) $p < 0,02$

* с исходным уровнем (интактные животные); # с ложнооперированными крысами.

В соответствии с полученными функциональными изменениями следующим вопросом являлось влияние PLA матриц на структуру печени, поскольку подкожная имплантация скаффолдов может приводить к стимуляции регенерации гепатоцитов [24]. Одним из принципиальных показателей регенерации печени является количество (доля) двуядерных гепатоцитов (делящихся и неделящихся). Медленные подпороговые потери гепатоцитов не компенсируются организмом, когда процесс достигает «критического числа» (для печени это число составляет 10% работающих гепатоцитов), что приводит к необратимым процессам и гибели организма вследствие печеночной недостаточности [25].

При исследовании гистологических препаратов печени ложнооперированных крыс наблюдалась умеренная гиперемия центральных вен и синусоидных капилляров, балочное строение и архитектура классических печеночных долек сохранены. Подкожная имплантация PLA матриксов не вызвала видимых деструктивных изменений со стороны печени к 30-м сут наблюдения (рис. 4). Однако увеличение числа двуядерных гепатоцитов (см. рис. 4) не достигало статистических различий в сравнении с ЛО контролем (см. табл. 2).

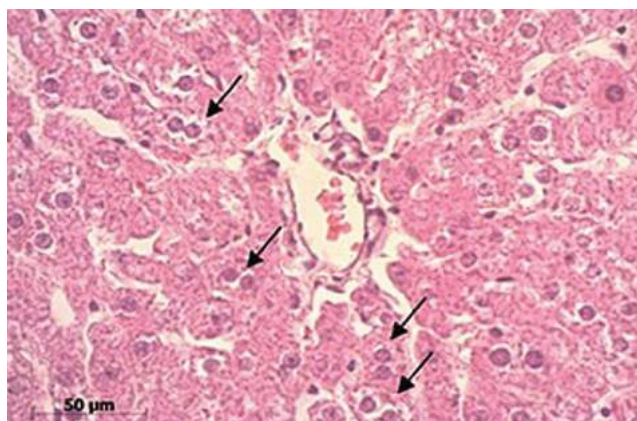


Рис. 4. Гистологическая картина печени крыс Wistar на 30-е сут после подкожной имплантации PLA матрикса: окраска гематоксилином и эозином; стрелками указаны двуядерные гепатоциты

Согласно полученным данным, подкожная имплантация PLA матриксов оказывает функциональный гепатопротекторный эффект к 30-м сут после введения лабораторным крысам. Механизмы уста-

новленного феномена не ясны, но имеют, скорее всего, комплексный характер. Могут иметь значение постоперационные репаративные процессы в подкожной жировой клетчатке, приводящие к поступлению в кровь ЭФР и других ростовых факторов, активирующих регенерацию печени [26]. Кроме того, лактат, выделяющийся при деградации PLA матриксов, способен оказывать регуляторный эффект на миграцию и активность Т-лимфоцитов [27, 28], которые являются активными участниками и клетками-дирижерами пролиферативного воспаления и последующих регенераторных процессов в паренхиматозных органах [29].

Действительно, после подкожного введения PLA матриксов установлена выраженная лейкоцитарная реакция крови, обусловленная увеличением (в 1,7 раза по сравнению с ЛО контролем, $p < 0,02$) содержания лимфоцитов (см. табл. 3). Отсутствие значительного нейтрофилиза крови свидетельствовало об асептическом характере воспаления, протекающего в подкожной клетчатке вокруг PLA материалов.

Таблица 2

Плотность распределения двуядерных гепатоцитов у крыс Wistar через 30 сут после подкожной имплантации PLA матриксов, $Me (Q_1; Q_3)$	
Группа	Количество двуядерных клеток на 1 мм ²
Ложная операция, $n = 10$	4600 (4450; 4800) $n_1 = 100$
Имплантация PLA матрикса, $n = 10$	5300 (4700; 5500) $n_1 = 100$

Примечание. Количество подсчитанных полей зрения – n_1 .

