

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕПАРАТИВНОГО ТКАНЕГЕЗА ПРИ
ИСПОЛЬЗОВАНИИ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ МАТРИКСОВ НА ОСНОВЕ
ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ**

**Свешников А.Н., Морозова Ю.С.
научный руководитель к. б. н. Бахарева О. П.
Сибирский Федеральный университет**

Современная биотехнология позволяет получать широкий спектр целевых продуктов различной природы, включая новые экологически чистые биоматериалы с высокими потребительскими свойствами. Наиболее актуальной областью применения биоматериалов является биомедицина, остро нуждающаяся в биосовместимых материалах для изготовления медицинского инструментария, систем депонирования и доставки лекарственных средств, эндопротезов, сорбентов, биоконструкторов органов и тканей [4]. Открытие полигидроксиалканоев (ПГА) - полимеров микробиологического происхождения, явилось значимым событием для биотехнологии новых материалов. ПГА - это линейные, термопластичные, биоразрушаемые и биосовместимые полимеры, сферы применения которых потенциально широки, включая восстановительную медицину, фармакологию, сельское и коммунальное хозяйство, радиоэлектронику и др.[3].

Новое и актуальное направление исследований ПГА ориентировано на решение задач для клеточной и тканевой инженерии. Многообещающей представляется перспектива использования этих полимеров для регенерации поврежденных кожных покровов и нервов, реконструкции дефектов мягких и костной тканей, кровеносных сосудов и клапанов сердца и др. [2]. Используемый в тканевой инженерии междисциплинарный подход направлен на создание биоматериалов и биоконструкций для восстановления утраченных функций отдельных тканей или органов в целом. Использование потенциала клеточных технологий в реконструктивных целях реализуется с использованием нескольких подходов. В одном из них суспензию клеток необходимого фенотипа, выросших *in vitro*, вводят в поврежденные ткани органов или в кровоток. В другом, технологически более сложном, клетки выращивают вне организма на матриксе (scaffold), и далее биоинженерную конструкцию или сформированную ткань имплантируют реципиентному организму. Успех второго направления зависит во многом от свойств каркасов (матрикс), используемых в качестве носителей клеток [3].

Все необходимые свойства матрикса определяются свойствами исходного материала и технологией его переработки. Для исследования ПГА в качестве ранозаживляющих покрытий мы использовали два вида матриксов, полученные принципиально разными методами: полимерные волокна, так как структура волокна схожа с коллагеном кожи, и полимерные пленки, так как это самый распространенный и простой тип раневых покрытий, используемых сегодня[4].

Исходя из выше сказанного, целью наших исследований явилось изучение влияния раневых покрытий на основе полигидроксиалканоев в виде пленок, полученных из растворов ПГА в хлороформе и в виде неориентированных ультратонких волокон, полученных методом электростатического формования (ЭСФ-матрикс) на эффективность репаративного тканегеоза[3].

Материалы и методы исследования.

Разработаны и исследованы два типа раневых покрытий: гладкие наливные пленки и нетканые матриксы, сформированные ультратонкими волокнами, полученные методом электростатического формования (ЭСФ). Двумерные матриксы в виде пленок получали методом полива разогретого до 35 С раствора ПГА на обезжиренную поверхность чашек Петри, предварительно нагретую до такой же температуры. Высушивали пленки в беспылевом боксе-ламинаре фирмы Labconco (США) при комнатной температуре в течение нескольких суток. Матриксы из ультратонких волокон получены методом электростатического формования (ЭСФ) из растворов полимеров различной плотности и различного химического состава на автоматической установке Nanop 01A (MECC Inc., Япония). Раствор полимера был помещён в пластиковый шприц с внутренним диаметром 13 мм. Скорость подачи раствора варьировали в диапазоне 6 мл/ч; напряжение – 25 кВ; расстояние между электродами – 15 см.

Микроструктуру полимерных изделий анализировали сканирующей электронной микроскопией с использованием микроскопа JEM-100С с растровой приставкой EM-ASID-4, Япония) и TM-3000 (Hitachi HT Corporation, Япония) при напряжении 5 кВ. Предварительно на образцы напыляли золото (10 мА, 40 сек) с помощью установки вакуумного напыления EmitechK575X (Великобритания).






