

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Т. Г. Волова

« 18» июня 2018 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Медико-биологическое тестирование биосовместимых природных полимеров
микробного происхождения в качестве материала для реконструктивной
хирургии

Руководитель	_____	<u>д.б.н.</u>	С.В. Прудникова
	_____	<u>д.б.н.</u>	Е.И. Шишацкая
	_____	<u>к.б.н.</u>	А.А. Шумилова
Выпускник	_____		Ю.А. Сковородина

Красноярск 2018

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
1.Обзор литературы	5
1.1.Способы получения бактериальной целлюлозы и ее свойства.....	5
1.2.Применение композитов из БЦ	9
1.2.1. Применение в промышленности	9
1.2.2. Применение в медицине.....	10
1.2.3. Применение в фармацевтике	12
1.3.Особенности раневых покрытий	12
1.3.1. Раневые повязки на основе природных полимеров	14
1.3.2. Полимеры на основе альгината	14
1.3.3. Полимеры на основе коллагена.....	15
1.3.4. Гидрогелевые раневые покрытия.....	15
1.3.5. Повязки, активированные лекарственными препаратами.....	16
1.4. Применение полигидроксиалканоатов в реконструктивной медицине	16
1.5. Биосовместимость полигидроксиалканоатов	20
2. Материалы и методы исследования	21
2.1. Получение бактериальной целлюлозы	21
2.2. Получение композитных пленок П(ЗГБ/4ГБ) с добавлением крошки БЦ	22
2.3. Изучение свойств пленок БЦ и композитных пленок П(ЗГБ/4ГБ)/БЦ ...	23
2.4.Изучение выхода лекарственного препарата из композита П(ЗГБ/4ГБ)/БЦ+актовегин	26
2.5. Получение вытяжки из суспензии бактериальной целлюлозы	26
2.6.Оценка иммунотоксичности биополимерных имплантатов по фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов лабораторных грызунов.....	27
2.7.Схема эксперимента по применению раневого покрытия на ожоговых ранах лабораторных животных	28
3. Результаты и обсуждения исследований	31
Выводы	38
Список используемых источников.....	39

ВВЕДЕНИЕ

Привлечение новых материалов для восстановления повреждений кожных покровов является актуальной задачей реконструктивной медицины. Связано это с постоянным ростом количества дефектов кожи вследствие ожогов, травм и хирургических вмешательств. Круг хирургических и лечебных средств, применяемых для закрытия и восстановления дефектов кожных покровов, а также материалов и медикаментов, используемых для их изготовления, велик и насчитывает сотни наименований. Принципы и методы лечения кожных ран зависят от многих факторов: глубины и тяжести повреждения и фазы раневого процесса, локализации раны и степени инфицирования.

Особый интерес представляет новое направление, ориентированное на получение композитных материалов на основе биополимеров.

К таким материалам применимым для биомедицинских технологий, включая тканевую инженерию, относятся бактериальная целлюлоза (БЦ) и биорезорбируемые полигидроксиалканоаты (ПГА). БЦ характеризуется высокой биосовместимостью, не проявляет цитотоксичности в культурах клеток, обладает уникальными структурой и физико-механическими свойствами, включая механическую прочность, эластичность, газопроницаемость, высокую влагоудерживающую способность и пористость. Структурная организация, а также высокая биосовместимость БЦ свидетельствуют о несомненных перспективах этого природного полимера для реконструкции дефектов кожных покровов

Второй биоматериал, сополимер П(3ГБ/4ГБ), обладает биоразрушаемостью, высокой биосовместимостью, эффективен в качестве изделий биомедицинского назначения различных типов. Не смотря на положительные свойства каждого из материалов, создание композитов на их основе позволит получить перспективные раневые покрытия.

Цель работы: Получение и исследование пленок бактериальной целлюлозы и композитов БЦ с сополимером 3-гидроксимасляной и 4-гидроксимасляной кислот П(ЗГБ/4ГБ) в качестве раневого покрытия для реконструктивной хирургии

Задачи:

1.Получить пленки бактериальной целлюлозы в культуре штамма *Komagataeibacter xylinus* В-12068 с применением различных субстратов (глюкоза и глицерин) и исследовать их характеристики.

2.Методом полива раствора с последующим испарением растворителя получить и исследовать свойства композитных пленок на основе БЦ и П(ЗГБ/4ГБ).

3.Получить композитные пленки П(ЗГБ/4ГБ)/БЦ, нагруженные актовегином и исследовать выход лекарственного вещества.

4.Исследовать иммунотоксичность вытяжки суспензии бактериальной целлюлозы на лабораторных грызунах (мышях и крысах).

5.Оценить возможность применения композитных пленок на основе сополимера П(ЗГБ/4ГБ) и БЦ в сочетании с актовегином, для восстановления кожных покровов ожоговых ран лабораторных животных.

1. Обзор литературы

1.1. Способы получения бактериальной целлюлозы и ее свойства

Целлюлоза – широко распространенный в природе углеводный биополимер, имеющий преимущественно растительное происхождение. Однако в последнее время вырос интерес к целлюлозе, продуцируемой различными клетками микроорганизмов, преимущественно бактерий, в связи, с чем этот биополимер получил название – бактериальная целлюлоза (БЦ).

Нановолокна бактериальной целлюлозы (БЦ) – это уникальный природный органический материал, одновременно прочный и эластичный. БЦ представляет собой химически чистую целлюлозу, без примеси гемицеллюлоз и лигнина, которые обычно частично сохраняются после очистки растительной целлюлозы [1].

Макромолекула целлюлозы состоит из тысяч остатков глюкозы, соединенных в спирально закрученную цепь; 20–200 цепей образуют кристаллический пучок, или микрофибриллу. Микрофибриллы собираются в лентовидные волокна, погруженные в толщу цементирующих полимеров — лигнина, ксиланов, арабинанов, пектинов и белков. Получается не только прочный, но и водонепроницаемый композитный материал [2].

Бактериальная целлюлоза представляет собой гомополимер β -(1,4) глюкозы с общей формулой $(C_6H_{10}O_5)_n$. Структура БЦ обеспечивает уникальные физические и механические свойства этого высокомолекулярного биополимера: высокая пористость с наноразмерными порами, высокая механическая прочность наряду с эластичностью, высокая сорбционная способность и степень кристалличности, которая может достигать 90%, что позволяет использовать БЦ для создания разнообразных современных композиционных материалов различного назначения. Так же БЦ имеет отличные свойства, такие как прозрачность, прочность на растяжение, адаптивность к живому. Кроме того, БЦ привлекательна тем, что представляет собой уникальный нетоксичный биологически совместимый материал, не

вызывающий аллергическую реакцию, и является биodeградируемым полимером.

БЦ характеризуется высокой проницаемостью для жидкостей и газов и обладает высокой способностью поглощения воды (до 1000% от своей сухой массы) [3]. Свойства БЦ могут быть легко изменены с помощью различных методов, таких как добавление различных веществ в среду в процессе культивирования клеток, изменение самих условий культивирования (перемешивание среды, аэрация, варьирование температурных условий, pH среды), физическая и химическая модификация, специальные условия сушки и электромагнитное воздействие [4].

Биосинтез целлюлозы включает промежуточные реакции, для осуществления которых требуются индивидуальные ферменты, каталитические комплексы и регуляторные белки. Производство БЦ и продуктивность бактерий, главным образом, зависят от таких условий культивирования, как состав питательной среды, содержание растворенного кислорода и условия культивирования (статические или динамические) [5].

Оптимальный выбор питательных сред и условий для культивирования важен и для роста бактерий, образующих целлюлозу, поскольку рост бактерий влияет на стимулирование продуцирования БЦ. Один из наиболее важных факторов, влияющих на выход, продуктивность и скорость синтеза БЦ – источник углерода, используемый для культивирования целлюлозосинтезирующих бактерий. Наиболее подходящим источником углерода для получения БЦ является глюкоза, хотя и другие углеводы, такие как фруктоза, сахароза, мальтоза, ксилоза, крахмал, а также глицерин и многоатомные спирты (арабит и маннит) могут использоваться бактериальными продуцентами для синтеза этого полисахарида. Широкий диапазон утилизируемых источников углерода для синтеза БЦ позволяет использовать в качестве сырья разнообразные углеводсодержащие отходы пищевой промышленности и агропромышленного комплекса. Наличие в таком сырье дополнительных микро- и макроэлементов положительно влияет на

биосинтез БЦ, однако в ряде случаев исходное сырье содержит ионы тяжелых металлов, различные ксенобиотики, например пестициды, что негативно воздействует на клетки. В этом случае требуется их значительная стабилизация [6].

