

516/3

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии
институт
Базовая кафедра биотехнологии
кафедра

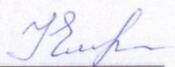
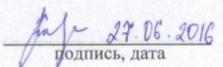
УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
 Волова Т.Г.
подпись

«27» июня 2016г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01.11 – Биоинженерия и биотехнология

Получение и исследование тканеинженерных раневых покрытий на
основе полигидроксиалканоатов

Руководитель	 подпись, дата	к.б.н, Николаева Е.Д.
Выпускник	 подпись, дата	Бадиева Т.В.

Красноярск, 2016

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	5
1.1.Тканевая инженерия	5
1.2. Скаффолд-технология в тканевой инженерии.....	6
1.3. Полигидроксиалканоаты	8
1.3.1.Определение полигидроксиалканоатов.....	8
1.3.2. Виды полигидроксиалканоатов.....	8
1.3.3. Микроорганизмы	10
1.3.4. Механические и температурные свойства полигидроксиалканоатов .	10
1.3.5. Биосовместимость полигидроксиалканоатов	11
1.3.6. Наиболее изученные виды полигидроксиалканоатов.....	13
1.3.7. Применение полигидроксиалканоатов в тканевой инженерии	13
1.4.Механизм заживления ран	14
1.5. Необходимость дермальных эквивалентов.....	15
1.5.Коммерческие препараты.....	17
1.6.Композиты	19
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	23
2.1. Материалы	23
2.2. Характеристика используемых образцов поли-3-гидроксибутирата и получение ультратонкого нетканого волокна.....	23
2.3. Выделение коллагена I типа из сухожилий хвостов крыс.....	23
2.4. Приготовление коллагенового геля	23
2.5. Получение и культивирование культуры мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга крысы.....	24
2.6. Оценка цитотоксичности полимерного матрикса <i>in vitro</i> и сравнение интенсивности роста на матриксах у ММСК костного мозга крысы и фибробластов дермы крысы.....	24
2.7. Проведение операций на опытных белых крысах.....	25
2.8. Планиметрия.....	26

2.9. Гистологический анализ.....	26
2.10. Статистическая обработка полученных результатов.....	28
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	29
3.1. Оценка биосовместимости полученного клеточного матрикса <i>in vitro</i> ..	29
ВЫВОДЫ.....	30
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	31
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	32
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	33

ВВЕДЕНИЕ

Заместительная клеточная терапия – перспективное направление регенеративной медицины, в котором в настоящее время широко применяют культивируемые клетки для восстановления и лечения поврежденных органов и тканей, в том числе и кожных покровов. В мировой практике для замещения дефектов кожи созданы ее аналоги – так называемые дермальные эквиваленты (ДЭ) с использованием фибробластов и кератиноцитов человека для лечения ожоговых и трофических ран. К настоящему времени разработаны различные виды ДЭ, но главным и общим принципом для всех них является аналогия со структурой нормальной кожи: эквивалент состоит из двух слоев – дермального и эпидермального. В основе дермального слоя лежит трехмерный матрикс – чаще всего коллаген или фибрин, несущий фибробласты, а эпидермальный слой формируется на поверхности дермального за счет роста и пролиферации культивируемых кератиноцитов.

Сегодня среди биоматериалов, применяемых в медицине и активно изучаемых для конструирования матриксов функционирующих клеток, выделяют альгинаты, коллаген, алифатические полиэфиры, полиамиды, сегментированные полиэфируретаны, силикон, полиэтилентерефталат, полимеры гликолевой и молочной кислот, а также новый класс природных полимеров, синтезируемых микроорганизмами, – полигидроксиалканоаты. Однако, несмотря на все многообразие используемых компонентов, еще не найдено уникального ДЭ, который полностью отвечал бы всем необходимым требованиям и мог использоваться повсеместно для лечения дефектов кожи.

Целью настоящей работы является конструирование тканеинженерного раневого покрытия на основе ультратонкого нетканого волокна из полигидроксиалканоатов, коллагенового геля из коллагена I типа и культуры мультипотентных мезенхимных стволовых клеток (ММСК), выделенных из стромы костного мозга крысы.

Задачи:

1. Выделение коллагена I типа из сухожилий хвостов крыс и создание на его основе коллагенового геля для внесения в состав раневого покрытия.
2. Выделение ММСК костного мозга крыс линии «Вистар» и их последующее культивирование для внесения в состав раневого покрытия.
3. Оценка биосовместимости полимерного матрикса *in vitro*, определение цитотоксичности матрикса.
4. Конструирование трехмерного раневого покрытия на основе нетканого волокна из полигидроксиалканоатов, коллагенового геля и ММСК костного мозга крысы.
5. Оценка эффективности сконструированных тканеинженерных раневых покрытий на заживление модельных дефектов кожи у белых крыс линии «Вистар».

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Тканевая инженерия

Регенеративная медицина является одним из наиболее перспективных направлений современной медицины. Она решает проблему улучшения продолжительности и качества жизни человека за счет реконструкции поврежденных и утраченных структур и функций органов и тканей. Восстановление дефектов тканей и органов в регенеративной медицине возможно тремя различными путями: трансплантация тканей и органов, стимуляция регенерации тканей различными биологически активными веществами, трансплантация отдельных клеток. Наиболее перспективным направлением регенеративной медицины является тканевая инженерия, призванная решить многие проблемы в этой области: например, проблему острой нехватки донорских органов или отторжения тканей в результате иммунного ответа организма-реципиента [1], [2],[3].

Тканевая инженерия – это междисциплинарная область знаний, включающая в себя биологию, медицину и технические науки, направленная на создание *in vitro* эквивалентов поврежденных тканей и органов для их терапевтической реконструкции, использующая принцип трансплантации клеточной культуры на биосовместимом носителе [4]. Тканевая инженерия открывает широкие перспективы для создания эффективных биомедицинских технологий, с помощью которых становится возможным восстановление поврежденных тканей и органов. Важно понимать, что при использовании тканеинженерного имплантата происходит регенерация ткани, а не простое ее замещение синтетическим материалом.

В настоящее время выделяют два основных подхода использования клеточных технологий в тканевой инженерии и медицине. Первый основан на использовании дифференцированных клеток, а во втором случае применяются недифференцированные стволовые клетки человека. Именно второй подход применения клеточных технологий в регенеративной медицине является наиболее перспективным; результаты по исследованию использования стволовых клеток свидетельствуют о том, что эти клетки способны участвовать в восстановлении органов и тканей при различных вариантах их поражения. Основными источниками клеток для регенерации дефектов тканей являются эмбриональные стволовые клетки и стволовые клетки взрослого организма, особенно мультипотентные мезенхимные стволовые клетки (ММСК).

Итак, целью тканевой инженерии является конструирование живых и функциональных тканей и органов вне организма и последующая имплантация полученной биоинженерной конструкции в организм с целью замены или стимуляции регенерации поврежденного органа или ткани. В любом случае, на месте дефекта непременно должна быть восстановлена трехмерная структура ткани, или так называемые скаффолды.

1.2. Скаффолд-технология в тканевой инженерии

В связи с интенсивным развитием тканевой инженерии активно развивается область науки, направленная на поиски, разработку и получение биополимеров, которые были бы пригодны к использованию в качестве матриц для клеток в биоинженерной конструкции. Сегодня известно огромное количество биополимеров, активно изучаемых для конструирования матриц для клеток и используемых в тканевой инженерии и регенеративной медицине. Все их можно разделить на синтетические и природные полимеры.

К природным биополимерам относятся полисахариды и их производные (альгинаты, целлюлоза, хитозан, декстран, гепарин, гиалуроновая кислота и др.), белки (коллаген, эластин, фибрин, фибронектин, шелк и т.д.), полигидроксиалканоаты. К синтетическим полимерам относятся полиэтилен, полиамиды, полиуретаны, силиконы, полимеры молочной и гликолевой кислот и др. [5], [6], [7].

Клеточные каркасы необходимы для укладки клеток в тканеподобную структуру, что чрезвычайно важно для дальнейшей их имплантации в организм пациента. Такие трехмерные конструкции называются скаффолдами, а методика их получения получила название скаффолд-технологии.

Скаффолд-технология – это культивирование клеток на трехмерных матрицах-носителях природного или синтетического происхождения с целью формирования будущего тканеинженерного трансплантата [4].

Скаффолды играют ключевую роль в культивировании клеток, их пролиферации и формировании трехмерного тканевого эквивалента [8]. Их необходимость обусловлена тем, что клеткам нужно закрепиться на какой-либо поверхности для адекватного роста и пролиферации. Также клеточные матрицы должны обеспечивать поступление питательных веществ к клеткам и выведение продуктов обмена, а также обладать должными физико-механическими свойствами, необходимыми для поддержания целостности эквивалента. Перенос одного лишь пласта клеток может привести к повреждениям белковых молекул в составе клеточной мембраны. Частично поврежденные клетки при перенесении их в рану требуют времени для восстановления своих функций, и только после этого они будут способны включиться в процесс регенерации ткани. Это, в свою очередь, отрицательно сказывается на скорости и эффективности заживления раны с участием клеточного трансплантата. Поэтому оптимальным решением явился перенос на тканевой дефект клеточного пласта вместе с подложкой, на которой и выращивались клетки. В дальнейшем матрикс должен деградировать, не причинив при этом ни малейшего вреда организму. Кроме того, во время своего нахождения в организме подложка не должна вызывать каких-либо иммунных реакций, то есть должна быть биологически совместимой [9].

Итак, к клеточным матрицам предъявляют два основных требования: биосовместимость и биодеградируемость.

Биосовместимость – это интегральная характеристика естественного или искусственного трансплантата, которая позволяет ему приживаться в организме реципиента, не вызывая при этом воспалительных и аллергических реакций.

Биоразрушаемость – разрушение трансплантата под действием биологически активных веществ, в частности, ферментов. Желательно, чтобы матрикс разлагался в организме со скоростью, сопоставимой со скоростью роста новых тканей, с образованием нетоксичных соединений, которые могли бы вовлекаться в процессы метаболизма или без труда выводились бы из организма. Биодegradация подложки необходима, так как постоянное нахождение ее в организме может повлечь за собой нежелательные эффекты, вплоть до воспалительных реакций и операции по удалению имплантата. Однако процесс биодegradации должен быть пролонгированным, так как быстрая дegradация матрикса способствует вымыванию клеток из раны [6].

Помимо всего вышеперечисленного, при выборе клеточного каркаса учитываются свойства его поверхности: гидрофильность/гидрофобность поверхности, шероховатость, заряд [5], [6]. От этих свойств зависит уровень адгезии и роста клеток в культуре. Конечно, нужно также учитывать и физико-механические характеристики скаффолда – он должен обладать достаточной механической прочностью. Наконец, подложка не должна препятствовать нормальному восстановлению тканей [9].

