

БИОПЛАСТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ НА ОСНОВЕ КОМПОНЕНТОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

Р.Д. Якупова, И.Р. Гильмутдинова, П.С. Еремин, Е.Ю. Костромина

Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии, Москва, Россия

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время при разработке биопластических материалов, применяемых в качестве раневых покрытий, отдают предпочтение биополимерам (компонентам природного происхождения) и их производным. Так как раневое покрытие служит для восстановления, поддержания и улучшения функций тканей, ведется все больше работ по разработке материалов, максимально приближенных к коже по свойствам, структуре и функциональным характеристикам [1, 2]. Исходя из этого, особое внимание заслуживают такие продукты, как коллаген и гиалуроновая кислота – компоненты внеклеточного матрикса, принимающие активное участие в восстановлении поврежденных структур дермы [3]. Они обеспечивают механическую прочность, способствуют восстановлению исходных размеров, эластичность и регенерацию тканей [4]. Преимуществом таких компонентов является их способность расщепляться в живых средах на более простые соединения, которые не являются токсичными для клеток [2].

Имеется несколько основных требований, предъявляемых к раневым покрытиям [5,6]. Покрытия должны быть биосовместимыми и не должны вызывать токсичных, аллергических, канцерогенных реакций окружающих тканей. При контакте раневой поверхности с иммуногенным материалом развивается воспалительный процесс в окружающих тканях, приводящий к пролиферации фибробластов, которые продуцируют коллагеновые волокна и другие компоненты внеклеточного матрикса. Формируется соединительнотканная непроницаемая капсула, изолирующая рану от раневого покрытия и от окружающей среды [7,8].

Также биопластические материалы, используемые для разработки раневых покрытий, должны обладать определенной скоростью биodeградацией, требуемой для клинических случаев, с образованием биологически безопасных продуктов распада и постепенным замещением их естественными тканями. Очевидно, что необходимой предпосылкой реализации такого подхода является использование изначально нетоксичных компонентов. При этом скорость разрушения биоматериала не должна превышать скорость восстановления (регенерации) замещающих его тканей. При нарушении этого условия будут создаваться предпосылки замедления (прекращения) регенерации, или преждевременной потери функции покрытия [9].

Для создания оптимальной микросреды в зоне поражения раневое покрытие должно обладать рядом характеристик. Материал должен пропускать излишнюю влагу, но в то же время сохранять оптимальную влажность, чтобы предотвратить пересушивание поврежденной поверхности, так как при скапливании раневого экссудата происходит мацерация кожи и разрыхление эпидермиса. Если до краевой и островковой эпителизации будет достаточна умеренная гипоксия раневой среды, то для полного заживления необходима насыщенная кислородом среда, поэтому раневое покрытие должно обеспечить проницаемость для кислорода [10].

Плотно прилегающая поверхность может напрямую воздействовать на клеточный ответ и, как следствие, на регенерацию тканей. Идеальное раневое покрытие должно быть эластичным и полностью моделировать даже сложные раневые поверхности для равномерного распределения кислорода, влаги и активных веществ [11].

Цель работы – исследовать новый биопластический материал на основе растворимой формы компонентов внеклеточного матрикса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе исследовали биопластический материал, состоящий из 70 % коллагена, 29 % гиалуроновой кислоты и 1 % эластина. Материал был стабилизирован с помощью фотохимической сшивки (ультрафиолетовое излучение, $\lambda < 230$ нм, расстояние от источника до биоматериала – 30 см).

Для подготовки биоматериала к исследованиям отмеряли равные по размеру образцы ($1 \times 1 \text{ см}^2$) и оставляли их в растворе хлоргексидина биглюконата 0,05 % на 1 сут при температуре 4°C .

Для равномерного распределения жидкости внутри пор материал дегазировали с помощью вакуумного насоса. Для предотвращения закисления ростовой среды в экспериментах образцы перемещали в культуральную среду DMEM на 2 – 3 ч, затем взвешивали.

При исследованиях стабильности биопластического материала образцы промокали сухой бумажной стерильной салфеткой для удаления излишней жидкости, помещали в чашки Петри известной массы и взвешивали на аналитических весах. Далее образцы помещали в чистую ростовую культуральную среду и оставляли в термостате при температуре 37°C до 15 сут. Каждые 24 ч образцы взвешивали и рассчитывали потерю массы в процентах.