Получение БЦ – сложный и длительный процесс. Особое место в повышении выхода БЦ занимает выбор продуцента. Микробиологическую целлюлозу способны синтезировать бактерии различных родов (*Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Enterobacter*, *Sarcina*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Alcaligenes* и *Mycodema*), но классическим производителем этого материала считается бактерия *Komagataeibacter xylinus* [7].

Komagataeibacter xylinus является одним из видов бактерии, которые производят большое количество целлюлозы. Когда этот вид выращивают в лаборатории при статических условиях, формы целлюлозы как толстый коврик называется пленка на границе раздела воздух/поверхность [8]. Микрофибриллы бактериальной целлюлозы синтезируются под поверхностью клетки *Komagataeibacter*. БЦ содержит наборы параллельных цепей, состоящих из β -D-глюкопиранозных единиц, связанных между собой межмолекулярными водородными связями, которая идентична по химическому составу растительной целлюлозе. Толщина гель-пленки за месяц может достигнуть до 2,5 см. Ее молекулы лежат строго параллельно друг другу. Поэтому образующиеся кристаллические микрофибриллы в 100 раз тоньше микрофибрилл растительной целлюлозы, то есть это структурные элементы наноразмерного размера [9].

Микрофибриллы БЦ по одной через особые отверстия выдавливаются из клетки, и за пределами клетки 10–100 микрофибрилл объединяются в нить. Множество нитей переплетаются в сеть, формируя в зависимости от условий культивирования слизистые пленки (статические условия) или отдельные сгустки (культивирование с перемешиванием).

Гель-пленка представляет собой губку с наноразмерными порами, которая впитывает и долго удерживает огромное количество воды – в 200 раз

больше собственного сухого веса. Кроме того, за счет регулярного расположения волокон в пространстве и друг относительно друга степень кристалличности БЦ достигает 80%, и чтобы разорвать эти волокна, нужно приложить силу до нескольких килограммов на квадратный миллиметр [10].

Процесс получения БЦ длительный, поскольку продуценты являются анаэробными клетками (*Achromobacter*), и сложный, поскольку для микроорганизмов-продуцентов синтез БЦ не является целевым. Изучение влияния различных условий культивирования продуцентов на синтез ими БЦ проводится с целью повышения ее выхода. Основные параметры, влияющие на рост целлюлосинтезирующих бактерий и образование БЦ, – это аэрация среды, температура культивирования, концентрация источника углерода, состав питательной среды и наличие ее перемешивания. Реакция микроорганизмов на эти факторы объясняется явлениями индукции и репрессии синтеза ферментов, в результате которых изменяется морфология клеток и их биосинтетическая способность. Для каждого продуцента и конкретного штамма необходимо уточнять технологические параметры, при этом основным из них является температура [11].

Для синтеза бактериальной целлюлозы используются различные субстраты. Наиболее известна питательная среда, где в качестве источника углерода и азота она содержит сахаросодержащие отходы сахарного производства. В качестве восполнителя дефицита азота состав содержит пептон, в качестве источника витаминов - дрожжевой экстракт, ускорителя биосинтеза целлюлозы – этанол [12].

При этом в условиях перемешивания форма бактериальной целлюлозы иная, чем при статических условиях. При перемешивании образцы БЦ имеют неправильную овальную, нитевидную, пальцеобразную и шарообразную форму, и, это объемные элементы, внутри которых накоплена культуральная жидкость. При статических условиях получены тонкие плоские пленки БЦ [13].

1.2. Применение композитов из БЦ

Komagataeibacter xylinus производит чистую целлюлозу более 100 лет. Производство этой бактериальной целлюлозы (БЦ) уделяется большое внимание благодаря своим уникальным свойствам и широкому спектру использования.

1.2.1. Применение в промышленности

Благодаря своей высокой прочности и способности удерживать воду, БЦ использовалась в качестве сырья для производства бумаги и десертов, кроме того, бактериальная целлюлоза использовалась для изготовления искусственной кожи, в 1991 впервые как перспективный материал для тканевой инженерии [13].

- Применение в текстильной промышленности

В текстильной промышленности бактериальную целлюлозу рассматривают как материал для создания новых тканей, поскольку ее можно вырастить практически любой формы и толщины, используя для этого различные подложки. Уже сейчас некоторые прогрессивные дизайнеры экспериментируют с этим перспективным материалом. Одежда может следить за самочувствием своего хозяина, снабжая его через кожу необходимыми лекарственными средствами и полезными веществами, залечивая ранки и воспаления. А если она надоест, ее всегда можно съесть.

- Применение в пищевой промышленности

Целлюлозу бактериального происхождения широко употребляют в пищу на Филиппинах, где она является основным компонентом популярного десерта. Бактерия *Komagataeibacter xylinus* входит в состав культуры симбиотических микроорганизмов, которую называют чайным грибом. Этот продукт жизнедеятельности множества микроскопических грибов и бактерий представляет собой толстую слоистую слизистую пленку, плавающую на поверхности жидкой питательной среды. Чайному грибу приписывают множество целебных и питательных свойств, что свидетельствует о его потенциале при производстве продуктов питания [14].

- Применение в биотехнологической промышленности
Также возможно использование БЦ, в качестве мембран для иммобилизации ферментов и клеток.
- Применение в электронной промышленности
Пленки БЦ используются для изготовления органических светоизлучающих диодов, пленочных солнечных батарей, фотохромных материалов и материалов с жидкокристаллическими свойствами. Наконец, связанные с атомами или ионами металлов, а также химически модифицированные микрофибриллы бактериальной целлюлозы могут использоваться в нанотехнологии в качестве микроскопических электропроводов, а также приборостроении при изготовлении мембран для биологических датчиков.
- Применение в целлюлозно-бумажной промышленности
БЦ используют для изготовления особых сортов бумаги, салфеток и пленок, в пищевой промышленности – в качестве пищевых добавок и загустителей [15].

1.2.2. Применение в медицине

Широкое применение БЦ нашла в медицине – при изготовлении на основе матриц БЦ, композитных раневых покрытий, включающих наночастицы серебра или селена, обладающих антимикробными, противовоспалительными и заживляющими свойствами [16]. Бактериальная целлюлоза находит свое применение в регенеративной медицине для заживления и ремоделирования тканей. Активная роль бактериальной целлюлозы заключается в стимулировании регенерационных процессов. Она помогает восстановлению базальной мембраны, ускоряет эпителизацию и зарубцовывание. При ожогах третьей степени происходит почти чудо. Регенерируются дерма и базальная мембрана, поскольку фибробласты и кератиноциты проникают в поры бактериальной целлюлозы и начинают синтезировать межклеточное вещество. При этом становится возможным осуществить тканевую инженерию —

чужеродный материал служит каркасом, который заполняется дифференцированными клетками и межклеточным веществом. Учеными из Бразилии было доказано, что биоуплотнение, образующая гидрогель во влажном состоянии (92,2% воды), имплантированная в подкожную ткань, не вызывает иммунного ответа со стороны организма и не показывает клинических признаков токсичности, что доказывает ее биосовместимость [17].

- Применение в восстановительной хирургии

Попытки к регенерации хряща были уже сделаны. Показано, что бактериальную целлюлозу можно «сшивать» с различными пептидами или другими высокомолекулярными молекулами для создания определенного терапевтического эффекта. Связанную с остеогенным пептидом роста (OGP) бактериальную целлюлозу вводили мышам, что вызывало у них увеличение экспрессии некоторых костных биомаркеров, таких как *Alpl*, *Spp1* и *Tnfrsf11b*. Кроме того, такие имплантаты стимулировали образование кости в месте дефекта свода черепа у мышей [18]. Недавние исследования группы американских ученых показали, что бактериальная целлюлоза может использоваться для построения углеродных нанотрубок на ее основе, которые могут быть применены в регенеративной медицине, в том числе для регенерации костной ткани [19].

- Применение для замены кровеносных сосудов

Трубочатые формы бактериальной целлюлозы были предложены для использования в качестве замены кровеносных сосудов. В предварительных опытах с животными показано, что трубочатые гель-пленки бактериальной целлюлозы могут применяться в микрохирургии при протезировании кровеносных сосудов внутренним диаметром до 1 мм, а также при протезировании нисходящей аорты и яремной вены. Соответствующий немецкий материал получил название Бейсик. Он обладает высокой механической прочностью, эластичный, гладкий изнутри и, разумеется, биологически совместимый. Очень важно, что такие сосуды не закупориваются тромбами. Постепенно искусственный участок сосуда замещается нормальным

участком за счет миграции эндотелиальных клеток, фибробластов и миоцитов [20].