Известно, что клеточная культура гораздо лучше взаимодействует с гидрофильными поверхностями, обеспечивающими хорошую адгезию и пролиферацию клеток. Гидрофильная поверхность подложки много лучше обеспечивает приток питательных веществ к клеткам и удаление продуктов обмена, чем гидрофобная поверхность. Однако, у большинства полимеров, применяемых в создании клеточного каркаса, поверхность гидрофобная, что снижает уровень адгезии клеток. Для повышения гидрофильности поверхности полимера используют множество различных приемов: обработка плазмой различных газов; изменение химического состава полимера; покрытие поверхности гидрофильным полимером, стеринами, акриламидом и другими веществами; обработка ферментами, например, липазой; модификация поверхности полимерами белками внеклеточного матрикса и биологически активными веществами. Выбор модификации поверхности полимера полностью зависит от требуемого результата [5], [9].

Шероховатость поверхности также влияет на ее гидрофильность, что, в свою очередь, оказывает немалое влияние на прикрепление клеток и их пролиферацию, а также на протекание воспалительных процессов. Выбор шероховатости поверхности материала целиком зависит от типа культивируемых клеток. Заряд поверхности полимера также оказывает немалое влияние на адгезию клеток в результате его взаимодействия с зарядом клеточных мембран [5].

Всеми этим требованиям может отвечать матрикс, полученный из полимеров бактериального происхождения – полигидроксиалканоатов.

1.3. Полигидроксиалканоаты

1.3.1. Определение полигидроксиалканоатов

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – это класс алифатических полиэфиров, гидроксипроизводных масляной кислоты и других алкановых кислот [10]. Это биосовместимые и биodeградируемые вещества, синтезируемые бактериями в ответ на рост на питательной среде, богатой углеродом и обедненной другими важными питательными веществами [11], [12]. Это внутриклеточный механизм фиксации и хранения углерода как источника энергии в виде внутриклеточных гранул, используемый широким кругом почвенных микроорганизмов. Эти гранулы занимают около 90% всего объема клетки; выделение этих гранул связано с разрушением клетки с применением определенных растворителей (например, хлороформа, этанола), необходимых для разделения бактериальной биомассы и полимера [13]. На рисунке 1 изображены гранулы ПГА в клетке бактерии.

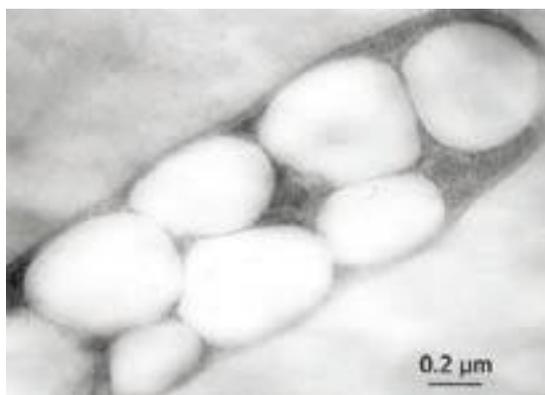


Рисунок 1. Гранулы ПГА в цитозоле бактерии [14]

1.3.2. Виды полигидроксиалканоатов

ПГА обладают широким спектром физических и химических свойств, наличие которых зависит от структуры полимера. Различают гомополимеры, сополимеры и блоки сополимеров ПГА.

Гомополимеры – это такие полимеры, макромолекулы которых состоят из одинаковых по строению повторяющихся структурных единиц (мономеров). Мономером ПГА являются 3-гидроксibuтират (ЗГБ), 3-гидроксивалерат (ЗГВ), 4-гидроксibuтират (4ГБ) и другие. Многие из них до сегодняшнего дня полностью не охарактеризованы. Мономеры ПГА могут включать в себя от четырех до десяти атомов углерода [14].

Сополимерами называются полимеры, макромолекулы которых содержат мономерные звенья разных типов. Различают регулярные и нерегулярные сополимеры. В регулярных сополимерах структурные звенья расположены упорядоченно, а в нерегулярных – беспорядочно.

Блок-сополимеры состоят из макромолекул, содержащих чередующиеся блоки различных полимеров.

В литературе описаны случаи получения нерегулярного ПГА из клеток *Ralstonia eutropha*, растущей на питательной среде, к которой периодически добавляли субстрат в виде фруктозы и валерьяновой кислоты; 30% общей массы этого нерегулярного сополимера представляли собой упорядоченный блок-сополимер с соответствующими характеристиками [15].

К. Маккаличер и Ф. Сраенс доказали, что пленки, созданные из блок-полимеров, обладают гораздо большей эластичностью, нежели пленки, отлитые из нерегулярных сополимеров такого же состава [16].

Биосинтез гомополимеров, нерегулярных сополимеров и блок-сополимеров зависит от трех факторов: вида бактерий, природы источника углерода и условий культивирования данного вида микроорганизмов. Комбинируя эти факторы, на выходе можно получить совершенно разные продукты, различающиеся как по строению, так и по свойствам. Однако, все виды ПГА характеризуются следующими параметрами: биосовместимость, биодеградируемость, гидрофобность, способность иметь в своем составе различные функциональные группы, термопластичность. Механические свойства различных ПГА варьируют от хрупкости до эластичности [11], [14].

В соответствии с длиной боковой цепи выделяют два типа ПГА: первый тип имеет в своем составе короткую боковую цепь (англ. – *scIPHA*), состоящую не более, чем из пяти атомов углерода, синтезируется бактерией *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas pseudoflava*, *Pseudomonas seracia*, *Micrococcus halodentrificans*. Источниками углерода для этих бактерий являются глюкоза и пропионовая кислота, а необходимым условием для биосинтеза ПГА – лимитированные источники азота. Типичными представителями этого типа ПГА являются ПГБ, ПГВ, и сополимер ПЗГБ/ЗГВ. Второй тип, соответственно, имеет в боковом алкиле от шести до двенадцати молекул углерода (англ. - *mcIPHA*), и такие ПГА продуцируются бактерией *Pseudomonas oleovorans* и другими бактериями рода *Pseudomonas*. К типичным представителям относятся такие полимеры, как поли-3-гидроксиоктаноат (ПГО) и поли-3-гидроксинонаноат (ПГН), которые чаще всего встречаются в составе различных сополимеров [11], [12], [14]. Кроме того, существуют и такие полимеры, как поли-4-гидроксибутират (П4ГБ), поли-3-гидроксигексоноат (ПГГ) и другие [17]. На рисунке 2 представлена общая формула ПГА.

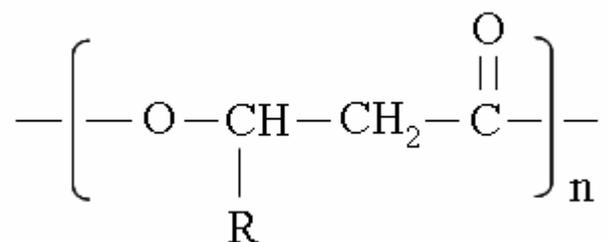


Рисунок 2. Общая структурная формула ПГА

Отрицательная сторона ПГА с короткой боковой цепью состоит в том, что они слишком жесткие и хрупкие, и поэтому не пригодны к использованию

в медицинских целях. ПГА, имеющие в своем составе длинную боковую цепь, напротив, очень эластичны и непрочны. Очевидно, что для использования ПГА в различных областях, будь то тканевая инженерия и медицина или создание упаковочного материала, необходимо улучшить физические, в частности – механические, свойства полимеров [11].

1.3.3. Микроорганизмы

К ферментативному биосинтезу ПГА в промышленных целях способны лишь немногие бактерии; к ним относятся *Ralstonia eutropha*, рекомбинатная *Escherichia coli*, *Aeromonas caviae*, *Pseudomonas putida*. Особая ценность этих бактерий состоит, во-первых, в том, что эти микроорганизмы способны усваивать углерод из огромного количества его источников. Во-вторых, несмотря на то, что многие виды микроорганизмов способны к биосинтезу ПГА, лишь некоторые из них могут быть использованы для промышленного производства, так как именно это малая часть поддается генетическим манипуляциям, которые и ведут к синтезу большого количества полимера. Именно в способности этих микроорганизмов синтезировать большое количество внутриклеточных гранул полимера и состоит их ценность. [12].

1.3.4. Механические и температурные свойства полигидроксиалканоатов

По ряду физико-химических свойств ПГА сходны с такими синтетическими полимерами, как полиэтилен и полипропилен. Например, гомополимер ПЗГБ – является довольно жестким материалом; его предел прочности на разрыв схож с таковым у полипропилена. Если ввести в ПЗГБ какой-либо сополимер, это четко отразится на характеристиках полученного полимера: значительно увеличится гибкость, прочность и удароустойчивость, но несколько уменьшится жесткость. Такое наблюдается в сополимерах ПЗГБ/ЗГВ и ПЗГБ/4ГБ [13].

Увеличение расстояния между эфирными группами в молекуле ПГА также влияет на механические свойства полимера [13].

Температура плавления ПГА варьирует от 55°С у ПГО и ПГГ до почти 180°С у ПЗГБ, причем значение температуры плавления обратно пропорционально длине боковой цепи: чем длиннее цепь, тем ниже температура плавления. Кристаллизоваться ПГА начинают также в широких пределах: от -55°С до 5°С [13].

Механические и температурные характеристики некоторых ПГА представлены в таблице 1.

Таблица 1- Механические и температурные характеристики некоторых ПГА [13]

Характеристика	ПГБ	ПЗГБ/ЗГВ	П4ГБ	ПЗГБ/4ГБ	ПЗГО/ЗГГ
Температура плавления, °С	177	145	53	152	61

Температура кристаллизации, °С	4	-1	-48	-8	-35
Предел прочности на разрыв	40	32	104	26	9
Упругость при растяжении	3,5	1,2	0,149	-	0,008
Относительное удлинение при разрыве	6	50	1000	444	380

1.3.5. Биосовместимость полигидроксиалканоатов

ПГА является не только запасным веществом бактерий, это распространенный биополимер, выполняющий важные физиологические функции. ПЗГБ был обнаружен в огромном количестве живых существ, от бактерий до высших млекопитающих. Благодаря своей гидрофобности, низкой молекулярной массе и способности связываться с макромолекулами, ПЗГБ может находиться в цитоплазме клетки, во внеклеточном матриксе, в составе клеточной мембраны и липопротеинов низкой плотности. Мономер ПЗГБ – 3-гидроксibuтират – является обычным соединением, которое обнаруживается в крови человека в низких концентрациях и принадлежит к группе кетоновых тел. Олигомеры ПЗГБ были обнаружены в аорте человека, ассоциированные с фосфатами и формирующие ионные каналы в мембране клеток [12], [13], [17]. Мономер П4ГБ – 4-гидроксibuтират – обнаружен в тканях мозга, почек, сердца, печени, мышцах. Кроме того, 4-гидроксibuтират и олигомеры П4ГБ используются в качестве терапевтического препарата, а также в качестве седативного и анестезирующего вещества [13],[17].