Таблица 3

Гемограмма (10 ⁹ /л), число эритроцитов и концентрация гемоглобина в крови крыс Wistar через 30 сут после подкожной имплантации PLA матриксов, $Me (Q_1; Q_3)$						
Группа	Общее количество лейкоцитов	Лимфоциты	Моноциты	Нейтрофилы	Эритроциты, 10 ¹² /л	Гемоглобин, г/л
Ложная операция, $n = 10$	6,4 (4,6; 9,2)	3,6 (2,8; 6,1)	0,5 (0,2; 0,7)	2,5 (1,2; 2,8)	9,41 (7,93; 9,52)	146 (123; 147)
Имплантация PLA матрикса, $n = 10$	8,7 (6,7; 13,3)	6,1* (5,2; 9,0) $p < 0,02$	0,4 (0,3; 0,6)	2,2 (1,3; 3,4)	9,43 (7,92; 9,94)	150 (148; 154)

* статистические различия согласно критерию Манна – Уитни.

Системный эффект PLA матриксов на биохимические маркеры цитолиза гепатоцитов во многом совпадает с влиянием подкожного введения имплантатов гиалуроновой кислоты здоровым женщинам при косметологических процедурах [30]. Однотипное действие на кровь различных по своей химической природе веществ, находящихся под кожей, предполагает, помимо специфического влияния мономеров (молочная или глюконовая кислота), неспецифический механизм их отдаленных эффектов. Он может

быть обусловлен запуском контролируемого, вяло текущего локального продуктивного воспаления, активизирующего компенсаторно-приспособительные и адаптационные реакции организма-хозяина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биодеградируемые скаффолды на основе PLA и сополимеров имеют фундаментальный и клинический интерес для биоинженерии мягких и твердых тканей [31, 32], включая печень [33], перспективны

как носители стволовых клеток [34], а также как средства доставки и высвобождения лекарств и биологических молекул [35].