- Применения для регенерации соединительной ткани

Из БЦ создаются биофильтры, иммобилизующие микроорганизмы и ферменты для наружного и внутреннего применения в медицине. Такая пленка может быть использована в качестве искусственного хряща, костной ткани и как универсальное покрытие при разных видах травм.

Если в волокна бактериальной целлюлозы добавить крахмал, то получится продукт, похожий по структуре на пену. Полученные коллагеновые каркасы биологически активны и подходят для клеточной адгезии, поэтому они могут быть использованы для раневой повязки или в качестве искусственной ткани.

1.2.3. Применение в фармацевтике

Благодаря открытию биоцеллюлозы, появилась возможность создания абсолютно натуральной матрицы, способной быть носителем практически любых лекарственных препаратов, что широко используется в медицине и фармацевтике. Использование природных полимеров для доставки лекарств является активной областью исследований, потому что они легко доступны, относительно недорогие, потенциально способны к разложению и биосовместимые. Использование пленкообразующих материалов в качестве средств для лекарственных препаратов, специализированных покрытий на лекарства или их упаковки [21].

1.3. Особенности раневых покрытий

В настоящее время производство перевязочных средств нового поколения, особенно за рубежом, превратилось в интенсивно развивающуюся отрасль химии полимеров медицинского назначения.

Отправной точкой исследований явилось изменение взглядов на оптимальные условия заживления ран, согласно которым влажная среда

благоприятствует протеканию репарационных процессов. Из этого следует, что раненое покрытие должно не только дренировать раненую поверхность, но и поддерживать оптимальный микроклимат, в частности паро- и воздухопроницаемость. Возросли и прочие требования к повязке, обусловленные развитием и усложнением медицинских технологий, необходимостью повышения эффективности оказания первой врачебной помощи, послеоперационного лечения, а так свидетельствует же значимости эстетического результата. Для достижения поставленных целей повязка должна хорошо моделироваться на ране, быть атравматичной, обеспечивать возможность бесконтактного визуального контроля за раной, не оказывать токсического и местно-раздражающего действия, быть устойчивой к стерилизации, комфортной в ношении, простой в обращении, длительно эксплуатироваться на ране. Кроме того, от перевязочного средства ожидается и лечебное действие, поэтому многие из них являются носителями биологически активных веществ, десорбируемых в рану в необходимой дозировке [22].

Перечисленные свойства — признаки «идеальной повязки» [23], которые можно рассматривать в качестве ориентира научно-исследовательских работ в этой области [24].

Главная роль в осуществлении перечисленных функций перевязочного средства принадлежит полимерной матрице. Многообразие созданных к настоящему времени раненых покрытий объясняется широким спектром используемых полимеров, поскольку именно комплекс их физико-химических характеристик определяет свойства и функции повязки. Несмотря на то, что количество раневых покрытий довольно велико, повязкам, подходящей для всех типов ран, до сих пор не существует. Очевидно, это является закономерным, поскольку при консервативном лечении требуется принимать во внимание фазу и вариабельность течения раненого процесса [25].

Разнообразие перевязочных средств нового поколения привело к необходимости их систематизации. Классификация существующих раневых покрытий осуществляется по различным характеристическим признакам [26].

1.3.1. Раневые повязки на основе природных полимеров

Объектами многих исследований являлись материалы на основе природного полисахарида — целлюлозы и ее производных. Преимуществом целлюлозных волокнистых материалов является наличие сырьевой базы и технологических процессов получения материалов различной формы.

Химическое модифицирование готовых физических форм целлюлозных волокнистых материалов и последующее их использование в качестве носителей лекарственных веществ является наиболее технологичным, т.к. позволяет проводить процесс на существующем оборудовании.

В ряде случаев целлюлоза после химической модификации приобретает собственную физиологическую активность, что позволяет ее использовать в качестве лечебной формы без присоединения лекарственных веществ [27].

В то же время названные производные целлюлозы являются потенциальными матрицами для физической или химической иммобилизации биологически активных веществ. Путем многократной пропитки материала растворимым соединением монокарбоксилцеллюлозы с линкомицином получена так называемая пленка с линкомицином, которая разрешена к применению и предназначена для профилактики и лечения гнойно-воспалительных процессов различной локализации и происхождения, особенно при наличии диффузной кровоточивости тканей [28].

1.3.2. Полимеры на основе альгината

Многие из этих полимеров обладают хорошей биосовместимостью и собственной физиологической активностью, к их числу относится альгинат, оказывающий стимулирующее действие на процессы регенерации. Альгинат образует высоковязкие гели, степень их структурирования можно регулировать введением катионов, например кальция. Этот принцип положен в основу создания множества раневых покрытий в виде губок и волокон. Для повышения эластичности альгинатного покрытия в его состав вводят

полиэтиленоксид. Для придания матрице антимикробных свойств может быть включено антимикробное вещество: фурацилин [29].

1.3.3. Полимеры на основе коллагена

Из числа натуральных полимеров в качестве основы или компонента раневых покрытий довольно часто используется коллаген. Основным препятствием к широкому использованию нативного коллагена является почти полная растворимость в обычных для белка растворителях. В большинстве случаев раневые покрытия на основе коллагена получают в форме губок путем лиофильной сушки композиций разного состава. Растворимость и плотность губок определяется технологией их получения.

Губка может содержать антимикробное (например, фурагин) или анестезирующее вещество. Такое покрытие обеспечивает дренаж отделяемого и сохраняет форму, однако авторы отмечают, что лизис прилегающего к ране слоя и прилипание создают сложности при перевязке.

1.3.4. Гидрогелевые раневые покрытия

К такому типу повязок относятся гидрогелевые в виде пластин плотного геля с защитным слоем или аморфного геля, который наносится на рану, а сверху накрывается салфеткой. Невысыхающие гидрогелевые покрытия имеют ряд преимуществ над марлевыми повязками: заживление происходит быстрее, легче проводятся перевязки, т.к. гидрогель удаляется без повреждения регенерируемой поверхности [30]. Однако отмечается, что в том случае, когда гидрогелевые повязки не содержат антимикробного вещества, создаются благоприятные условия для инфицирования раны. Поэтому перспективными являются гидрогелевые повязки, содержащие антимикробные вещества.

Для получения гидрогелей используют синтетические и природные полимеры. Гелеобразная лекарственная форма с хлоргексидином для лечения повреждений кожных покровов.

1.3.5. Повязки, активированные лекарственными препаратами.

Для повышения лечебного действия повязок в них включают лекарственные препараты различной направленности действия. В качестве носителей для иммобилизации лекарственных веществ, применяются нетканые материалы из поливинилспиртовых волокон, активированные перекисью водорода, хлопчатобумажные перевязочные материалы, окисленные целлюлозные и вискозные волокна, различные губки и пленки. При введении лекарственных препаратов в повязки нередко используют их комбинации. Для борьбы с инфекцией в состав раневых покрытий входят антисептики. Используются также ионы серебра, ксероформ.

В ряде случаев возникает необходимость в локальном применении покрытий, обладающих гемостатическим свойством. Для этой цели возможно применение раневых повязок, содержащих желатин, тромбин, окисленную целлюлозу [31].

1.4. Применение полигидроксиалканоатов в реконструктивной медицине

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – биополимеры оксипроизводных жирных кислот, синтезируются многими прокариотическими микроорганизмами в специфических условиях несбалансированного роста при избытке углеродного и энергетического субстрата в среде и дефиците минеральных элементов (азота, серы, фосфатов и др.), а также кислорода. Среди наиболее перспективных продуцентов ПГА – *Cupriavidus sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Comamonas sp.*, *Hydrogenophaga sp.*, *Chromobacterium sp.*, *Burkholderia sp.* Сырьем для синтеза ПГА могут быть сахара, органические кислоты, спирты, смеси CO₂ и H₂, продукты гидролиза растительного сырья, промышленные отходы производства сахара, пальмового масла, водородсодержащие продукты переработки бурых углей и гидролизного лигнина. ПГА - это семейство полимеров различной химической структуры, образованных

мономерами с длиной C-цепи от C4 до C12 и выше, от высококристаллических термопластов до резиноподобных эластомеров [32].