Все вышесказанное доказывает, что ПГА не являются токсичными для организма, а также могут выступать в качестве лекарственных веществ. Проще говоря, ПГА являются биосовместимым полимером, то есть, их присутствие в организме в качестве имплантата не вызовет иммунных реакций.

Поверхностные характеристики пленок из ПГА являются благоприятными для адгезии и пролиферации клеток. Фибробласты линии НН/ЗТЗ показали хорошее прикрепление и рост на мембранах из ПГА. МСК также продемонстрировали адгезию и пролиферацию на матриксах из ПГА, и самый лучший показатель был у сополимера ПЗГБ/ЗГВ/ГГ, у которого наблюдается высокая шероховатость поверхности, контактный краевой угол смачивания высокий; предполагается, что эти характеристики являются важными для адгезии и пролиферации клеток [12].

Результаты испытаний имплантатов из ПГА *in vivo* показывают противоречивые результаты. Например, чем выше в матриксе содержание

ПЗГБ, тем ниже биоабсорбция имплантата и тем больше тканевой ответ, что связано с высокой жесткостью ПЗГБ [18].

Подкожная имплантация кроликам матриц из полилактида, ПЗГБ и сополимера ПЗГБ/ГГ показала, что именно наиболее гидрофобный сополимер вызывает самую мягкую тканевую реакцию по сравнению с таковой при имплантации матрикса из ПЗГБ и полилактида [19]. В другой работе показано, что чем выше содержание 4-гидроксипропаноата в полимере, тем мягче будет тканевой ответ на имплантацию [18]. Культивирование фибробластов, клеток эндотелия и изолированных гепатоцитов на пленках из ПЗГБ и сополимера ПЗГБ/ЗГВ показали высокие уровни клеточной адгезии. Данное исследование показало, что свойства ПЗГБ и сополимера ПЗГБ/ЗГВ принципиально схожи [20].

В другой работе сравнивали биосовместимость ПЗГБ, ПЗГБ/4ГБ и гликолида в культуре фибробластов. Исследование продемонстрировало, что количество активно пролиферирующих клеток на поверхности сополимера гораздо больше, чем на поверхности гомополимера, но при этом сопоставимо с числом жизнеспособных клеток на гликолиде [21].

Сургученко В.А. с коллегами исследовали адгезию и пролиферацию фибробластов мыши линии 3Т3 на пленках ПГА с различной шероховатостью поверхности. Использовали два образца ПЗГБ/ЗГВ с содержанием гидроксивалерата 12% и 26 % соответственно. Шероховатость изменяли добавлением полиэтиленгликоля на стадии растворения сополимера. Выяснилось, что введение полиэтиленгликоля в сополимер, содержащий 26 % ЗГВ, снижает шероховатость поверхности, что способствует адгезии и пролиферации фибробластов. При концентрации 12 % ЗГВ присутствие полиэтиленгликоля в сополимере существенно увеличивало шероховатость поверхности, что привело к снижению процессов адгезии и пролиферации клеток. Таким образом, было доказано, что характер взаимодействия клеток и матрикса зависит от физико-химических свойств полимера [22].

Очевидно, что однозначного ответа о биосовместимости и пригодности для тканевой инженерии того или иного вида ПГА нет. Биосовместимость полимера зависит от целого комплекса свойств – от чистоты полимера, его физико-химических свойств, структуры, характеристик поверхности и метода приготовления изделия для последующей имплантации. И поэтому на вопрос о том, какой из всех видов ПГА является наиболее перспективным, безопасным и приемлемым для создания тканеинженерной конструкции, предстоит только ответить.

Важно отметить и то, что полимер разлагается без образования токсичных для организма веществ, легко выводится из организма и, более того, продукты распада – мономерные звенья – используются организмом для собственных нужд. Основным компонентом ПГА является 3-гидроксимасляная кислота – естественный продукт обмена клеток и тканей, а конечные продукты распада – вода и углекислый газ. Доподлинно установлено, что биодegradация ПГА протекает в биологических средах с низкими скоростями и реализуется по гуморальному и клеточному пути с активным участием макрофагов, которые

характеризуются высокой активностью кислой фосфатазы [6]. Все это характеризует ПГА как идеально подходящие для имплантации резорбируемые вещества.

1.3.6. Наиболее изученные виды полигидроксиалканоатов

В состав ПГА могут входить около 150 различных мономеров, что зависит от особенностей микроорганизма-продуцента, условий, в которых микроорганизмы культивировались, источников углерода. В зависимости от мономерного состава физико-химические свойства, в частности, кристалличность, пластичность, термические свойства сильно варьируют.

Самым изученным представителем ПГА является гомополимер ПЗГБ, обладающий высокой степенью биосовместимости, но вместе с тем довольно жесткий и хрупкий, что связано с большой кристалличностью данного полимера. Также ПЗГБ характеризуется медленной скоростью деградации [5].

Гораздо более перспективными по праву считаются сополимеры ПГА, свойства которых в зависимости от состава сильно варьируют. К таким перспективным сополимерам относятся те, что содержат в своем составе мономеры 3-гидроксивалерата, 4-гидроксипутирата, 3-гидроксигексоноата, чьи физико-химические свойства изучены достаточно хорошо, а биосовместимость зависит от содержания того или иного мономера в конечном полимере [5].

Если сравнить наиболее изученные сополимеры, в состав которых входит ПЗГБ, с чистым гомополимером ПЗГБ, то можно сказать следующее. Механические свойства таких сополимеров в зависимости от соотношения мономеров сильно варьируют, причем чем выше содержание ЗГБ, тем более кристаллическим становится полимер и менее эластичным. Температура плавления также изменяется: с увеличением содержания ЗГБ она увеличивается [5], [6], [7], [11], [12], [13], [14]. Трехкомпонентные сополимеры, содержащие ПГБ, также характеризуются пониженной температурой плавления и снижением кристалличности по сравнению с гомополимером ПЗГБ. Однако стоит отметить, что все физико-химические характеристики сополимеров существенно зависят от соотношения мономеров в их составе [5], [6], [7], [13], [17].

1.3.7. Применение полигидроксиалканоатов в тканевой инженерии

Потенциально сферы применения ПГА очень широки и могут включать сельское хозяйство, радиоэлектронику, фармакологию [7]. Учитывая биосовместимость и биodeградируемость ПГА и возможность переработки ПГА в различные изделия, очевидно, что этот полиэфир можно использовать и в медицине для получения нетканых и одноразовых изделий, шовных и перевязочных материалов, контролируемых систем доставки лекарственных средств, клеточных матриц для тканевой инженерии [5], [6], [7], [12]. Наиболее перспективными направлениями использования ПГА являются сердечно-сосудистая хирургия, создание матриц для биоискусственных органов и для регенерации мягких, костной и хрящевой тканей [6].

С использованием растворных технологий, контактного прессования, электростатического формования, микроинкапсулирования и т. д. получают пленки, нетканые волокна, мембраны, трехмерные каркасы, микро- и наночастицы из ПГА, которые активно используются в медицинских и фармакологических целях.

Многими исследователями показано, что ПГА обладают всеми необходимыми свойствами для использования их в качестве матрикса для клеток в целях тканевой инженерии. Матрикс из ПГА обладают высокими адгезионными свойствами и не проявляют цитотоксического эффекта при контакте с клетками. Матрикс из ПГА можно использовать для выращивания фибробластов, остецитов, хондроцитов, гепатоцитов и клеток другого происхождения; кроме того, подложки из ПГА подходят для культивирования стволовых клеток и обеспечивают их дифференцировку в заданном направлении [7], [10]. Много внимания уделяется ПГА в применении к сердечно-сосудистой хирургии в качестве материала для сосудистых протезов, клапанов сердца, барьерных средств, сосудистых стентов и др. [5], [6],[7], [12], [13], [14], [17]. Благодаря своим физико-механическим свойствам и пролонгированной деградации *in vivo* ПГА перспективны для костной регенерации. Показано, что сополимер ПЗГБ/ЗГВ индуцирует остеогенез [7]. Выявлено, что трансплантация фибробластоподобных ММСК аутогенного и аллогенного костного мозга на ожоговую поверхность ускоряет процесс заживления кожных покровов гораздо интенсивнее, нежели трансплантация фетальных фибробластов [6]. А. Зонари и другие создали эквивалент кожи на основе сополимера ПЗГБ/ЗГВ и ММСК жировой ткани. В ходе эксперимента на крысах было показано, что скорость заживления ран при использовании эквивалента увеличилась по сравнению с контрольной группой животных, раны которых не покрывались кожным эквивалентом [23]. Кроме того, все указывает на то, что при использовании подобных эквивалентов не происходит рубцевание кожи во время ее заживления. В целом, ПГА является подходящим материалом для внедрения в скаффолд-технологии тканевой инженерии.

1.4.Механизм заживления ран

Заживление кожных ран представляет собой сложный механизм, включающий в себя три фазы: фазу воспаления, фазу пролиферации и фазу перестройки.

Фаза воспаления начинается сразу после ранения и в отсутствие осложнений продолжается в течение 5-7 суток. Характеризуется сужением сосудов (вазоконстрикцией). При повреждении эндотелиальных тканей активируется каскад реакций гемокоагуляции, что приводит к адгезии тромбоцитов и их агрегации в сгустки и тромбы. Активированные тромбоциты выделяют множество биологически активных веществ, включая простагландины, серотонин, гистамин, протезазы, влияющие на сосудистый тонус. Выделяются цитокины, тромбоцитарный фактор роста, эпидермальный фактор роста, инсулиноподобный фактор роста, фибробластный фактор роста,

действующие на клетки-мишени и активирующие их. После вазоконстрикции следует обратный процесс – расширение сосудов (вазодилатация). Происходит экссудация с выходом плазменных белков, выпадение фибрина, наблюдается отек и инфильтрация окружающих тканей. Цитокины, выделенные тромбоцитами, привлекают в зону поражения лейкоцитов и фибробластов, а также стимулируют пролиферацию клеток и синтез коллагена. Вскоре после повреждения появляются гранулоциты и моноциты, а также макрофаги, которые являются важнейшими составляющими всего процесса. Помимо фагоцитоза, эти клетки выделяют факторы хемотаксиса и роста, что вызывает активную пролиферацию фибробластов и клеток эндотелия, что, в свою очередь, приводит к образованию гранулярной ткани.

Вторая фаза – фаза пролиферации – длится в среднем около четырех недель. Процессы регенерации ткани начинаются уже с первых суток после ранения, а их продолжительность зависит от величины раневого дефекта. Эта фаза включает в себя регенерацию эпителия, фиброплазию и синтез коллагена III типа, который позже замещается коллагеном I типа, сокращение раны, ангиогенез, продолжается образование гранулярной ткани в месте дефекта. Эпителизация начинается с краев раны, в то же время формируется гранулярная ткань. Поэтому в конце этой стадии на месте раны формируется рубец, хорошо заметный из-за большого количества пронизывающих его капилляров; он имеет ярко-красный цвет.