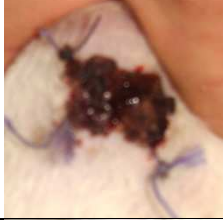
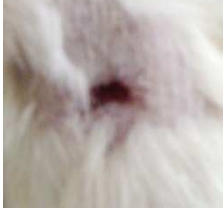

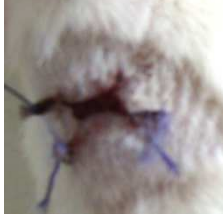
Эффективность полимерных матриксов исследовали на модельных дефектах кожи на самцах крыс с массой 200-280 г. Под ингаляционным наркозом севофлураном в асептических условиях у каждого животного иссекали фрагмент кожи, включая эпидермис и дерму, до подкожно-жировой клетчатки, размером 20×20 мм в межлопаточной области, предварительно состригая шерсть. Средний размер ран составил 4-4,5 см². В эксперименте участвовало 3 группы животных (n=8 в группе): 2 экспериментальные и контрольная. В контрольной группе животных раневая поверхность не изолировалась от внешней среды и заживление происходило под струпом, 2 экспериментальные группы животных наблюдались с использованием ЭСФ матриксов и использованием пленок. Матриксы закрепляли 4 швами и закрывали стерильной марлевой повязкой. В течение всего эксперимента ежедневно проводили планиметрию ран по методу Поповой [1] с фотодокументированием. Внешний вид состояния раневых дефектов кожи 3 групп животных в ходе эксперимента представлены в таблице 1.

Течения раневого процесса и динамику восстановления дефекта кожных покровов проводили планиметрией ран с определением площади раневого дефекта и вычисления скорости заживления. Изменение площади раневой поверхности определяли по методу Л. Н. Поповой с определением скорости заживления. Скорость заживления раневого процесса вычисляли по формуле:

$$V = \frac{(S_1 - S_2)}{t \times S_1} \times 100$$

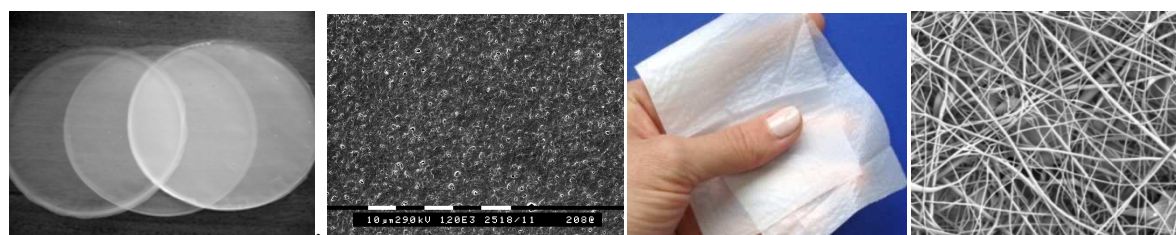
где: S_1 – величина площади при предшествующем измерении; S_2 – величина площади раны в настоящий момент; t – число дней между первым и последующим измерениями; V – скорость изменения параметров раны за сутки к ее первоначальному размеру.

Таб. 1. Фотографии модельных ран животных в ходе эксперимента на 1, 7 и 14 сутки.

Сутки	Контроль	Волокно	Пленка
1			
7			
14			

Результаты исследований и обсуждения.

Для получения пленок и ультратонких волокон были взяты образцы сополимера поли-3-гидроксибутират-со-4-гидроксибутират (ПЗГБ/4ГБ) с включением 4ГБ 10мол.%, синтезированные в лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза Института биофизики СО РАН со следующими характеристиками: средневесовая молекулярная масса (M_w) = 1100 кДа, среднечисловая (M_n) = 477 кДа, полидисперсность (ПД) = 2,32; степень кристалличности (Сх) 43 %. Фото разработанных раневых покрытий двух типов представлены на рис.2.



А)

Б)

Рис.2. А) Внешний вид раневого покрытия; Б) Микроструктура матриц, полученная с помощью электронного микроскопа (двумерные полимерные матрицы (пленка) сополимера П(ЗГБ/4ГБ) (слева); ультратонкое волокно сополимера П(ЗГБ/4ГБ) (справа)).