ПГА обладают пластичностью, термостойкостью, оптической активностью, антиоксидантными свойствами, характеризуются биоразрушаемостью и биосовместимостью, что делает их весьма перспективным материалом для использования во многих сферах человеческой деятельности: от пищевой промышленности до медицины. Однако, свойствами ПГА (кристалличность, механическая прочность, температурные характеристики, скорости биораспада) можно управлять, варьируя в процессе ферментации состав среды и задавая ту или иную химическую структуру. ПГА подвергаются переработке из различных фазовых состояний (порошки, растворы, гели, расплавы) общепринятыми методами. ПГА не гидролизуются в жидких средах, так как деградация ПГА является истинной биологической и происходит клеточным и гуморальным путями, более того, скоростью деградации ПГА можно управлять. Биотехнологический процесс получения полимеров этого класса заключается в культивировании штамма-продуцента в жидкой питательной среде при постоянной аэрации стерильным воздухом и перемешивании в специфическом режиме при избытке углеродного субстрата в среде и несбалансированном росте, когда процесс синтеза основных (азотсодержащих) клеточных макромолекул ограничен каким-либо компонентом субстрата. В качестве продуцента используются штаммы бактерий различных таксономических групп, характеризующиеся способностью синтезировать полимеры различной химической структуры и позволяющие использовать разнообразные субстраты [33].

Наиболее изученным в настоящее время является полигидроксибутират – полимер β-оксимасляной кислоты (C₄H₈O₂). Молекулярная масса полимера определяется условиями синтеза полимера, спецификой продуцента, а также процедурой экстракции полимера из биомассы. Помимо полигидроксибутирата, микроорганизмы способны синтезировать

гетерополимерные ПГА – сополимеры гидроксибутирата и гидроксивалерата, а также трех-, четырех- и более компонентные полимеры.

Сферы применения полигидроксиалканоатов в медицине потенциально широки и могут включать сердечно-сосудистую хирургию, ортопедию, урологию, стоматологию и др. Особенно перспективным считается применение ПГА в клеточной и тканевой трансплантологии для реконструктивной хирургии тканей и создания биоискусственных органов [34].

Сформировавшееся в последние годы мультидисциплинарное направление биоматериаловедения и трансплантологии – тканевая инженерия, остро нуждается в специализированных биосовместимых материалах. Тканевая инженерия ориентирована на создание конструкций, обеспечивающих восстановление, укрепление и улучшение функций тканей. Материалы, применяемые в тканевой инженерии, должны обладать спектром специальных свойств. Прежде всего, продукты деградации материала не должны быть токсичными, конструкция должна сохранять свою форму и обладать достаточной прочностью до тех пор, пока новая ткань организма-хозяина в месте имплантации полностью не восстановится; материал, применяемый для изготовления конструкции, не должен быть иммуногенным, он должен поддерживать рост клеток и организацию их в ткань, в свою очередь, сам имплантат должен беспрепятственно отводить продукты обмена клеток [35].

Техника получения биоактивных имплантатов и биоискусственных органов включает: 1) изготовление биосовместимых и биоабсорбируемых конструкций (инкубаторов) для культивирования аутологических клеток пациента или клеток, взятых из банка, 2) выращивание клеток и формирование тканей *in vitro* и 3) последующую имплантацию полученных конструкций пациенту [36].

Применение таких биоконструкций, дополнительно нагруженных лекарственными препаратами (антибиотиками, гормонами, витаминами, белковыми факторами и др.), является революционным направлением в

реконструктивной и прецизионной хирургии и в трансплантологии и имеет огромные перспективы [37].

Ключевой проблемой для успеха создания таких биоконструкций является наличие адекватного биodeградирующего и биосовместимого материала. В настоящее время ПГА рассматриваются в качестве особо перспективного материала для изготовления матриц при конструировании тканевых протезов и биоискусственных органов. Наиболее многообещающим представляется использование этих полимеров для регенерации поврежденных кожных покровов, изготовления имплантатов кровеносных сосудов и клапанов сердца, закрытия дефектов мягких и костных тканей.

В начале 60-х годов была показана потенциальная применимость полигидроксibuтирата для получения биodeградируемого шовного материала и пластики мягких тканей [38]. Лоскуты из ПГБ с гладкой поверхностью с одной стороны и пористой – с другой оценены в качестве резорбируемых матриц для восстановления повреждений мягких тканей, в частности, желудочно-кишечного тракта. После установления хорошей адгезии фибробластов на поверхности ПГБ, лоскутами из ПГБ, засеянными фибробластами из тонкой кишки, были закрыты хирургические дефекты желудка у крыс [39]. Установлено, что приживляемость лоскута из ПГБ в желудке была лучше, чем лоскуты из викрила. При этом на пористой стороне имплантированного лоскута из ПГБ была отмечена хорошая регенерация тканей желудка и их прорастание в имплантат.

В работе [40] описано применение растворов ПГБ и ПГБ-со-ПГВ в летучих растворителях для покрытия раневых поверхностей, которые после испарения формируют пленку на ране. Это особенно применимо для неотложных состояний. Такие пленки потенциально могут предохранять рану от инфицирования. Описан другой метод использования ПГБ в качестве перевязочного материала [41], заключающийся в получении нетканого волокнистого материала и изготовление на их основе тампонов, марли, корпии и других гигроскопических средств.

Сравнительно недавно [42] оценили применимость ПГБ в качестве матрицы для регенерации кожи. В культурах эпителиальных клеток человека показана хорошая прикрепляемость и пролиферация клеток на поверхности пленок из ПГБ в специально подобранных средах. Описана имплантация сополимерных пленок из 3-ПГБ-со-4-ПГБ в брюшную полость крыс между разрезом в коже и кишечником для предотвращения развития спаек [43]. Через месяц разрез зарубцевался, при этом в месте операции спаек не обнаружено. Имплантированная полимерная пленка, однако, не абсорбировалась в течение года наблюдений.

1.5. Биосовместимость полигидроксиалканоатов

Одно из основных требований, предъявляемых к материалам медицинского назначения, заключается в том, что данные материалы должны быть биологически совместимы с живым организмом. Такие материалы при вживлении в организм и пребывании в нем длительное время не должны вызывать негативных реакций со стороны тканей и организма в целом.

Следует отметить, что понятие «биосовместимость» не имеет четкого толкования до настоящего времени [44]. Биосовместимыми называют материалы, способные сосуществовать совместно с живым организмом, не нанося ему вреда [45]. В расширенном толковании биосовместимости следует подразумевать не только взаимное «сосуществование» двух субстанций (искусственной и естественной), но и то, что искусственный материал должен выполнять функции живой материи. При этом совершенно очевидно, что биосовместимость того или иного материала или имплантируемого элемента определяется не только его химической и надмолекулярной структурой, но и формой, топографией поверхности, спецификой взаимодействия с окружающими тканями [46].

Биосовместимость полигидроксибутирата (ПГБ) основывается на том, что мономер, образующий данный полимер и являющийся продуктом биодegradации ПГБ – *R*-β-гидроксимасляная кислота, является естественным

продуктом обмена высших животных и человека и присутствует в крови последних. Концентрация данной гидроксикислоты у взрослых организмов в норме составляет 3–10 мг на 100 мл крови. Данную кислоту используют в терапевтических целях для восстановления уровня белков, вводят внутривенно пациентам в качестве источника энергии, а также используют в глазной хирургии как увлажняющий раствор для поддержания тканей.

Установлено, что помимо мономеров β -гидроксимасляной кислоты, в животных тканях в составе клеточных мембран присутствуют полимеры β -гидроксимасляной кислоты.

Мономерный компонент 4-полигидроксибутират, 4-гидроксимасляная кислота, также является естественным продуктом обмена и присутствует в тканях внутренних органов, – в мозге, почках, печени, селезенке, а также в мышцах. Установлено, что 4-гидроксимасляная кислота обладает анестезирующим и седативным эффектом и используется в связи с этим в клинической практике.

Таким образом, полигидроксибутират обладает высокой биосовместимостью, однако вследствие хрупкости и невысокой механической прочности имеет существенные ограничения для применения.

Нельзя, однако, не отметить, что реакция клеток и тканей на имплантат зависит не только от химического состава материала, но также и от способов переработки и формы изделий, характеристик поверхности и методов ее обработки, степени химической чистоты материала [47].

2. Материалы и методы исследования

2.1. Получение бактериальной целлюлозы

Для того чтобы получить бактериальную целлюлозу штамм выращивали на питательной среде Hestrin Schramm (HS). Стандартная среда (HS) содержала (г/л): глюкозу - 20, пептон - 5, дрожжевой экстракт - 5, Na_2HPO_4 – 2,7 и лимонную кислоту -1,15, так же в приготовленную среду добавляли этанол 3%

и уксусную кислоту (70%)-0,2мл на 100мл среды. Для приготовления пленки БЦ на субстрате с применением глицерина, вместо глюкозы, как источника углерода в среду добавляли глицерин 5мл/л.