Согласно полученным экспериментальным результатам, биорезорбируемые нетканые PLA матрицы биосовместимы с подкожной клетчаткой и обладают дистантным протекторным действием в отношении функционального состояния печени лабораторных животных. Они могут найти свое применение в качестве клеточных носителей, в том числе при коррекции цитостатических или лучевых поражений и хронических заболеваний печени. Однако конкретные механизмы выявленного эффекта подкожной имплантации PLA матриц на гепатоциты требуют дальнейшего изучения.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Jafari M., Paknejad Z., Rad M.R., Motamedian S.R., Eghbal M.J., Nadjmi N. et al. Polymeric scaffolds in tissue engineering: a literature review. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2017;105(2):431–459. DOI: 10.1002/jbm.b.33547.
- Jukkala-Partio K., Laitinen O., Vasenius J., Partio E.K., Toivonen T., Tervahartiala P. et al. Healing of subcapital femoral osteotomies fixed with self-reinforced poly-L-lactide screws: an experimental long-term study in sheep. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 2002;122(6):360–364. DOI: 10.1007/s00402-001-0379-y.
- Zhou J., Han S., Dou Y., Lu J., Wang C., He H. et al. Nanostructured poly(L-lactide) matrix as novel platform for drug delivery. *Int. J. Pharm.* 2013;448(1):175–188. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.03.038.
- Wulf K., Arbeiter D., Matschegewski C., Teske M., Huling J., Schmitz K.P. et al. Smart releasing electrospun nanofibers-poly: L. lactide fibers as dual drug delivery system for biomedical application. *Biomed. Mater.* 2020;16(1):015022. DOI: 10.1088/1748-605X/abbec8.
- Biomaterials science: an introduction to materials in medicine; 2nd ed.; ed. by B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons. San Diego: Elsevier Academic Press; 2004:851.
- Do A.V., Khorsand B., Geary S.M., Salem A.K. 3D printing of scaffolds for tissue regeneration applications. *Adv. Healthc. Mater.* 2015;4(12):1742–1762. DOI: 10.1002/adhm.201500168.
- Daristotle J.L., Behrens A.M., Sandler A.D., Kofinas P.A. Review of the Fundamental Principles and Applications of Solution Blow Spinning. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2016;8(51):34951–34963. DOI: 10.1021/acsami.6b12994.
- Tverdokhlebov S.I., Stankevich K.S., Bolbasov E.N., Khlusov I.A., Kulagina I.V., Zaytsev K.V. Nonwoven polylactide scaffolds obtained by solution blow spinning and the *in vitro* degradation dynamics. *Advanced Materials Research.* 2014;872:257–263.
- Bolbasov E.N., Popkov A.V., Popkov D.A., Gorbach E.N., Khlusov I.A., Golovkin A.S. et al. Osteoinductive composite coatings for flexible intramedullary nails. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2017;75:207–220. DOI: 10.1016/j.msec.2017.02.073.
- Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник; под ред. В.В. Меньшикова. М.: 1987:368.
- Автандилов Г.Г. Диагностическая медицинская плоидометрия. М.: Медицина; 2006:192.
- Clark D., Nakamura M., Miclau T., Marcucio R. Effects of aging on fracture healing. *Curr. Osteoporos. Rep.* 2017;15(6):601–608. DOI: 10.1007/s11914-017-0413-9.
- Loi F., Córdova L.A., Pajarinen J., Lin T.H., Yao Z., Goodman S.B. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone.* 2016;86:119–130. DOI: 10.1016/j.bone.2016.02.020.
- Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Норкин И.К., Иванов П.А., Хлусов И.А. и др. Клеточно-молекулярные аспекты воспаления, ангиогенеза и остеогенеза. Краткий обзор. *Цитология.* 2020;62(5):305–315. DOI: 10.31857/S0041377120050090.
- ElHawary H., Baradaran A., Abi-Rafeh J., Vorstenbosch J., Xu L., Efanov J.I. Bone healing and inflammation: Principles of fracture and repair. *Semin. Plast. Surg.* 2021;35(3):198–203. DOI: 10.1055/s-0041-1732334.
- Файерс У. Биологические методы лечения фактором некроза опухолей: преклинические исследования. В кн. Биологические методы лечения онкологических заболеваний: пер. с англ.; под ред. В.Т. ДеВита, С. Хеллмана, С.А. Розенберга. М.: Медицина; 2002:309–343.
- Milenkovic L., Rettori V., Snyder G.D., Beutler B., McCann S.M. Cachectin alters anterior pituitary hormone release by a direct action *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1989;86(7):2418–2422. DOI: 10.1073/pnas.86.7.2418.
- Гормонотерапия: пер. с нем.; под ред. Х. Шамбаха, Г. Кнаппе, В. Карола. М.: Медицина, 1988:416.
- Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Удут В.В., Наумов С.А., Хлусов И.А. Закономерности структурной организации систем жизнеобеспечения в норме и при развитии патологического процесса. Томск, 1996:283.
- Yang W.H., Park H., Grau M., Heine O. Decreased blood glucose and lactate: Is a useful indicator of recovery ability in athletes? *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2020;17(15):5470. DOI: 10.3390/ijerph17155470.
- Selye H., Lemire Y., Bajusz E. Induction of bone, cartilage and hemopoietic tissue by subcutaneously implanted tissue diaphragms. *Wilhelm Roux Arch. Entwickl. Mech. Org.* 1960;151(5):572–585. DOI: 10.1007/BF00577813.
- Войтенко Н.Г., Макарова М.Н., Зуева А.А. Вариабельность биохимических показателей крови и установление референсных интервалов в доклинических исследованиях. Сообщение 1: крысы. *Лабораторные животные для научных исследований.* 2020;(1):47–53. DOI: 10.29296/2618723X-2020-01-06.
- Лифшиц В.М., Сидельникова В.И. Биохимические анализы в клинике: справочник. М.: МИА; 1998:303.
- Хлусов И.А., Хлусова М.Ю. Способ дистантной стимуляции регенерации гепатоцитов: Патент РФ на изобретение № 2590859 от 15.06.2016 (опубликовано 10.07.2016, Бюл. № 19).
- Северин М.В., Юшков Б.Г., Ястребов А.П. Регенерация тканей при экстремальных воздействиях на организм. Екатеринбург: УрГМИ, 1993:187.