Фаза перестройки длится от нескольких месяцев до года. Рубец на этой стадии приобретает прочность, уменьшается в размерах, становится более мягким и менее выпуклым, окраска бледнеет. Как отмечалось выше, коллаген III типа постепенно замещается коллагеном I типа; резорбция воды вокруг рубца способствует дальнейшей организации коллагеновых волокон. Эти волокна сперва ориентированы произвольно, но затем постепенно выстраиваются в одном направлении, повышая прочность на разрыв и улучшая внешний вид рубца. Постепенно тормозится образование новых сосудов. К концу этой фазы рубец приобретает около 80% прочности на разрыв по отношению к нормальной, неповрежденной коже [24], [25],[26].

1.5. Необходимость дермальных эквивалентов

Проблема регенерации дефекта кожи или полностью утраченного кожного покрова при заболеваниях и различных повреждениях является одной из самой актуальных во всем мире. Особое место по праву принадлежит термическим поражениям кожи – ожогам. Ежеминутно в мире один человек становится жертвой ожога разной степени тяжести. В России ожоговые пациенты составляют 20% от всех травматологических больных, и около 30% из них нуждаются в госпитализации. Летальный исход составляет 5-11%. По количеству летальных исходов ожоги уступают только травмам, полученным в автомобильных авариях. Иными словами, термические поражения кожного покрова представляют собой серьезную медицинскую проблему [1].

Одной из важнейших задач лечения больных с термическими поражениями кожи является наиболее быстрое восстановление кожного покрова.

Восстановление кожных покровов при поверхностных ожогах I и II степени происходит за счет сохранившихся стволовых клеток базального слоя эпидермиса. При ожогах степени IIIA, когда базальный слой эпидермиса разрушен, регенерация кожи происходит за счет стволовых клеток и клеток-предшественников в ране. Функционирование этих клеток способствует восстановлению эпидермиса, дермы, взаимодействие компонентов которой определяет процесс рубцевания во вновь восстанавливающейся коже. Разработан ряд перевязочных средств, позволяющих снизить риск развития тяжелых осложнений, потерю жидкости и жизненно необходимых веществ. Однако при обширных и глубоких ожогах такие биологические повязки оказываются бесполезными. При глубоких ожогах IIIB и IV степеней для восстановления кожных покровов возникает необходимость аутодермопластики (пересадки на пострадавшие участки лоскутов кожи, взятых с неповрежденных участков тела), которая имеет огромный недостаток – либо дополнительная кожная рана у пациента в месте забора лоскута для проведения операции, либо дефицит донорских ресурсов, что существенно затрудняет возможность одномоментной пластики всех ожоговых ран. Поэтому в настоящее время активно ведется поиск функциональных ДЭ, которые смогли бы заменить аутотрансплантат кожи [1], [3].

Помимо лечения ожоговых повреждений кожных покровов значительное внимание уделяется лечению трофических язв и длительно незаживающих ран, высокая распространенность которых приходится на экономически развитые страны. Это не менее серьезная медицинская проблема, чем ожоги.

В России и странах Западной Европы этим заболеваниями подвержены 1-4% населения, большая часть которых страдают от трофических язв нижних конечностей. Трофическая язва или длительно незаживающая рана часто возникает у больных с нарушениями кровоснабжения и иннервации кожи, которые обусловлены различными патологическими процессами, например, сахарным диабетом, при котором происходит нарушение микроциркуляции крови, или варикозной болезнью, при которой наблюдается хронический венозный застой. К длительно незаживающим ранам можно отнести термические и химические ожоги, а также обморожения и глубокие механические повреждения кожи [27].

В России более 10% общего количества пациентов гнойных отделений составляют больные с трофическими язвами нижних конечностей, 70% из них страдают варикозной болезнью. Атеросклероз является причиной возникновения трофических язв нижних конечностей в 8% случаев заболевания. Диабет и дистальная нейропатия лежат в основе появления трофических язв у 3% больных. Различные травмы также приводят к образованию трофических язв в 6% случаев. Частота выявления трофических язв уже многие годы остается постоянной; кроме того, прослеживается явная тенденция к омоложению таких больных. К лечению трофических язв и

длительно незаживающих ран различного происхождения также показана аутодермопластика. Однако, как и в случае с обширными ожогами, результаты применения этого метода далеки от удовлетворительных из-за увеличения раневой поверхности за счет донорского участка кожных покровов и риска отторжения трансплантата [27].

Ожоговые ранения, трофические язвы, длительно незаживающие раны могут ограничить свободу движений, создают косметический дефект, сопровождаются болевыми ощущениями, жжением, зудом – и все то значительно ухудшает качество жизни человека. А длительное лечение, которое может исчисляться годами и даже десятилетиями, приводит к большим финансовым затратам, которые превращают проблему нарушения кожных покровов, помимо медицинской, в социально-экономическую.

1.5. Коммерческие препараты

В настоящее время ДЭ активно разрабатываются и внедряются на рынок биотехнологических материалов. Здесь будут рассмотрены наиболее примечательные коммерческие ДЭ, получившие свою известность благодаря своей эффективности. Создание ДЭ для применения в дерматологии занимает всего 7% от всей коммерческой продукции тканевой инженерии (Диаграмма 1).

Распределение по областям клинического применения:

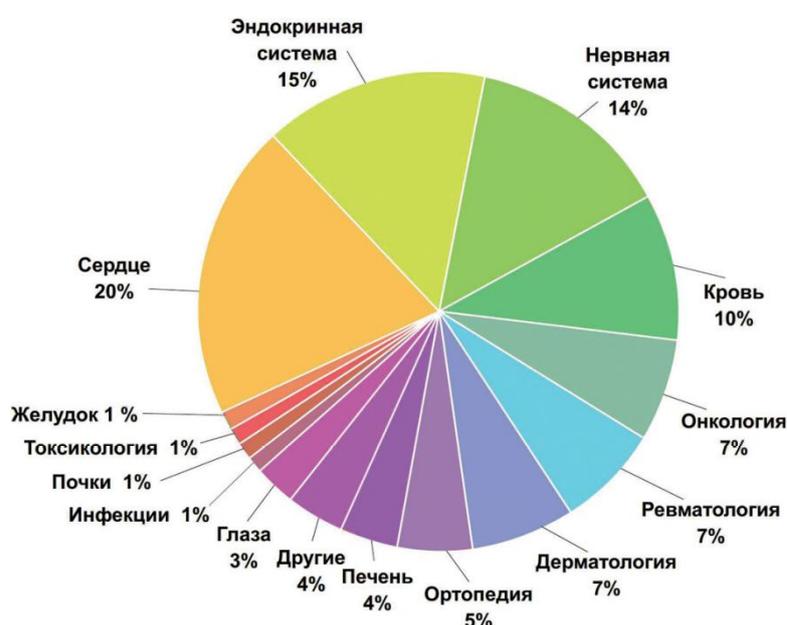


Диаграмма 1. Распределение коммерческих продуктов по областям применения [27]

Американская компания Cytori Therapeutics, Inc. занимается разработкой технологии «клеточная реконструкция» (Cell-Enhanced Reconstruction procedure) для целей эстетической медицины на основе комбинирования аутогенных клеток мягких тканей и стволовых клеток, выделенных из жировой ткани [28].

Intercytex, базирующаяся в Манчестере, Великобритания, занималась разработкой коммерческого продукта Cyzact®, представляющего собой аллогенные дермальные фибробласты человека на фибриновом геле. Разрабатывался этот продукт для заживления трофических язв нижних конечностей, однако исследования были прекращены на III фазе FDA из-за отсутствия должного клинического эффекта. В данный момент разрабатывается продукт ICX-SKIN – кожный эквивалент, состоящий из слоя кератиноцитов человека, расположенных на слое аллогенных дермальных фибробластов; матриксом является коллагеновый гель. Данный продукт разрабатывается с целью лечения ожогов и длительно незаживающих ран [28].

Продукт Dermagraft® от американской компании AdvanceId BioHealing, Inc. представляет собой трехмерный сетчатый матрикс из полиглактина с аллогенными фибробластами для лечения ожогов и длительно незаживающих ран диабетической стопы. Эта же компания запатентовала еще один продукт – TransCyte™ – силиконовую сетку с аутогенными фибробластами для лечения ожоговых ран [28].

Компания Isolagen, Inc (США) представила на рынке продукт Isolagen Therapy™, разработанный для коррекции дефектов кожи и основанный на применении аутогенных дермальных фибробластов [28].

Integra® - это бесклеточная матрица для лечения ожогов. Состоит из двух слоев – верхний слой, силиконовая пленка, выполняет функции эпидермиса кожи, предотвращая потерю тепла и влаги, нижний слой – нетканое волокно, которое является подложкой, обеспечивающей непосредственно рост дермальных клеток пациента, в будущем формирующих слой дермы. Разрабатывается американской компанией Integra Lifesciences Corporation [29].

В компании Genzyme Buosurgery (США) разработан продукт Epicel®, в основу которого положено использование аутогенных фибробластов пациента [30].

Продукт австралийской компании Avita Medical Ltd. под названием ReCell® успешно используется в ряде стран для восстановления кожных покровов при ожогах низкой степени тяжести. Уникальность и особый интерес представляет то, что данный продукт используется только в виде спрея с применением аутогенных фибробластов [28].

Alloderm® компании Lifecell Corporation (США) представляет собой бесклеточный матрикс и успешно применяется на базе клиники [31].

Американская компания Organogenesis, Inc является создателем довольно широко известного продукта под маркой Apligraf®, который представляет из себя аллофибробласты на матриксе из коллагенового геля и кератиноциты, культивируемые на предварительно сформированном дермальном слое [3], [28].

Немецкой компанией EuroDerm GmbH создан продукт под маркой EpiDex®. Представляет собой кератиноциты на силиконовой мембране [28].

OrCel® компании Forticell Bioscience, Inc. представляет собой двухслойную матрицу из коллагена I типа с культивированными отдельно по слоям эпидермальными кератиноцитами и дермальными фибробластами [32].

Итальянская компания Fidia Advanced Biopolymers s.r.l. предлагает свой продукт Laserskin™, состоящий из гиалуроновой мембраны с выращенными на ней кератиноцитами человека [28].

Наконец, Myskin™ от английской компании CellTran Ltd основан на использовании аутогенных кератиноцитов человека и подложки из хитозана для лечения ожогов, длительно незаживающих ран, поражений кожи при диабете [28].

Все рассмотренные выше коммерческие продукты так или иначе доказывают свою эффективность в доклинических и клинических тестах. Однако, несмотря на все их разнообразие и эффективность, все еще ведутся поиски такого ДЭ, который смог бы стать универсальным при любых поражениях кожного покрова. Его применение должно сводить к минимуму любой риск развития у пациентов побочных эффектов разной степени тяжести, а разработка должна быть относительно простой и легко быть поставленной в масштабы промышленного производства.