Бактерии выращивали на жидкой питательной среде NS, для этого брали колбу 250мл, добавляли в нее 100мл жидкой среды, автоклавировали при 115°C 25 мин., а затем добавляли культуру бактерий со скошенного агара и культивировали в течение 7 суток при температуре 30°C в термостате, затем полученную БЦ отделяли от культуральной жидкости, очищали в 0,5 % растворе NaOH в течение 24 ч при комнатной температуре, затем помещали в 0,5 % раствор уксусной кислоты на 24 ч для нейтрализации, после чего промывали дистиллированной водой, далее пленки высушивались на воздухе при комнатной температуре до постоянной массы. Массу полученной пленки сырой и сухой определяли на лабораторных весах Adventurer OH-AR2140 (Ohaus, Швейцария).

2.2.Получение композитных пленок П(ЗГБ/4ГБ) с добавлением крошки БЦ

Композитные пленки П(ЗГБ/4ГБ) с добавлением крошки БЦ получали в соотношении 2:1. Для получения композитных пленок из сополимера и БЦ, брали 300мг П(ЗГБ/4ГБ), 150мг бактериальной целлюлозы и 12мл трихлорметана. В раствор сополимера, предварительно растворенного на электромагнитной мешалке (MR Hei-Standart, Германия), вносили крошку бактериальной целлюлозы, полученную на ультрацентрифужной мельнице (Retsch ZM-200, Германия) в соотношении 2:1. Затем методом литья раствора на обезжиренную поверхность с последующим испарением растворителя формировали пленки. Для получения пленок с актовегином, сухие пленки П(ЗГБ/4ГБ)/БЦ погружали в чашки Петри с раствором лекарственного препарата с различной концентрацией: 10,20 и 40мг/мл на 1 час, затем пленки нагруженные лекарственным веществом высушивали при комнатной температуре.

2.3. Изучение свойств пленок БЦ и композитных пленок П(ЗГБ/4ГБ)/БЦ

Поверхностная микроструктура пленок БЦ и композитных пленок П(ЗГБ/4ГБ)/БЦ была проанализирована с помощью сканирующей электронной микроскопии (S 5500, Hitachi, Japan). Перед анализом пленки лиофилизировали в сушилке ALPHA 1-2 / LD (Martin Christ GmbH, Германия) в течение 24 часов. Образцы (5 × 5 мм) помещали на предметный столик и покрывали напылением из золота с использованием распылителя Emitech K575X (10 мА, 2 × 40 с). Диаметры волокон измерялись путем анализа изображений SEM с помощью программы анализа изображений и анализ данных в Java (ImageJ).

Влагопоглощение – это способность материала впитывать и удерживать в порах воду. Образцы пленок БЦ, выращенные на субстрате с применением глюкозы и в другом случае с глицерином, взвешали, затем из каждого образца, вырезали диски диаметром 3,3 см. Полученные диски, погружали заранее подготовленную дистиллированную воду объемом 30 мл. По истечении времени, диск изымался из флакона, излишки воды убирали фильтровальной бумагой, затем образцы взвешивали.

Влагопоглощение образцов определяли по формуле (1)

$$EWC = (W_s - W_d) / W_s \cdot 100 \quad (1)$$

где W_d - вес высушенного образца, г;

W_s - вес образца после экспозиции в жидкости, г.

Краевой угол смачивания водой - угол, который образуется между касательной, проведенной к поверхности фазы жидкость-газ и твердой поверхностью с вершиной, располагающейся в точке контакта трёх фаз, и условно измеряемый всегда внутрь жидкой фазы.

Для изучения свойств поверхности пленок БЦ через краевой угол смачивания работали на приборе KRUSS (Германия) (Рисунок 1).

В качестве твердой поверхности использовались образцы пленок БЦ, образцы вырезали по 1 см шириной. На твердую поверхность наносили поочередно воду и диiodметан. В каждой подложке по центру находилось

отверстие диаметром 2 мм, через которое шприцевым насосом выдавливаются капли по 1,5 мкл каждая. Таким образом, реализовался способ измерения динамических краевых углов методом “сидячей капли”. Процесс растекания фиксировался скоростной видеокамерой. Полученные видеок cadры обрабатывались при помощи программного обеспечения КРУСС, в котором использовался метод Юнга-Лапласа для определения динамики краевого угла смачивания. Данная программа распознаёт профиль капли и определяет её геометрические параметры, такие как краевой угол, диаметр основания, высота, объем, площадь поверхности. Для каждой поверхности было выполнено не менее 6 измерений.



Рисунок 1 – Прибор KRUSS (Германия)

Для изучения суммарной пористости пленок БЦ в начале эксперимента из каждого образца, высекали диск диаметром 3,3 см, взвешивали на весах.

Метод основан на определении объема воды, заполняющей практически все поры матриц при периодическом механическом встряхивании.

На дно воронки Бюхнера аккуратно укладывали бумажный фильтр и смачивали водой. После этого в системе создавали разрежение 80 ± 5 мм вод. ст. В колбе создавали разрежение и фильтр плотно присасывается ко дну воронки.

Испытуемый образец перенесли в воронку Бюхнера и начали отсасывание. Одновременно пускали секундомер. Во время отсасывания поддерживается разрежение 80 ± 5 мм.вод.ст. Через 3 мин прекращали отсасывание и взвешивали образец.

Суммарную пористость V_{Σ} (в $\text{см}^3/\text{г}$) вычисляем по формуле (2)

$$V_{\Sigma} = \frac{G_{в.м} - G_{с.м}}{G_{с.м} * \rho_{в}} \quad (2)$$

где $G_{с.м}$ – вес сухого матрикса, г;

$G_{в.м}$ – вес влажного матрикса, г;

$\rho_{в}$ – плотность воды, г/см.

Плотность воды принята равной 1 г/см, что при точности данного метода справедливо для любой комнатной температуры до 35°C .

Физико-механические свойства исследовали с помощью электромеханической испытательной машины INSTRON 5565(США) (Рисунок 2).

В начале эксперимента измерили поперечные размеры и длину образцов. Для опыта брали 10 полосок по каждому образцу БЦ. Измерение поперечных размеров образца проводили в трех местах, в средней части и на границах рабочей длины образца. Толщину композитов измеряли с помощью электронного цифрового микрометра LEGIONER EDM-25-0.001 (Legioner, Китай). Модуль Юнга (Е, МПа) и удлинение при разрыве (ϵ , %) были автоматически рассчитаны программным обеспечением Instron (Bluehill 2, Elancourt, France).



Рисунок 2 – Прибор INSTRON 5565 (США)

2.4.Изучение выхода лекарственного препарата из композита П(3ГБ/4ГБ)/БЦ+актовегин

Из композитных пленок П(3ГБ/4ГБ)/БЦ в сочетании с актовегином, высекали диски диаметром 1,5см и погружали во флаконы с деионизированной водой объемом 25мл. Диски помещались в деионизированную воду на 1, 3, 7, 10, 14 суток. Из флаконов по истечении времени отбирали 1мл и помещали в пробирку для дальнейшего измерения на спектрофотометре КФК-3-01(Россия), по полученным результатам оптической плотности делали вывод о выходе лекарственного вещества в деионизированную воду.

Для построения калибровочного графика, использовали три раствора лекарственного вещества «Актовегина» с концентрацией 10, 20 и 40 мг/мл, отбирали по 10мкл каждой концентрации и к ней добавляли 990мкл деионизированной воды. Максимум выхода лекарственного вещества был зафиксирован на длине волны $\lambda=315\text{nm}$.

2.5. Получение вытяжки из суспензии бактериальной целлюлозы

Полученную пленку БЦ выращенной на среде Hestrin Schramm с использованием глюкозы измельчали миксером и пропускали через фильтр

(размер пор в фильтре 100 мкм). Заливали полученную суспензию физиологическим раствором и разливали по пробиркам, затем помещали в автоклав и стерилизовали при 115°C в течение 20 минут.