Для оценки цитотоксичности раневого покрытия клетки на 3 пассаже пассировали на чашки Петри из расчета 15×10^3 клеток на 1 см^2 и культивировали клетки до образования 50 % монослоя. Далее на дно чашки Петри помещали подготовленные образцы материала размером $1 \times 1 \text{ см}^2$ и переносили обратно в CO_2 инкубатор. С помощью инвертированного микроскопа (Leica DM IL LED) в течение 10 сут ежедневно визуально оценивали целостность монослоя, форму, размеры клеток и структуру клеток.

Исследование биосовместимости осуществляли методом прямого контакта в культуральных чашках Петри диаметром 3,5 см. На дно чашек помещали подготовленные образцы материала размера $1 \times 1 \text{ см}^2$, а затем на него высевали суспензию клеток фибробластов в 0,5 мл культуральной среды, формируя на поверхности биоматериала каплю. Через 30 мин доливали 1,5 мл культуральной среды. Посевная доза составляла 25×10^3 клеток/ см^2 . Чашки Петри с образцами оставляли в CO_2 инкубаторе (5 % CO_2 , 37°C). С помощью инвертированного фазово – контрастного микроскопа ежедневно визуально оценивали целостность монослоя, форму, размеры клеток и структуру клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Физические свойства биоматериала характеризуются стабильностью в течение более чем 10 сут. Находясь в культуральной среде в CO_2 термостате при 37°C материал деградирует постепенно, без фрагментарного распада образца (Рис. 1). В течение 5 сут масса раневого покрытия уменьшается на 15–20 %, а полная деградация происходит через 2 – 2,5 недели. В жидкости материал набухает и становится пластичным и эластичным, что позволит использовать раневое покрытие на поверхностях со сложным рельефом и подвижных участках кожи.

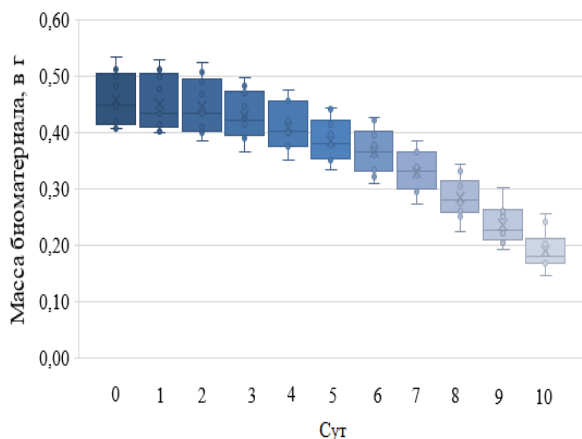


Рис. 1. График деградации биопластического материала

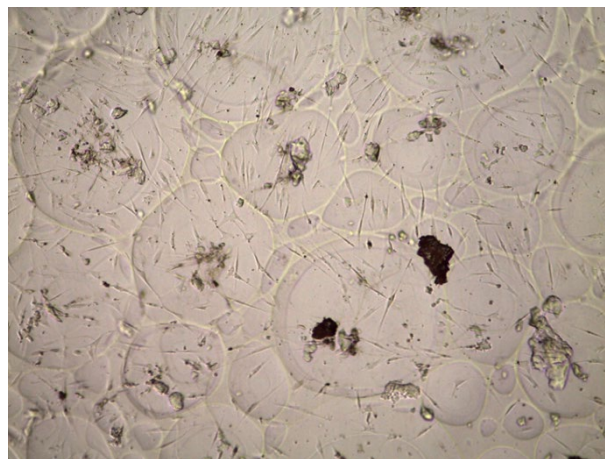


Рис. 2. Исследование раневого покрытия на цитотоксичность. 10 сутки культивирования. Световая микроскопия. Ув. $\times 50$

Совместное культивирование биопластического материала с культурой клеток фибробластов человека показало отсутствие какого-либо цитотоксического действия на культуру клеток. В чашку Петри с 50-ти % монослоем вносили подготовленный образец биоматериала. Через 24 ч совместного культивирования отмечалось отсутствие слущенных клеток. Фибробласты равномерно были распределены по дну культуральной чашки. Морфофункциональные свойства клеток были сохранены:

фибробласты имели веретеновидную форму, цитоплазма была гомогенная и прозрачная без каких-либо включений, границы определялись, отмечалось наличие 2–4 длинных отростков.