1.6. Композиты

В литературе часты упоминания об эквивалентах, в основу которых положен только гель (чаще всего коллагеновый или фибриновый) и фибробласты и/или кератиноциты [1], [2], [3], [5], [27], [33], [34], [35], [36], [37]. К плюсам таких гелевых эквивалентов можно отнести следующее:

- большая гидратированность геля и, как следствие, - свободная диффузия питательных веществ, продуктов жизнедеятельности и газов по всему объему матрикса;
- доказанная биосовместимость;
- гели подвергаются полимеризации непосредственно *in situ* под действием различных факторов и потому могут заполнить раны сложной формы.

Но у гелевых матриксов есть весомый недостаток – несопоставимые с живыми тканями механические характеристики [5]. Полимерные пленки в качестве матриксов для клеток имеют прекрасные механические свойства, однако, являются слишком плотными и практически негидратированными – как следствие, обмен газами и метаболитами протекает вяло. Наиболее перспективными считаются ультратонкие волокна, которые наиболее точно имитируют межклеточный матрикс живых тканей. Однако, совместимость с живыми тканями у матриксов, созданных на основе полимерных изделий, ниже по сравнению с гелями. Компенсировать недостатки одного типа матрикса преимуществами другого позволяет использование композитов.

Итак, наиболее перспективным вариантом создания раневого покрытия является конструирование комбинированного эквивалента – так называемого композита – неоднородного материала, состоящего из двух и более компонентов. В нашем случае в состав композита входят волокно из ПЗГБ, коллагеновый гель и ММСК костного мозга крысы.

Коллаген – это сложный белок, относящийся к группе гликопротеинов. Имеет четвертичную структуру, представляющую собой тройную спираль из трех аминокислотных цепей. Молекулярная масса составляет 300 кДа. Составляет около 30% от общего количества белка в организме человека. Нерастворим в воде, водных растворах солей, в слабых растворах кислот и щелочей, что связано со строением первичной структуры коллагена – 70% аминокислот в его составе являются гидрофобными. В теле человека встречается 19 типов коллагена, но наиболее распространенными являются типы I, II, III. Эти типы способны формировать агрегаты друг с другом путем образования ковалентных связей и образовывать микрофибриллы, которые могут формировать еще более сложные структуры. В коже, костной ткани и сухожилиях большей частью представлен коллаген типа I, в хрящах – коллаген II типа, а кровеносные сосуды главным образом состоят из коллагена типа III. Коллаген является основным структурным элементом дермального слоя кожи и базальной мембраны, на которой располагаются кератиноциты [9], [34].

Коллаген поддается различным видам обработки, из него можно формировать твердые матриксы и гели [34]. Коллагеновый гель успешно используется в качестве матрикса для различных типов клеток, будь то фибробласты, кератиноциты или стволовые клетки, и уже доказал свою эффективность как агент для нормальной жизнедеятельности клеток, их адгезии и пролиферации [1], [2], [3], [5], [27], [33], [34], [35], [36], [37], [38], [39], [40]. Коллаген использовался для создания гидрогеля с высевными на его поверхность фибробластами [41], для создания волокон для кератиноцитов и фибробластов [42]. В другой работе путем электрического формования был получен сополимер коллагена, молочной и гликолевой кислот, в качестве клеточного компонента служили ММСК костного мозга человека [43]. Опыты на крысах продемонстрировали, что полученный эквивалент способствует синтезу коллагена и эпителизации раны. М. Ананта и другие в качестве подложки использовали такой же сополимер; клеточным компонентом заменителя кожи являлись дермальные фибробласты и кератиноциты кролика. Эксперимент *in vivo*, поставленный на кроликах, показал, что применение такой биоинженерной конструкции ускоряет заживление ран [44].

Р.Г. Васильев со своими коллегами культивировали ММСК нервного гребня на трехмерных гидрогелях из фибрина и коллагена. Показано, что оба матрикса способствуют клеточной адгезии и распространению клеток, поддерживают высокую жизнеспособность клеток и способствуют формированию сети взаимосвязанных клеток [45]. Ян Чен и другие культивировали эпидермальные стволовые клетки на хитиновой мембране, модифицированной коллагеном I типа. Трансплантацию полученного эквивалента проводили лабораторным мышам. Результаты эксперимента показали, что регенерация кожных покровов ускорилась в ходе применения матрикса с клетками, а новая, восстановленная кожа была достаточно толстой и упругой. Кроме того, показана пролиферация клеток волосяных фолликулов. Таким образом, использование такого эквивалента кожи ведет к успешной регенерации раны с восстановлением функций кожи и ее придатков [46].

Кроме того, коллагеновый гель активно используется и в качестве одного из компонентов композитного материала для целей тканевой инженерии; нанесение коллагенового геля является одним из возможных способов модификации поверхности полимера для повышения гидрофильности.

Известно, что популяция клеток стромы костного мозга очень гетерогенна. Наряду с фибробластами, адипоцитами, эндотелиальными и стромальными клетками, она содержит популяцию клеток, которые находятся в недифференцированном состоянии и обладают способностью к самообновлению и дифференцировке. Эти клетки являются предшественниками для клеток негемопоэтического ряда и называются мультипотентными мезенхимными стволовыми клетками (ММСК) [47], [48]. Это стволовые клетки взрослого организма, способные к дифференцировке в нескольких направлениях; показано, что эти клетки могут дифференцироваться *in vitro* в направлении остеоцитов, адипоцитов, хондроцитов, миоцитов, фиброцитов, гепатоцитов, клеток стромы костного мозга, кардиомиоцитов, эндотелиоцитов и клеток эпителия [48]. Также ММСК костного мозга обладают уникальными иммуномодулирующими характеристиками: они способны подавлять пролиферацию лимфоцитов *in vitro*. Иными словами снижается экспрессия антигенов гистосовместимости и проявляются иммуносупрессивные свойства, которые могут быть использованы для лечения иммунологических нарушений и снижают риск отторжения трансплантата [49], [50].

Показано, что ММСК костного мозга продуцируют *in vitro* макрофагальный колониестимулирующий фактор, фактор роста эндотелия сосудов, фактор роста фибробластов, фактор роста нервных клеток, фактор роста гепатоцитов, а также несколько видов интерлейкинов [48]. Благодаря своей способности продуцировать цитокины и факторы роста, стимулирующие регенерацию тканей, ММСК костного мозга являются перспективным материалом для клеточной терапии [51].

Ефименко и другие показали на примере экспериментов *in vitro* и *in vivo*, что инкубация ММСК костного мозга в условиях гипоксии повышает их способность продуцировать факторы роста эндотелиальных клеток и тем самым стимулировать процесс ангиогенеза [51]. В другой статье указано, что ММСК костного мозга при раневых повреждениях кожи и ожогах стимулируют регенерацию кожных покровов и предотвращают формирование рубцов [48]. В следующей работе авторы ссылаются на работу В.И. Шумакова, который был первым ученым, использовавшим ММСК костного мозга в лечении ожоговых ран и сравнившим их с эмбриональными фибробластами. Его эксперимент продемонстрировал, что клеточная инфильтрация снизилась, а образование сосудов и гранулярной ткани, напротив, ускорилось по сравнению с эмбриональными фибробластами и контрольной группой животных без имплантированных клеток. Также авторы статьи ссылались на работу М.Ф. Расулова, который вместе с коллегами впервые испытал ММСК костного мозга на человеке – это была женщина с ожогами III степени тяжести. Применение ММСК значительно увеличило скорость заживления ожоговых ран и процесс ангиогенеза [52].

Поистине прорывная работа японских докторов, показала, какой эффективный лечащий эффект оказывает пористый матрикс из коллагена с высеянными на его поверхность ММСК костного мозга. Участие в столь масштабном эксперименте принимало двадцать пациентов с кожными ранами различной этиологии: ожоги, глубокие раны, инфекции и пролежни. Всем пациентам трансплантировали кожный эквивалент. Макроскопические и гистологические исследования показали формирование эпидермиса, дермы и гиподермального слоя. В конце эксперимента все раны полностью или частично зажили, терапевтический эффект эквивалента был доказан [53].

Д. Леонарди и другие использовали ММСК костного мозга и клетки костного мозга, культивируемые на метилцеллюлозе [54], Б. Лавердет с коллегами использовали ММСК костного мозга для восстановления кожных покровов и показали, что данные ММСК являются отличной альтернативой дермальным фибробластам [55]. Доказано, что различные ММСК усиливают рост эпидермиса, ангиогенез, синтез коллагена и ускоряет заживление ран. Также стоит отметить, что живые эквиваленты кожи, как на основе ММСК, так и на основе фибробластов и кератиноцитов, поддерживают прикрепление, рост, дифференциацию клеток [56].

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

Для получения тканеинженерного раневого покрытия использовались следующие материалы:

- нетканое волокно из ПЗГБ;
- коллагеновый гель, сделанный на основе коллагена I типа, выделенного из сухожилий хвостов крыс;
- ММСК костного мозга крысы.

2.2. Характеристика используемых образцов поли-3-гидроксibuтирата и получение ультратонкого нетканого волокна

Ультратонкие нетканые волокна были получены в лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза Института биофизики СО РАН методом электростатического формования на установке Nanon 01A (MECC Inc., Япония). Для их получения были использованы образцы гомополимера поли-3-гидроксibuтирата. Химическую структуру образцов ПЗГБ определяли после предварительного метанолиза проб по метиловым эфирам жирных кислот на хромато-масс-спектрометре GCD plus (Hewlett Packard, США); степени кристалличности – на рентгеноспектрометре D8 ADVANCE «Bruker» (Германия) (графитовый монохроматор на отраженном пучке). Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение ПГА исследовали с использованием хроматографа для гель-проникающей хроматографии Breeze System (Waters, США) относительно полистироловых стандартов (Fluka, Швейцария, Германия).

2.3. Выделение коллагена I типа из сухожилий хвостов крыс

Сухожилия из хвостов крыс выделили следующим образом: делали продольный разрез хвоста крысы, снимали кожу и вытягивали сухожилия, которые обрабатывали в 70% растворе спирта. Хвосты также предварительно дезинфицировали в 70% растворе этанола.

[Изьят 1 абзац]

Полученный коллаген хранили в стерильной посуде при температуре 4°C.

2.4. Приготовление коллагенового геля

Для начала сделали слабый раствор уксусной кислоты: 70% уксусную кислоту смешали с деионизированной водой в отношении 1:116 – 0,085 мл уксусной кислоты развели в 9,915 мл воды. В 8 мл полученного слабого раствора уксусной кислоты растворили 0,040 г коллагена I типа. Так как для внесения коллагенового геля непосредственно на кожный дефект необходимо, чтобы рН геля был нейтральным, к полученному раствору постепенно добавляли раствор 1 М NaOH, измеряя величину водородного показателя на

pH-метре. После раствор закрывали фольгой и убирали в темное место для загустения геля на 48 часов.