2.6. Оценка иммунотоксичности биополимерных имплантатов по фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов лабораторных грызунов

Оценку иммунотоксичности вытяжки суспензии БЦ проводили по ее влиянию на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов лабораторных мышей и белых крыс. Для эксперимента брали 5 мышей и 5 крыс. Вытяжку из бактериальной целлюлозы (по 0.5 мл) вводили животным (опыт) шприцом внутривентрально, по среднебрюшной линии в нижней трети. Контроль вводили физиологический раствор. Через семь суток животных усыпили эфиром, и сразу же асептически внутривентрально ввели 2 мл ЭТС (Эмбриональная телячья сыворотка). После массажа брюшной полости (для получения большего количества перитонеальных клеток) введенную среду откачивали шприцом. Суспензию клеток в боксе-ламине стерильно разлили по 2 мл в пластиковые чашки Петри диаметром 40 мм и поместили в гумидную атмосферу на 2ч при 37°C. После 2 ч. инкубации всю жидкую фракцию удалили с помощью пипетки и добавили по 1мл ЭТС, затем снова убрали всю жидкость, и оставили в чашках Петри только макрофаги, далее добавили 2 мл ЭТС, нейтральный красный и инкубировали в течение 60 мин. После повторной отмывки ЭТС в чашки Петри добавляли 3 мл лизирующего раствора (для лизиса макрофагов, поглотивших краситель). Степень поглощения красителя макрофагами опытной группы оценивали по оптической плотности лизирующего раствора в сравнение с данными в контроле - внутривентральная жидкость животных после введения физиологического раствора.

2.7.Схема эксперимента по применению раневого покрытия на ожоговых ранах лабораторных животных

Экспериментальные исследования по применению раневого покрытия для ожоговых ран были проведены на 18 крысах линии Вистар. Вес крыс составлял 25-30 г. Все животные были одного возраста (3-5 месяцев). Проведение экспериментов одобрено Локальным этическим комитетом Сибирского федерального университета. Эксперимент проводился после предварительной адаптации крыс в виварии в течение 10 суток. Крыс содержали на обычном рационе вивария. После нанесения ожога каждая крыса находилась в отдельной клетке. Лабораторные животные были разделены на экспериментальные группы в зависимости от вида раневого покрытия (Таблица 1).

Таблица 1 – Распределение животных по группам в зависимости от вида раневого покрытия

Номер группы	Материал	Число особей
№1(контроль)	Воскопран	6
№2	Композитный материал П(ЗГБ/4ГБ)/БЦ	6
№3	Композитный материал П(ЗГБ/4ГБ)/БЦ+ актовегин	6

Существует несколько моделей повреждения кожного покрова у лабораторных животных. В своей работе нанесение ожога производили стальной печаткой, диаметром 16 мм, нагретой до 100°С в кипящей воде в течение 10 минут. Время экспозиции на ране составило 8 секунд для формирования ожогового поражения кожи II степени по классификации МКБ-10.

Моделирование ожога производили наркотизированным животным (внутримышечно медитин 0,2мл, пропофол 0,3мл). Перед операцией выбривали участок размером 3см² в межлопаточной области, протирали хлоргексидином.

На свободную от волос кожу крыс прикладывали печатку на 8 секунд время экспозиции на ране печатки для получения ожога II степени было определено предварительно на основании гистологического исследования кожи после произведенных таким образом ожогов с разной экспозицией. После ожога рана становилась белого цвета, эпидермис плотно держался на ране, пузыри отсутствовали. Спустя 5-10 минут эпидермис при помощи стерильного марлевого тампона отслаивали от подлежащей дермы (Рисунок 3).



Рисунок 3 – Моделирование ожогового поражения кожи II степени с помощью стальной печатки

В группе №1 (контроль) кожный дефект покрывали коммерческим материалом из полиамидной сетки "ВоскоПран" и фиксировали одиночными хирургическими швами по краям раны.

В группе № 2 и 3 рану покрывали повязкой из композитного материала П(ЗГБ/4ГБ)/БЦ и П(ЗГБ/4ГБ)/БЦ+актовегин, данные раневые покрытия так же фиксировали одиночными хирургическими швами по краям раны

После закрытия раны покрытием каждая крыса была помещена в отдельную клетку. Длительность наблюдений составила 14 суток.

Критериями оценки эффективности раневых покрытий служили выраженность воспалительной реакции в ране и окружающих мягких тканях, скорость и полноценность восстановления кожного покрова.

Изменение площади раневой поверхности определяли по методу Л. Н. Поповой [48] с определением скорости заживления раны. Для гистологических исследований биопсию кожи производили после выведения животных из эксперимента на 3, 7, 14 сутки эксперимента после начала терапии. Послойные фрагменты тканей из области раны с захватом краев удаляли и фиксировали в 10% растворе формалина. После стандартной гистологической проводки и заливки в парафин готовили гистологические срезы, которые были окрашены гематоксилином и эозином.

3. Результаты и обсуждения исследований

3.1. Получение пленок бактериальной целлюлозы

Был проведен сравнительный анализ образования бактериальной целлюлозы на питательной среде с глюкозой и глицерином в качестве источника углерода. Пленки бактериальной целлюлозы были получены при культивировании штамма *Komagataeibacter xylinus* на жидкой среде NS в поверхностных условиях. Через 7 суток сырая масса пленок, выращенная на питательной среде с глюкозой, в среднем составила $52,04 \pm 11,66$ г/л, сухая масса пленки $0,363 \pm 0,018$ г/л (Рисунок 4). Масса сырых пленок, выращенных на субстрате с глицерином, в среднем составила $55,43 \pm 13,23$ г/л, сухая масса пленки $0,429 \pm 0,071$ г/л (Рисунок 5).

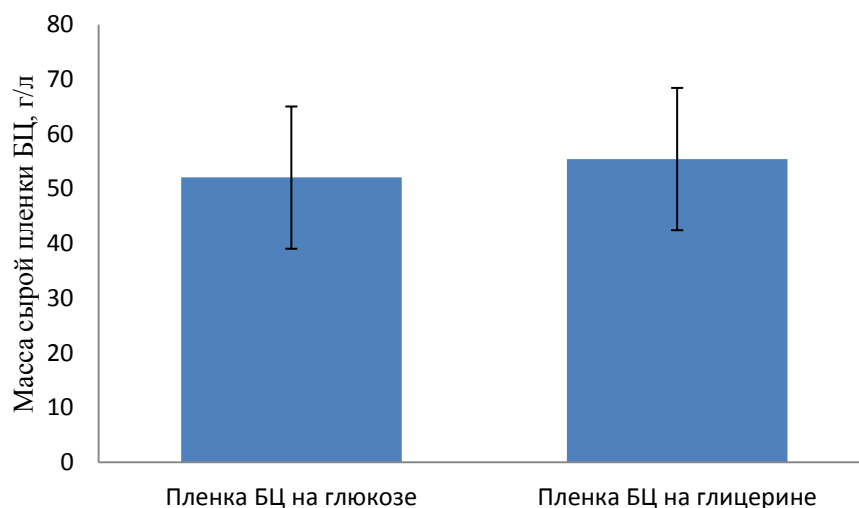


Рисунок 4 – Масса сырых пленок БЦ

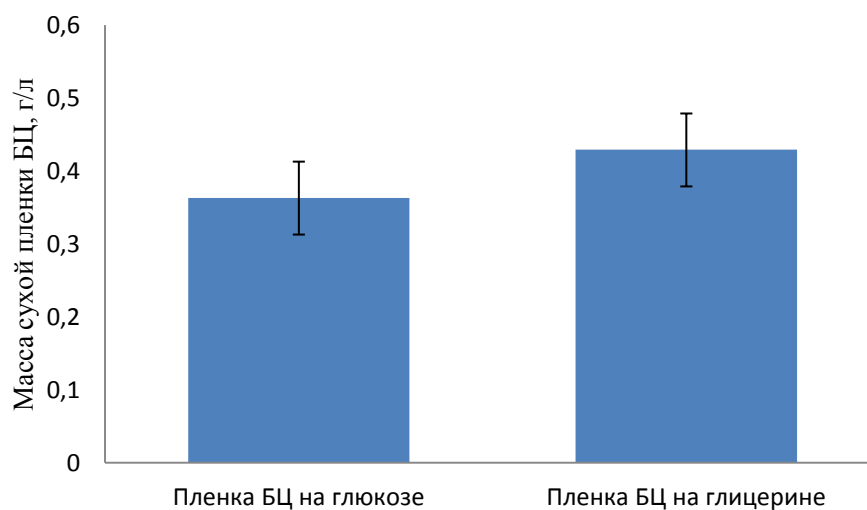


Рисунок 5 – Масса сырых пленок БЦ

Экономический коэффициент процесса составил 2,60 г сырой БЦ и 0,01 г сухой БЦ на 1 г глюкозы; 8,82 г сырой БЦ и 0,06 сухой БЦ на 1 мл глицерина. Таким образом, урожайность при синтезе пленок БЦ на среде с глицерином увеличивалась на 18,8%, а экономический коэффициент вырос в 6 раз по сравнению с аналогичными показателями при культивировании штамма на среде с глюкозой.