Исследования, проведенные с помощью СЭМ, показали отличия в микростроении раневых покрытий, изготовленных различными методами (рис. 1 в-г). Для наливных пленок, полученных из сополимера П(ЗГБ/4ГБ), характерно наличие округлых пор размером 1 мкм. Нетканые матрицы, образованные неориентированными ультратонкими волокнами, имели оформленные волокна со средним диаметром 1,7 мкм.

Поведение особей опытных и контрольной групп после выхода из наркоза не создавало впечатления о выраженном у них болевом синдроме. В ходе эксперимента все подопытные животные были активны, охотно потребляли пищу и самостоятельно передвигались, биохимические и гематологические показатели крови находились в пределах физиологической нормы, при анатомическом вскрытии не было выявлено патологических изменений внутренних органов.

Измерение площади поверхности раны показало, что более значительные изменения в ходе эксперимента были в группе с ЭСФ матриксами. В первые дни в этой группе животных скорость уменьшения раны была максимальной – 0,4-0,65 см²/сутки, площадь раны на 3 сутки составила 3,6см² (81 % от исходной раны). На 5 сутки в группе с волокнистыми матриксами размер ран составил 62,7%, на 7 сутки – 57 %, на 14 – 9 % от исходной величины. В группе с пленками скорость заживления раны была несколько меньше – 0,3-0,4 см²/сутки. Размер ран на 3 сутки уменьшился на 9 % (91 % от исходной), на 7 сутки размер ран составил 78 %, на 14 сутки – 9,1 % от исходной величины раны, что практически совпадает с группой с волокнистыми матриксами. В контрольной группе скорость заживления в первые сутки после операции составила 0,16-0,23 см²/сутки (рис. 2).

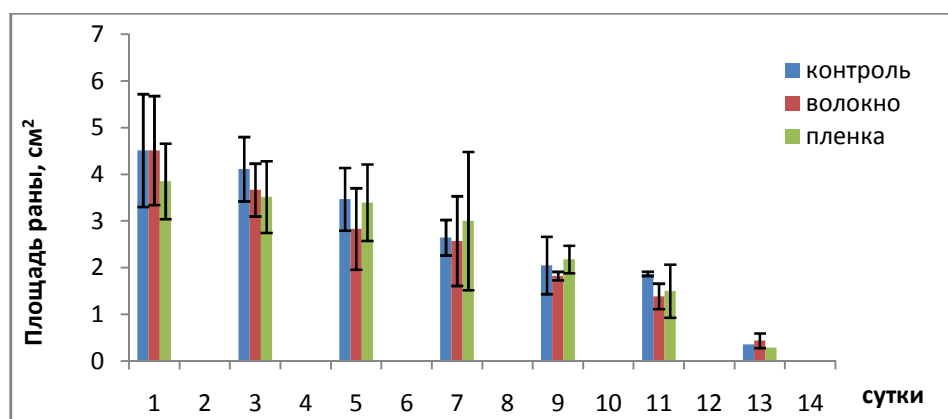


Рис. 2. Динамика уменьшения площади модельных ран при использовании раневых покрытий из полигидроксиалканоатов.

В контрольной группе образовавшийся на поверхности раны струп состоял из высохшего экссудата, лимфы, фибрина, форменных элементов излившейся крови. В основе образования струпа лежит процесс дегидратации, при котором коллоиды теряют большое количество воды и уплотняются, превращаясь в непроницаемый слой. Следовательно эпителизация раны происходит по мере миграции клеток эпителия от краёв раны на её поверхность более медленно, чем у ран покрытых нашими матриксами.

Эксперименты на животных показали, что процессы эпителизации в динамике заживления кожного дефекта при использовании наноматрикса может лежать в основе улучшения ангиогенных и снижения воспалительных свойств, а так же лучшей регенерации кожи, кроме того раневые покрытия предотвращают вторичную инфекционную контаминацию, обеспечивают защиту раны от внешних воздействий, хорошо моделируются на раневой поверхности, фиксируются на ране без применения специальных средств.

Список литературы

1. Теория и практика местного лечения гнойных ран / Ред. Б.М. Даценко. -Киев, 1995. -383 с.
2. Хенч, Джонс, 2007; Штильман, 2006; Nair, Laurencin, 2006;
3. Williams et al., 1999; Williams, Martin, 2004; Chen, Wu, 2005; Воловассоавт.,2006;
4. Wang et al., 2002; Хенч, Джонс, 2007.