2.5. Получение и культивирование культуры мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга крысы

В качестве клеточного компонента раневого покрытия были использованы ММСК костного мозга крысы третьего пассажа.

[Изъят 1 абзац]

2.6. Оценка цитотоксичности полимерного матрикса *in vitro* и сравнение интенсивности роста на матриксах у ММСК костного мозга крысы и фибробластов дермы крысы

Для определения цитотоксичности ультратонкого нетканого волокна и оценки пролиферативной активности клеток проводили МТТ-тест, который является индикатором активности клеточного метаболизма, и окрашивали клетки флуоресцентными красителями DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндола дигидрохлорид) и FITC (флуоресцеин изотиоцианат). В рамках данного эксперимента также было проведено сравнение интенсивности роста и пролиферации ММСК костного мозга крысы и фибробластов дермы крысы, чтобы показать, что ММСК костного мозга крысы являются более эффективными для использования их в качестве компонента раневого покрытия, чем фибробласты дермы крысы.

Матрикс нарезали на диски диаметром 10 мм и поместили в 24-луночный планшет (TPP, Швейцария), а затем стерилизовали в 70% этаноле в течение 10 минут. На половину дисков добавляли по 1 мл коллагенового геля и стерилизовали под ультрафиолетовой лампой (экспозиция 2 часа). В контрольных образцах рассев клеток производили на полистирол культурального планшета. Рассев клеток проводили из расчета 50 000 клеток на лунку по три повторности на каждую контрольную точку. Подсчет клеток проводили с использованием камеры Горяева, для определения наличия мертвых клеток клеточные суспензии окрашивали трипановым синим (Gibco Invitrogen).

Культивирование проводили в среде DMEM/F-12 (1:1) с добавлением 10 % фетальной телячьей сыворотки и раствора антибиотиков в течение 7 суток, питательную среду меняли каждые три дня. МТТ-тест проводили на первые, четвертые, седьмые сутки. Окрашивание флуоресцентными красителями FITC (Sigma-Aldrich, США) и DAPI (Sigma-Aldrich, США) также проводили на седьмые сутки культивирования клеток.

Для проведения МТТ-теста делали следующее: сперва отбирали из нужных лунок старую питательную среду, затем добавляли 950 мкл новой питательной среды и 50 мкл МТТ-бромид (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразол бромид) (Sigma-Aldrich, США) и инкубировали в термостате в 5% атмосфере CO₂, при температуре 37°C в течение 4 часов. После окончания инкубации содержимое лунок тщательно отбирали автоматическими

пипетками, добавляли в каждую лунку 150 мкл раствора диметилсульфоксида (MP Biomedicals, США) для растворения кристаллов МТТ-формаза, отбирали из каждой лунки по 100 мкл и переносили в 96-луночный планшет (TPP, Швейцария) для измерения оптической плотности. Оптическую плотность измеряли при длине волны 540 нм на микропланшетном фотометре Bio-Rad 680 (Bio-Rad LABORATORIES Inc, США). Для определения количества клеток использовали предварительно подготовленный калибровочный график.

Окрашивание клеток флуоресцентными красителями проводили следующим образом. Из лунок удаляли среду, промывали фосфатно-буферным раствором (Gibco Invitrogen), фиксировали в 4% растворе формальдегида на 1 час.

2.7. Проведение операций на опытных белых крысах

Для эксперимента были выбраны десять самцов белых крыс линии «Вистар» примерно одинакового возраста (7 месяцев) и состояния здоровья. Эксперимент проводили согласно Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных [57] и Международным рекомендациям (этическому кодексу) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных. Все животные питались стандартным кормом и имели свободный доступ к воде и корму, содержались в отдельных клетках с нормальным световым и температурным режимом. Во время проведения эксперимента все животные сохраняли хороший аппетит и подвижность. Всех животных случайным образом поделили на две группы: опытную и контрольную. Опытным животным в месте дефекта имплантировали коллагеновый гель с высеянными на него ММСК костного мозга крысы, нетканое волокно из ПЗГБ аккуратно накладывалось поверх геля и закреплялось 4 швами.

Операция по нанесению дефекта тканей и последующей имплантации матрицв проходила в стерильных условиях; использовались стерильные хирургические инструменты, стерильные шовные материалы; в качестве антисептика использовался препарат «Мирамистин» (ООО «ИНФАМЕД», Россия), обладающий противомикробным, противовоспалительным, местным иммуностимулирующим действием.

На время операции опытные крысы находились под наркозом, который обеспечивал препарат «Золетил» (Virbac, Франция), введенный крысам внутримышечно в объеме 0,2 мл; кожный дефект наносился в области лопаток; место нанесения дефекта тщательно подготавливалось к проведению операции – крысы были обриты, кожа тщательно обрабатывалась спиртом и «Мирамистином» во избежание воспаления и инфицирования раны. Крысам полностью удаляли эпидермальный и дермальный слои кожи диаметром около 1,5-2 см вплоть до мышечной фасции. Ниже представлены фотографии проведения операции на примере опытной крысы (Рисунок 4-6).

Выводили животных из эксперимента путем эвтаназии хлороформом на 1, 3, 6 и 9 сутки и после полного заживления раны у опытной крысы (20 сутки).

Сразу после эвтаназии для оценки динамики заживления модельных дефектов производилась планиметрия ран и забирались образцы тканей – биопсия вместе с модельной раной и окружающими ее тканями. Образцы хранились в 4% растворе формальдегида, и по завершению эксперимента был проведен гистологический анализ тканей.

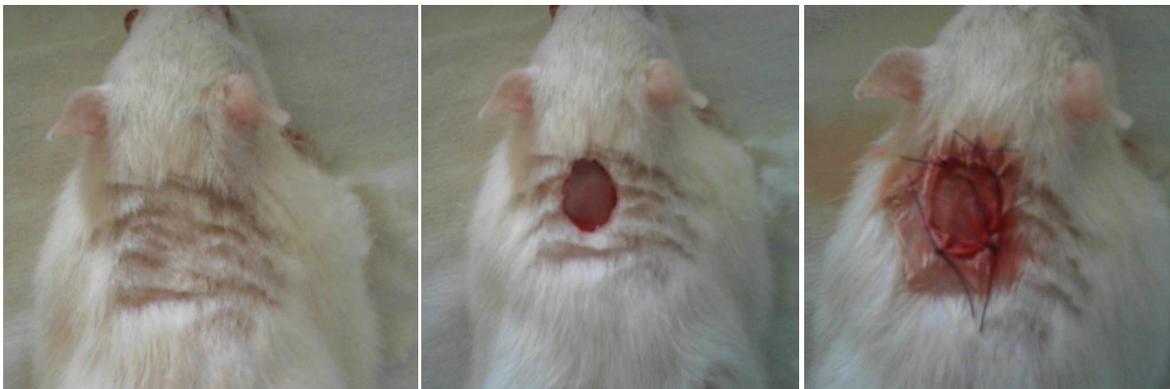


Рисунок 4.
Выстриженное место
для нанесения
модельной раны на
спине опытного
животного

Рисунок 5.
Модельная рана на
спине опытного
животного

Рисунок 6.
Наложение швов
для закрепления
волокна из ПЗГБ на
модельной ране

2.8. Планиметрия

Планиметрические исследования по динамике заживления модельных ран проводили по методу Поповой Л.Н. [58]. В ходе выведения опытных крыс из эксперимента обводили контур каждой модельной раны на пленке. После завершения эксперимента *in vivo* из этой пленки по данным контурам делались вырезки; также из этой же пленки вырезали квадрат с длиной стороны 10 мм, относительно которого и высчитывалась площадь модельных ран у крыс. Все образцы взвешивали на аналитических весах (OHAUS, США), а затем с использованием полученных данных по весу высчитывали площадь каждого образца с помощью составления пропорции.

2.9. Гистологический анализ

После фиксации образцов ткани в 4% растворе формальдегида образцы промывали под проточной водой в течение двух часов и высушивали на фильтровальной бумаге. Затем образцы подвергали обезвоживанию с использованием 70%, 80% и 96% растворов этанола. В каждом из растворов образцы находились по 24 часа. В 96% этаноле образцы обезвоживали трижды – каждый раз по 24 часа, и каждые сутки этанол меняли на новый. После обезвоживания проводили заливку образцов в парафин (Sigma- Aldrich, США). Сперва из обезвоженного материала удаляли спирт путем обработки образцов промежуточной средой – смесью спирта и ксилола (1:1) в течение двух часов.

После этого образцы перемещали в чистый ксилол на три часа, каждый час ксилол меняли на новый. После этого образцы помещали в раствор парафина в ксилоле (1:1) на 24 часа и держали в термостате при 58°C. И только затем образцы помещали в парафин и в течение трех часов держали в термостате при 58°C, меняя парафин каждый час на новый. По окончании всех манипуляций осуществлялась непосредственная заливка образцов парафином. Сперва образцы помещали в специальные кассеты, затем заливали парафином и давали парафину затвердеть [59].

Предметные и покровные стекла для гистологического анализа подготавливали следующим образом. Отобранные стекла тщательно промывали в мыльном растворе, а затем помещали в 96% этанол для обезжиривания. По истечению часа стекла высушивали на фильтровальной бумаге, а затем в стерильных условиях ламинара на каждое предметное стекло наносили 15% раствор L-лизина (Sigma-Aldrich, США), чтобы повысить адгезивные свойства стекол [59].

После предварительной подготовки стекол и затвердевания парафина переходили непосредственно к изготовлению срезов. Для этого использовали микротом с ручным приводом Leica RM2235 (Leica, Германия). Срезы с ножа собирались в деионизированную воду, подогретую на водяной бане Leica HI 1210 (Leica, Германия) до 40°C, чтобы срезы расправились, а затем срезы вылавливали на предметные стекла и помещали на ночь в термостат при 37°C [59].

Перед окрашиванием срезов удаляли парафин в ходе депарафинирования и регидратации. Для депарафинирования последовательно использовали ксилол и промежуточный раствор ксилола и 96% этанола в равном отношении, для регидратации последовательно использовали 96%, 80% и 70% растворы этанола. Жидкости находились в высоких цилиндрических стаканах с притертыми крышками, депарафинирование и регидратация проводились под вытяжкой. В каждом из растворов образцы выдерживались по 3 минуты. После 70% этанола образцы переносили в деионизированную воду на 5 минут [59].

Для окрашивания срезов использовали гематоксилин Эрлиха и эозин. Окрашивание происходило согласно протоколу: после удаления парафина и регидратации срезы окрашивали в гематоксине Эрлиха в течение 1-2 минут, затем промывали срезы в дистиллированной воде также 1-2 минуты. Следующим шагом было помещение срезов в подсиняющий раствор на 1 минуту. Подсиняющий раствор готовили так: в 100 мл дистиллированной воды добавляли 1 каплю 10% раствора аммиака. После этого срезы помещали в дистиллированную воду и промывали в течение 5 минут. Далее срезы помещали в водный раствор эозина на 2 минуты и быстро промывали в дистиллированной воде. Далее производили дегидратацию срезов с использованием спирта восходящей крепости – 70%, 80%, 96% этанолах и смеси этанола и ксилола в отношении 1:1. Выдерживали по 2 минуты. Затем срезы просветляли в двух порциях орто-ксилола в течение 2 минут. После всех манипуляций срезы заключали в канадский бальзам и микроскопировали [59].