3.2 Свойства полученных пленок БЦ

Получены пленки БЦ на глюкозе и глицерине диаметром 8,5см, массой $0,396 \pm 0,019$ г, отличающиеся по толщине в 2,5 раза, пленки на глюкозе толщиной 86,16 мкм, пленки БЦ на глицерине 33,9 мкм.

[Изъята 1 страница]

По результатам измерений влагопоглощения образцов пленок БЦ, выращенных на глюкозе и глицерине, установлено, что образцы пленок БЦ на глюкозе обладают наибольшими сорбционными свойствами (90,46%), в отличие от образцов на глицерине (83,84%) при тех же условиях (Рисунок 9).

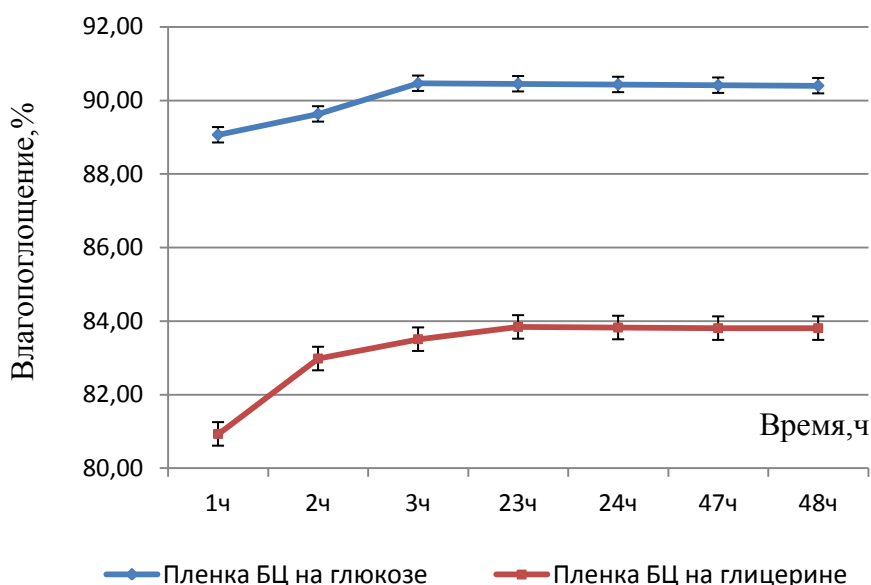


Рисунок 9 – Влагопоглощение пленок БЦ

По данным измерений контактного краевого угла смачивания водой доказано, что поверхность полученных пленок БЦ как на глюкозе, так и глицерине является достаточно гидрофильной.

Для кожных эквивалентов пористость является важным критерием так как влияет на адгезию и пролиферацию культивируемых клеток, а также на паро- и влагопроницаемость используемого материала.

При изучении пористости пленок БЦ были получены следующие значения: для пленки БЦ, выращенной на глюкозе суммарная пористость составляла 3,41 см³/г, для пленки БЦ на глицерине значение пористости составило 1,83 см³/г.

Из этого следует, что наиболее пористые образцы пленок получены при культивировании на глюкозе, что согласуется с результатами электронной микроскопии.

[Изъята 1 страница]

3.3.Свойства пленок П(ЗГБ/4ГБ), П(ЗГБ/4ГБ)/БЦ и пленок БЦ синтезированных на глюкозе

Композитные пленки П(ЗГБ/4ГБ)/БЦ получены из 3% полимерного раствора П(ЗГБ/4ГБ) с крошкой БЦ в соотношении 2:1 и с добавлением актовегина в трех концентрациях: 10, 20 и 40 мг/мл. По данным макросъемки композитные пленки имели шероховатую поверхность, белый цвет с включениями частиц БЦ, что также подтверждено результатами электронной микроскопии (Рисунок 10).

[Изъято 2 страницы]

3.4.Изучение выхода лекарственного препарата из композита П(ЗГБ/4ГБ)/БЦ+актовегин

Проведено исследование выхода актовегина в деионизированную воду из композитного материала ПЗГБ/4ГБ+БЦ с различной начальной нагрузкой лекарственного вещества (10, 20 и 40 мг/мл). Установлено, что максимальный выход актовегина из композитного материала ПЗГБ/4ГБ+БЦ, зарегистрированный при первоначальной концентрации в образце 40 мг/мл на 7-е сутки эксперимента, составил 0,47 мг/мл или 43% от включенного.

[Изъята 1 страница]

3.5.Проверка вытяжки из суспензии бактериальной целлюлозы на стерильность

Прежде чем проводить эксперименты на животных, была проделана работа по изучению стерильности вытяжки из бактериальной целлюлозы.

Изучая стерильность вытяжки из бактериальной целлюлозы на среде Мюллера-Хинтона, рост посторонней микрофлоры не обнаружен.

[Изъята 1 страница]

3.6. Определение иммунотоксичности вытяжки бактериальной целлюлозы

Была исследована оптическая плотность раствора после лизиса перитонеальных макрофагов, поглотивших краситель нейтральный красный. В соответствии с методом увеличение поглотительной способности макрофагов говорит об активации иммунитета при введении чужеродного или токсического вещества. Контрольной группе грызунов вводили физиологический раствор, а опытной группе – вытяжку суспензии из бактериальной целлюлозы. Сравнительный анализ показал, что в контрольной

и опытной группе оптические плотности достоверно не отличались, это наблюдалось и у крыс и у мышей (Рисунок 13-14).

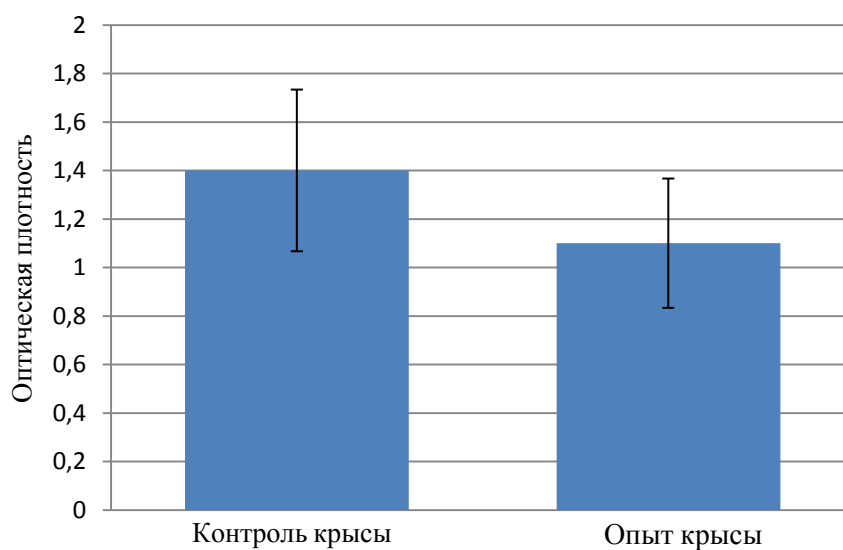


Рисунок 13 – Сравнительный анализ оптической плотности раствора после лизиса макрофагов опытной и контрольной группы крыс

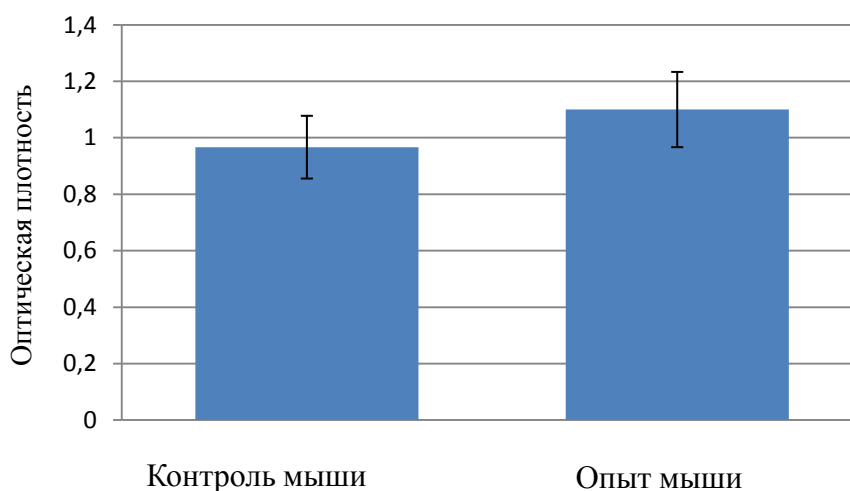


Рисунок 14 – Сравнительный анализ оптической плотности раствора после лизиса макрофагов опытной и контрольной группы мышей

Таким образом, отсутствуют достоверные отличия между контрольной и опытной группой грызунов, значит, макрофагальная активность при введении вытяжки бактериальной целлюлозы не изменилась, следовательно, она не обладает иммунотоксичным действием.