26. Бадер А. Способ регенерации ткани: Патент РФ на изобретение № 2392314 от 20.06.2010.
27. Haas R., Smith J., Rocher-Ros V., Nadkarni S., Montero-Melendez T., D'Acquisto F. et al. Lactate regulates metabolic and pro-inflammatory circuits in control of T cell migration and effector functions. *PLoS Biol.* 2015;13(7):e1002202. DOI: 10.1371/journal.pbio.1002202.
28. Pucino V., Bombardieri M., Pitzalis C., Mauro C. Lactate at the crossroads of metabolism, inflammation, and autoimmunity. *Eur. J. Immunol.* 2017;47(1):14–21. DOI: 10.1002/eji.201646477.
29. Бабаева А.Г. Регенерация и система иммуногенеза. М.: Медицина; 1985:256.
30. Хлусов И.А., Игумнов В.А., Чухнова Д.Л., Митасова О.Л., Зайцев К.В., Абдуллина Н.Г. и др. Локальные и системные эффекты имплантатов гиалуроновой кислоты при коррекции возрастных изменений кожи. *Бюллетень сибирской медицины.* 2013;12(1):61–68.
31. Grémare A., Guduric V., Bareille R., Heroguez V., Latour S., L'heureux N. et al. Characterization of printed PLA scaffolds for bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2018;106(4):887–894. DOI: 10.1002/jbm.a.36289.
32. Gangolphe L., Leon-Valdivieso C.Y., Nottelet B., Déjean S., Bethry A., Pinese C. et al. Electrospun microstructured PLA-based scaffolds featuring relevant anisotropic, mechanical and degradation characteristics for soft tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2021;129:112339. DOI: 10.1016/j.msec.2021.112339.
33. Wang M., Pei H., Zhang L., Guan L., Zhang R., Jia Y. et al. Hepatogenesis of adipose-derived stem cells on poly-lactide-co-glycolide scaffolds: in vitro and in vivo studies. *Tissue Eng. Part C Methods.* 2010;16(5):1041–1050. DOI: 10.1089/ten.TEC.2009.0244.
34. Diomedea F., Gugliandolo A., Cardelli P., Merciaro I., Ettore V., Traini T. et al. Three-dimensional printed PLA scaffold and human gingival stem cell-derived extracellular vesicles: A new tool for bone defect repair. *Stem. Cell Res. Ther.* 2018;9(1):104. DOI: 10.1186/s13287-018-0850-0.
35. Eğri S., Eczacıoğlu N. Sequential VEGF and BMP-2 releasing PLA-PEG-PLA scaffolds for bone tissue engineering: I. Design and in vitro tests. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2017;45(2):321–329. DOI: 10.3109/21691401.2016.1147454.

Вклад авторов

Дворниченко М.В. – концепция и дизайн исследования, написание текста. Иванова Е.А., Дзюман А.Н. – проведение исследования, сбор, перевод и обработка материала.

Информация об авторах

Иванова Екатерина Александровна – ст. преподаватель, кафедра анатомии человека с курсом топографической анатомии и оперативной хирургии; ассистент, лаборатория клеточных и микрофлюидных технологий, СибГМУ, г. Томск, <http://orcid.org/0000-0002-4119-7562>

Дзюман Анна Николаевна – канд. мед. наук, доцент кафедры морфологии и общей патологии, СибГМУ, г. Томск, <http://orcid.org/0000-0002-0795-0987>.

Дворниченко Марина Владимировна – д-р мед. наук, профессор кафедры анатомии человека с курсом топографической анатомии и оперативной хирургии; науч. сотрудник, лаборатория клеточных и микрофлюидных технологий, СибГМУ, г. Томск, dochic@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0001-9783-0817>

(✉) Дворниченко Марина Владимировна, dochic@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.02.2022;
одобрена после рецензирования 05.03.2022;
принята к публикации 09.06.2022