2.10. Статистическая обработка полученных результатов

Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel общепринятыми методами. Для получения данных рассчитывали среднее арифметическое, среднеквадратичное отклонение, ошибку средней арифметической. Достоверность отличия средних значений проверяли по U-критерию Манна-Уитни (уровень значимости 0,05).

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Оценка биосовместимости полученного клеточного матрикса *in vitro*.

Исследованный клеточный матрикс показал хорошую биосовместимость *in vitro*. Согласно результатам МТТ-теста, нетканое волокно из ПЗГБ, как само по себе, так и с нанесением коллагенового геля на его поверхность, обладает хорошими адгезивными свойствами, поддерживает жизнеспособность обоих типов клеток, цитотоксические свойства матрикса не выявлены. По перечисленным свойствам оба типа матриксов превосходят полистирол культурального планшета. На волокне с коллагеновым гелем клетки пролиферируют значительно лучше. Это обусловлено тем, что внесение коллагенового геля на поверхность волокна способствовало улучшению гидрофильности поверхности всего матрикса, что, в свою очередь, благотворно повлияло на его адгезивные и пролиферативные свойства. По результатам экспериментов *in vitro* можно заключить следующее – трехмерный матрикс, состоящий из нетканого волокна и коллагенового геля не обладает цитотоксическими свойствами, клетки на нем активно пролиферируют. Выявлено, что численность клеток на таком матриксе превосходила численность клеток, рассеянных на волокно без коллагенового геля. Также было показано, что ММСК костного мозга крысы являются наиболее перспективными клетками для использования в дальнейшем эксперименте *in vivo*, так как их адгезивные и пролиферативные способности превосходят таковые у фибробластов дермы крысы.

[Изъято 8 страниц]

ВЫВОДЫ

По результатам проделанной работы можно сделать следующие выводы:

1. Выделен коллаген I типа из сухожилий хвостов крыс и получен коллагеновый гель на его основе.
2. Выделены ММСК костного мозга белых крыс линии «Вистар». Их последующее культивирование показало высокую способность к адгезии и пролиферации у данных клеток на полистироле культуральной посуды.
3. Согласно результатам, полученным в эксперименте *in vitro*, матрикс характеризуется положительной биосовместимостью, обусловленной адгезией и пролиферацией клеток на его поверхности, и не проявляет цитотоксичных свойств. Выявлено, что на матриксе с добавлением коллагенового геля клетки активнее пролиферируют, чем без него, а также показано, что ММСК костного мозга крысы являются более эффективными и перспективными для их дальнейшего использования в качестве одного из компонентов раневого покрытия, чем фибробласты дермы крысы.
4. Сконструировано трехмерное тканеинженерное раневое покрытие на основе ультратонкого нетканого волокна из ПЗГБ, коллагенового геля из коллагена I типа, выделенного из сухожилий хвостов крыс, и ММСК костного мозга крысы.
5. По результатам эксперимента по восстановлению кожных покровов *in vivo* с использованием белых крыс линии «Вистар» отмечается положительная динамика заживления ран у опытной группы животных при использовании сконструированного тканеинженерного раневого покрытия. При его использовании длительность воспалительных процессов снизилась, ускорились процессы эпителизации раны и образования новых функционирующих волосяных фолликулов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенной работы были изучены и отработаны методы выделения и культивирования клеток разных типов, методы получения коллагена I типа из сухожилий хвостов крыс, методы получения коллагенового геля, методы проведения МТТ-теста, методы окрашивания флуоресцентными красителями, методы планиметрии и гистологического анализа. Кроме того, была исследована цитотоксичность полимерного нетканого волокна и коллагенового геля в культуре ММСК костного мозга крысы и культуре фибробластов дермы крысы. Было получено раневое покрытие, представляющее собой трехмерный матрикс, состоящий из нетканого волокна и нанесенного на его поверхность коллагенового геля, и ММСК костного мозга крысы, и была показана эффективность его использования. Для выявления эффективности сконструированного раневого покрытия был проведен эксперимент по восстановлению модельных кожных дефектов у белых крыс линии «Вистар». В конце работы были сделаны все необходимые выводы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей работе приняты следующие сокращения:

3ГБ – 3-гидроксибутират

3ГВ – 3-гидроксивалерат

4ГБ – 4-гидросибутират

ДЭ – дермальный эквивалент

ММСК – мультипотентные мезенхимные стволовые клетки

ПЗГБ – поли-3-гидроксибутират

П4ГБ – поли-4-гидроксибутират

ПАВ – поверхностно активное вещество

ПГА – полигидроксиалканоаты

ПГВ – поли-3-гидроксивалерат

ПГГ – поли-3-гидроксигексоноат

ПГН – поли-3-гидроксинонаноат

ПГО – поли-3-гидроксиоктаноат

FDA – Food and Drug Administration – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов в США

mslPHA – medium chain length PHA

sclPHA – short chain length PHA

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гаин Ю.М. Перспективы и возможности клеточной трансплантации при восстановлении обширных дефектов мягких тканей травматического происхождения / Ю. М. Гаин, Е.П. Киселёва // Новости хирургии. – 2010 – Т. 18, № 5 – С. 134-143.
2. Шаповалова Е.Ю. Оптимизация типа коллагена каркаса в биоинженерных конструкциях для заживления язв кожи с учетом эмбриогистогенеза кожи у эмбрионов человека / Е.Ю. Шаповалова, Т.А. Бойко, Ю.Г. Барановский, О.А. Каракулькина, А.Г. Барановский // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2014 - №5 – С. 108-110.
3. Смирнов С.В. Применение биотехнологий в лечении ожоговых ран: проблемы и перспективы (обзор литературы) / С.В. Смирнов, Е.А. Жиркова, М.В. Сычевский // Неотложная медицинская помощь. – 2011 - №1 – С. 32-35.
4. Терминология, используемая в практике клеточных технологий / от редакции // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006 - №4 (6) – С. 6-8.
5. Николаева Е.Д. Биополимеры для клеточной инженерии / Е.Д. Николаева // Журнал Сибирского Федерального Университета. Биология. – 2014 – Т. 7, № 2 – С. 222-233.
6. Шишацкая Е.И. Клеточные матрицы из резорбируемых полигидроксиалканоатов / Е.И. Шишацкая // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007 – Т. 2, № 2 – С. 68-75.
7. Волова Т.Г. Современные биоматериалы: мировые тренды, место и роль микробных полигидроксиалканоатов / Т.Г. Волова // Журнал Сибирского Федерального Университета. Биология. – 2014 – Т. 2, № 7 – С. 103-133.
8. Peter X. MA. Biodegradable Polymer Scaffolds with Well-Defined Interconnected Spherical Pore Network / Peter X. MA., Ji-won Choi // Tissue Engineering – 2001 – V. 7, № 1 – С. 23-33.
9. Швед Ю.А. Разработка полимерной подложки для культивирования фибробластов кожи человека / Ю.А. Швед, Л.В. Кухарева, И. М. Зорин, А.Ю. Соловьев, М.И. Блинова, А.Ю. Билибин, Г.П. Пинаев // Цитология – 2006 – Т. 48, №2 – С. 161-168.
10. Шишацкая Е.И. Современные восстановительные технологии в медицине: место природных полимеров / Е.И. Шишацкая // Известия высших учебных заведений. Физика. – Издание Томского Университета – 2013 – Т. 56, № 12/3 – С. 58-64.
11. Baki Hazer. Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications / Baki Hazer, Alexander Steinbüchel // Applied Microbiology and Biotechnology – 2007 – V. 74, № 12 – С. 1-12.
12. Christopher J. Brigham. Applications of Polyhydroxyalkanoates in the Medical Industry / Christopher J. Brigham, Anthony J. Sinskey // International Journal of Biotechnology for Wellness Industries – 2012 - № 1 – С. 53-60.

13. Simon F. Williams. Application of PHAs in Medicine and Pharmacy [Электронный ресурс] / Simon F. Williams, David P. Martin // Публикации Tephra Inc. – Режим доступа: <http://www.tepha.com/assets/Applications-of-PHAs-in-Medicine-and-Pharmacy.pdf>
14. Guo-Qiang Chen. Plastics Completely Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates / Guo-Qiang Chen // Microbiology Monographs/ Springer-Verlag Berlin Heidelberg – 2010 – V. 14 – С. 17-37.
15. Pederson E.N. Bacterial synthesis of PHA block copolymers / Pederson E.N., McChalicher C.W., Scienc F. // Biomacromolecules – 2006 - № 7(6) – С. 1904-1911.
16. McChalicher C.W. Investigating the structure-property relationship of bacterial PHA block copolymers / McChalicher C.W., Scienc F. // Journal of Biotechnology – 2007 – V. 132, № 3 – С. 296-302.
17. Guo-Qiang Chen. The application of Polyhydroxyalkanoates as tissue engineering material / Guo-Qiang Chen, Qiong Wu // Biomaterials / Elsevier – 2005 - №26 – С. 6565-6578.
18. Tang H. Ying. Scaffolds from electrospun polyhydroxyalkanoate copolymers: Fabrication, characterization, bioabsorption and tissue response / Tang H. Ying, Daisuke Ishii, Atsushi Mahara, Sunao Muracami, Tetsuji Yamaoka, Kumar Sudesh, Razip Samian, Masahiro Fujita, Mizuo Maeda, Tadahisa Iwata // Biomaterials / Elsevier – 2008 - № 29 – С. 1307-1317.
19. Xiang-Hua Qu. In vivo studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) based polymers: Biodegradation and tissue reactions / Xiang-Hua Qu, Qiong Wu, Kun-Yang Zhang, G.Q. Chen // Biomaterials / Elsevier – 2006 - №27 – С. 3540 – 3548.
20. Shishatskaya E.I. A comparative investigation of biodegradable polyhydroxyalkanoate films as matrices for in vitro cell cultures / Shishatskaya E.I, Volova T.G. // The Journal of Materials Science: Materials in Medicine publishes – 2004 – V.15, № 8 – С. 915-923.
21. Chee J.W. The influence of copolymer ratio and drug loading on the biocompatibility of P(3HB-co-4HB) synthesized by Cupriavidus sp./ Chee J.W, Amirul A.A., Tengku Muhammad T.S., Majid M.I.A., Mansor S.M. // The Biochemical Engineering Journal – 2008 - № 38 – С. 314-318.
22. Сургученко В.А. Особенности адгезии и пролиферации фибробластов мыши линии NIH/3T3 на пленках из бактериального сополимера поли(3-гидроксибутират -со-3-гидроксиивалерата) с различной шероховатостью поверхности / В.А. Сургученко, А.С. Пономарева, А.Е. Ефимов, Е.А. Немец, И.И. Агапов, В.И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов – 2012 – Т. 14, № 1 – С. 72-77.
23. Zonari A. Polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate structures loaded with adipose stem cells promote skin healing with reduced scarring/ Zonari A., Martins T.M.M., Paula A.C.C., Boeloni J.N., Novikoff S., Marques A.P., Correlo V.M., Reis R.L., Goes A.M.//Acta Biomaterialia – Elsevier Ltd –2015 - №17 – С. 179-181