Ядра располагались в цитоплазме ближе к периферии (эксцентрично) с равномерным распределением хроматина. Соединение клеток осуществлялось с помощью отростков, что приводило к формированию равномерного монослоя. После 72 ч инкубации, в культуральной жидкости отсутствовали десквамированные клетки, кроме того, отмечалось, что в присутствии образцов материала, пролиферативная активность клеток была выше, чем в группе контроля (Рис. 2).

Для изучения биосовместимости материала культуру клеток фибробластов человека культивировали на матриксе в течение 14 сут. После переноса клеток на матрикс прикрепленные фибробласты были замечены уже через 4 – 6 ч, а через 24 ч после прикрепления были обнаружены делящиеся клетки. Подсчет количества клеток осуществляли на изображениях горизонтальных проекций серии оптических срезов матрикса известной толщины. В первые сутки количество прикрепленных клеток составляло 440 ± 84 клеток на мм^3 . На 5 сут культивирования количество клеток возросло до 776 ± 134 на мм^3 , а на 10 сут наблюдалось максимальное количество клеток – 2155 ± 335 на мм^3 .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данный материал обладает биосовместимостью и отсутствием цитотоксического влияния. Исходные компоненты, а именно коллаген, эластин и гиалуроновая кислота, являются продуктами природного происхождения, и при разложении материала не оказывают токсического влияния на клетки организма. Раневое покрытие деградирует равномерно и может быть использовано без перевязок в течение 1 недели. Стоит отметить, что при изменении ряда параметров при получении материала, скорость деградации можно контролировать.

Работа выполнена при финансовой поддержке фонда «УМНИК – 18 (в)» (договор № 14612ГУ/2019 от 23.07.2019)

ЛИТЕРАТУРА

1. Онищенко Н.А., Гулай Ю.С., Шагидулин М.Ю. Разработка имплантируемых клеточно- и тканеинженерных конструкций вспомогательной печени для лечения печёночной недостаточности // Гены и Клетки. 2015. Т. 10. № 1. С. 6–17;
2. Калюжная Л.И., Земляной Д.А., Товпеко Д.В. Анализ мирового опыта использования биоматериалов пуповины в тканевой инженерии и 3d-биопечати // Медицина и организация здравоохранения. 2019. Т. 4. № 1. С. 40–55;
3. Лившиц В.С. Полимерные покрытия на раны и ожоги (обзор) // Хим-фарм. Журнал. – 1998. – Т. 22, № 7. – С. 790–798;
4. Мелконян К.И., Бирюкова А.О., Улитина Н.Н. Компоненты внеклеточного матрикса в восстановлении поврежденных тканей: биохимические взаимодействия и протективный эффект // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. 2019. Т. 9. № 4. С. 55–62;
5. Мартюкова А.В., Куртукова М.О., Попрыга Д.В. Актуальные вопросы разработки матрицы для тканевой инженерии // Фундаментальные и научные исследования: теоретические и научные аспекты. 2017. Т. 2. № 1. С. 158–160;
6. Shtilman M.I., Mezhev Y.O. Implanted and unimplanted medical and biological polymers // Fibre Chemistry. 2016. Т. 48. № 3. Р. 249–252;
7. Севастьянов В.И. Сборник методических рекомендаций по оценке биосовместимых свойств искусственных материалов, контактирующих с кровью (под ред. Носковой Т.И., Новиковой С.П., Севастьянова В. И). Москва. 1990;
8. Щеблыкина А.В., Мищенко П.В., Кумейко В.В. Биосовместимые деградируемые материалы на основе пектинов для тканевой инженерии: местная реакция тканей при подкожной имплантации // Тихоокеанский медицинский журнал. 2013. № 2(52). С. 13–17;
9. Волкова И.М., Коровина Д.Г. Трёхмерные матриксы природного и синтетического происхождения для клеточной биотехнологии // Биотехнология. 2015. Т. 31. № 2. С. 8–26;
10. Хотимченко Ю.С., Щеблыкина А.В., Кумейко В.В. Биосовместимые матриксные имплантаты на основе природных и синтетических полимеров как перспективные средства для терапии дегенеративных и посттравматических заболеваний центральной нервной системы // Тихоокеанский медицинский журнал. 2012. № 2(48). С. 54–60;
11. Штильман М.И. Биоматериалы – важное направление биомедицинских технологий // Вестник РГМУ. 2016. № 5. С. 4–15;