24. Kasuya A. Attempts to accelerate wound healing/ Kasuya A., Tokura Yo.//Journal of Dermatological Science– Elsevier Ltd –2014 - №76 – С. 169-172.
25. Gomathysankar S. Proliferation of Keratinocytes Induced by Adipose-Derived Stem Cells on a Chitosan Scaffold and Its Role in Wound Healing/ Gomathysankar S., Halim A.S., Yaacob N.S.//Archives of Plastic Surgery – 2014 - №41 – С. 452-457.
26. Заживление раны [Электронный ресурс] // Медицинский справочник «Медицинская карта» - Режим доступа: <http://medkarta.com/?cat=article&id=27080>
27. Винник Ю. С. Клеточные технологии и тканевая инженерия в лечении длительно не заживающих ран / Ю.С. Винник, А.Б. Салмина, А.И. Дробушевская, О.В. Теплякова, Е.А. Пожиленкова, Л.Д. Зыкова // Вестник экспериментальной и клинической хирургии – 2011 – Т.4, №2 – С. 392-397.
28. Зорин В.Л. Анализ зарубежного рынка регенеративной медицины / В.Л. Зорин, А.И. Зорина, В.Р. Черкасов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия – 2009 – Т.4, № 3 – С. 68-78.
29. Integra[®] Dermal Regeneration Template [Электронный ресурс]: информация о продукте компании Lifesciences Corporation – Режим доступа:<http://www.integralife.com/index.aspx?redir=detailproduct&Product=549&ProductName=Integra%AE%20Dermal%20Regeneration%20Template&ProductLineName=Soft+Tissue+Solutions&ProductLineID=78&PA=Soft%20Tissue>
30. What is Epicel[®] [Электронный ресурс]: информация о продукте компании Genzyme Buosurgery – Режим доступа: <http://www.epicel.com/hcp/about/epicel.aspx>
31. AlloDerm[®] Regenerative Tissue Matrix [Электронный ресурс]: информация о продукте компании LifeCell Corporation – Режим доступа: <http://www.lifecell.com/health-care-professionals/lifecell-products/alloderm-regenerative-tissue-matrix/>
32. What is OrCel[®] [Электронный ресурс]: информация о продукте компании Forticell Bioscience – Режим доступа: <http://www.forticellbioscience.com/orcel.html>
33. Юдинцева Н. М. Восстановление соединительной ткани в результате трансплантации на раны экспериментальных животных дермального эквивалента на основе фибрина / Н.М. Юдинцева, Н.М. Плескач, Л.В. Смагина, М.И. Блинова, И.А. Самусенко, Г.П. Пинаев // Цитология – 2010 – Т.52, № 9 – С. 724-728.
34. Юркевич Ю.В. Ранозаживляющее действие культивированных аллофибробластов в составе гелеобразующего носителя при лечении термических ожогов / Ю.В. Юркевич, А.Б. Смолянинов, А.С. Хрупина, К.М. Крылов, П.К. Крылов, И.Д. Козулин // Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения – 2012 – Т.7, № 2 – С. 836-838.

35. Shinsaku Togo. Differentiation of embryonic stem cells into fibroblast-like cells in three-dimensional type I collagen gel cultures / Shinsaku Togo, Tadashi Sato, Hisatoshi Sugiura, Xingqi Wang, Hesham Basma, Amy Nelson, Xiangde Liu, Tom W. Bargar, John G. Sharp, Stephen I. Rennard // *In Vitro Cellular & Developmental Biology* – 2011 – № 47 – С. 114-124.
36. Давыдова Д.А. Культивирование стволовых клеток амниотической жидкости человека в трехмерном коллагеновом матриксе / Д.А. Давыдова, Е.А. Воротеляк, Е.Е. Брагина, В.В. Терских, А.В. Васильев // *Цитология* – 2011 – Т. 53, №4 – С. 325-331.
37. Стречкий Г.М. Исследование влияния композиции на основе хитозанового геля и биорегулятора сыворотки крови на заживление гнойных ран у мышей / Г.М. Стречкий, М.С. Краснов, Е.Ю. Рыбакова, О.Е. Авдеенко, В.Е. Тихонов, А.И. Шайхалиев, В.П. Ямскова, И.А. Ямсков // *Клеточные технологии в биологии и медицине* – 2011 - №4 – С. 211-214.
38. J. Velema. Biopolymers-Based Biomaterials as Scaffolds for Tissue Engineering /J. Velema, D. Kaplan // *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* – 2006 - № 102 – С. 187-238.
39. Truong Y.B. Collagen-based layer-by-layer coating on electrospun polymer scaffolds/ Truong Y.B., Glattauer V., Briggs K.L., Stefan Zappe., Ramshaw J. A.M.// *Biomaterials* – Elsevier Ltd – 2012 - №33 – С. 9198-9204
40. Papuga A.Ye. Different types of biotechnological wound coverages created with the application of alive human cells/ Papuga A.Ye., Lukash L.L.// *Biopolymers and Cell* – 2015 – V.31, №2 – С. 83-96
41. Helary C. Fibroblasts within concentrated collagen hydrogels favour chronic skin wound healing/ Helary C., Zarka M., Giraud-Guille M.M.// *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* – 2012 - №6(3) – С. 225-237
42. Kempf M. A denatured collagen microfiber scaffold seeded with human fibroblasts and keratinocytes for skin grafting/ *Biomaterials* – 2011 - №32(21) – С. 4782-4792
43. Ma K. Effects of nanofiber/stem cell composite on wound healing in acute full-thickness skin wounds/ Ma K., Liao S., He L., Lu J., Ramakrishna S., Chan C.K.// *Tissue Engineering: Part A* – 2011 – №17 – С. 1413-1424
44. Ananta M. A rapid fabricated living dermal equivalent for skin tissue engineering: an in vivo evaluation in an acute wound model/ Ananta M. Brown R.A., Mudera V.// *Tissue Engineering: Part A* – 2012 - №18 – С.353-361
45. Vasyliov R.G. 3D Cultivation of Neural Crest-Derived Multipotent Stem Cells in Collagen and Fibrin Hydrogels: Effects on Cell Viability and Proliferation/ Vasyliov R.G., Zubov D.A., Rodnichenko A.E., Labunets L.F., Novikova S.N.// *Biotechnologia Acta* – 2014 – V.7, №5 – С. 50-54
46. Shen Ya. Epidermal Stem Cells Cultured on Collagen Modified Chitin Membrane Induce In Situ Tissue Regeneration of Full-Thickness Skin Defects in Mice/ Shen Ya., Dai L., Li X., Liang R., Guan G., Zhang Z., Cao W., Liu Zh., Mei Sh., Liang W., Qin S., Xu J., Chen H.//*PLOS One* – 2014 – V. 9, №2 – С. 1-14

47. Анохина Е.Б. Гетерогенность стромальных клеток-предшественников, выделенных из костного мозга крыс/ Е.Б Анохина, Л.Б. Буравкова// Цитология – 2007 – Т.49, №1 – С. 40-47
48. Кругляков П.В. Стволовые клетки дифференцированных тканей взрослого организма / П.В. Кругляков, И.Б. Соколова, Д.Г. Полинцев // Цитология – 2008 – Т. 50, №7 – С. 557-567
49. Шахпазян Н.К. Мезенхимальные стволовые клетки из различных тканей человека: биологические свойства, оценка качества и безопасности для клинического применения / Н.К. Шахпазян, Т.А. Астрелина, М.В. Яковлева // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия – 2012 – Т. 7, № 1 – С. 23-34.
50. Киселева Е.В. Сравнение дифференцировочных потенциалов фибробластоподобных клеток стромы костного мозга, жировой ткани, волосяного сосочка и фибробластов дермы человека / Е.В. Киселева, Э.С. Чермных, Е.А. Воротеляк, А.И. Воложин, А.В. Васильев, В.В. Терских// Цитология – 2009 – Т.51№1 – С. 12-19
51. Ефименко А.Ю. Влияние гипоксии и воспалительных факторов на жизнеспособность и ангиогенную активность мезенхимных стромальных клеток из жировой ткани и костного мозга / А.Ю. Ефименко, Е.Е. Старостина, К.А. Рубина, Н.И. Калинина, Е.В. Парфенова // Цитология – 2010 – Т.52, №2 – С. 144-154
52. Ghieh F. The Use of Stem Cells in Burn Wound Healing: A Review/ Ghieh F., Jurjus R., Ibrahim A., Geagea A.G., Daouk H., El Baba B., Chams S., Matar M., Zein W., Jurjus A. // BioMedical Research International – 2015 – V.2015 – С. 1-9
53. Yoshikawa T. Wound therapy by marrow mesenchymal cell transplantation / Yoshikawa T, Mitsuno H, Nonaka I, Sen Y, Kawanishi K, Inada Y, Takakura Y, Okuchi K, Nonomura A. // Plastic and Reconstruction Surgery – 2008 - №121 – С. 860-877
54. Leonardi D. Mesenchymal stem cells combined with an artificial dermal substitute improve repair in full-thickness skin wounds/ Leonardi D., Oberdoerfer D., Fernandes M.C., Meurer R.T., Pereira-Filho G.A., Cruz P., Vargas M., Chem R.C., Camassola M., Nardi N.B.// Burns– Elsevier Ltd – 2012 - №38 – С. 1143-1150
55. Laverdet B. Use of mesenchymal stem cells for cutaneous repair and skin substitute elaboration/ Laverdet B., Micallef L., Lebreton C., Mollard J., Lataillade J.-J., Coulomb B., Desmouliere A.// Pathologie Biologie– Elsevier Ltd – 2014 - №62 – С. 108-117
56. Kasuya A. Attempts to accelerate wound healing/ Kasuya A., Tokura Yo.//Journal of Dermatological Science– Elsevier Ltd –2014 - №76 – С. 169-172
57. Об утверждении Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных: Приказ № 742 от 13 ноября 1984 г – Москва, 1984

58. Попова Л.Н. Как изменяются границы вновь образующегося эпидермиса при заживлении ран: автореф. дис. ...канд. медицинских наук / Попова Л.Н. – Москва, 1942 – 16 с.
59. Коржевский Д.Э. Основы гистологической техники/ Д.Э. Коржевский, А.В. Гиляров – СПб: Спецлит – 2010 – 95 с.