3.7. Исследования эффективности экспериментальных раневых покрытий на лабораторных животных

В экспериментальных группах использованы 2 типа разработанных раневых покрытий: композитный материал П(ЗГБ/4ГБ)/БЦ; композитный материал в сочетании с лекарственным препаратом П(ЗГБ/4ГБ)/БЦ+актовегин, в качестве контроля использовали коммерческий препарат «ВоскоПран», данные раневые покрытия были исследованы на модели ожоговых ран II степени лабораторных крыс линии Вистар.

После хирургического вмешательства в течение всего периода наблюдения все подопытные животные были здоровы и активны, охотно потребляли пищу и могли самостоятельно передвигаться.

Признаков гнойных осложнений среди животных 3 групп на 3 сутки эксперимента не выявлено. При визуальном осмотре ран у животных как контрольной, так и опытной групп отмечались воспаления, незначительная отёчность. При визуальном осмотре ран у животных были выявлены воспаления и незначительная отёчность, выраженные в большей степени в контрольной группе.

На 7 сутки во всех группах было отмечено сокращение раневого дефекта, наблюдалась регенерация, а так же по сравнению с 3 сутками отмечалось уменьшение отека.

На 14 сутки в контрольной и опытной группе наблюдалась активная регенерация кожи, а в опытной группе №3 у некоторых особей восстановление кожных покровов (Рисунок 15).

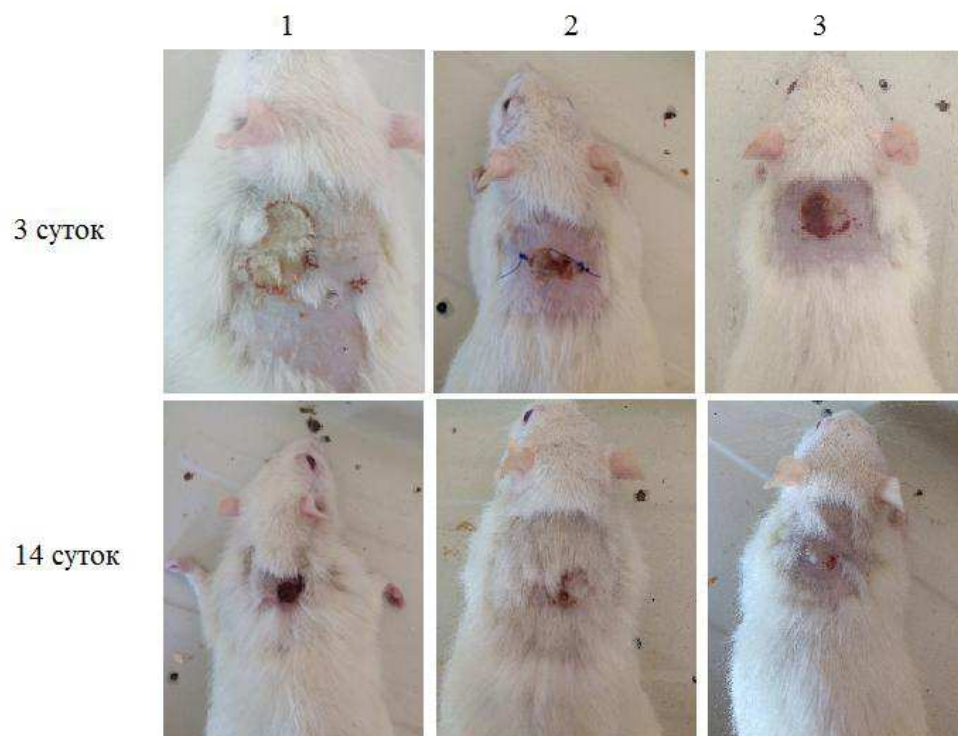


Рисунок 15 – Фото состояния ожоговых ран в процессе заживления при использовании коммерческого материала «ВоскоПран» (1) и экспериментальных раневых покрытий: 2 –П(ЗГБ/4ГБ)/БЦ; 3–П(ЗГБ/4ГБ)/БЦ+актовегин; 3, 14 сутки эксперимента

[Изъято 2 страницы]

ВЫВОДЫ

1. Поверхностным способом на различных субстратах получена и исследована бактериальная целлюлоза в культуре штамма *Komagataeibacter xylinus*. Установлено, что урожайность при синтезе пленок БЦ на среде с глицерином увеличивалась на 18,8%, а экономический коэффициент вырос в 6 раз по сравнению с аналогичными показателями при культивировании штамма на среде с глюкозой.

2. Проведено сравнительное исследование свойств пленок БЦ выращенных на различных субстратах, установлено, что пленки БЦ, синтезированные на глюкозе, более эластичные, имеют более высокие значения пористости и влагопоглощения, следовательно, имеют лучшие показатели для применения в качестве раневого покрытия по сравнению с пленками БЦ, синтезированными на глицерине.

3. Получены и исследованы композиты на основе П(ЗГБ/4ГБ) и БЦ, в том числе нагруженные актовегином, показана их применимость в качестве раневого покрытия. Установлено, что в зависимости от степени нагруженности лекарственным препаратом (актовегином), динамика его выхода была различной. Был зарегистрирован максимальный выход актовегина из композитных пленок с первоначальной концентрацией 40 мг/мл, который составил 43% от включенного.

4. По фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов доказано отсутствие иммунотоксичности вытяжки суспензии бактериальной целлюлозы для лабораторных грызунов.

5. В эксперименте на лабораторных животных с модельными ожоговыми ранами по данным планиметрии и гистологических исследований доказана высокая эффективность разработанных композитных раневых покрытий на основе П(ЗГБ/4ГБ)/БЦ в сочетании с актовегином, по сравнению с коммерческим материалом «ВоскоПран».

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Castro, C. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes / C. Castro, R. Zuluaga, J-L. Putaux, G. Caro // *Carbohydrate Polymers*. – 2011. V. 84, №. 1. – P. 96-102.
2. Санкт-петербургский университет, Чудо-пленки, или слово о бактериальной целлюлозе [Электронный ресурс], 2007.– Режим доступа: <http://www.spbumag.nw.ru/2007/03/9.shtml>
3. Qiu, K. Biodegradable polymer nanocomposites / K. Qiu, A.N. Netravaliv // *Ed. Nova Science* . – 2015. V1. – P.325–334.
4. Баснакьян, И. А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами / И. А. Баснакьян // *Журнал Медицина*. – Москва, 2002– С. 192.
5. Varsha, J. Reactions relating to carbohydrates and polysaccharides. XLVI. Structure of the cellulose synthesized by the action of *Acetobacter xylinus* on fructose and glycerol / J. Varsha, H. Hibbert // *Canadian Journal of Research*. – 1994. – № 10. P. 170-179.
6. Ефременко, Е.Н. Бактериальная целлюлоза, биокаталитический синтез и применение / Е.Н. Ефременко, Н.А. Степанов, Т.А. Махлис, С.Д. Варфоломеев // *Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН-М*. – 2011– С. 763-789.
7. Ross, P. Cellulose biosynthesis and function in bacteria / P. Ross, R. Mayer, M. Benziman // *Journal of Medical Microbiology*. – 1991. – P. 55, 35–58.
8. Goh, W.N. Fermentation of black tea broth (Kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose / W.N. Goh, A. Rosma, B. Kaur // *International Food Research Journal*. – 2012. – P. 109-117.
9. Faezah, E. Overview of Bacterial Cellulose Production and Application / E. Faezah, F. Rahman // *Biochemical Journal*. – 2014. – P.532
10. Лияськина, Е.В. Биотехнология бактериальных экзополисахаридов / Е.В. Лияськина, В.В. Ревин, М.В. Грошев // *Мордов. ун-т*. – Саранск, 2010. – С.73.

11. Гладышева, Е.К. Современные наукоемкие технологии / Е.К. Гладышева // Вестник. – 2016. – С. 8, 36.
12. Хрипунов, А.К. Состав питательной среды культивирования *Acetobacter xylinus* для получения бактериальной целлюлозы / А.К. Хрипунов, А.А. Ткаченко // Химия растительного сырья. – 2008. – № 1. – С.384.
13. Muthukumarasamy, R. Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice / R. Muthukumarasamy // Systematic and applied microbiology. – 2005. – Т. 28. №. 3. – P. 277-286.
14. Cirul, A. Bacterial Cellulose Film Coating as Drug Delivery System / A. Cirul, I. Mond, A. Mond, A. Jamin // Physicochemical. – 2012. – P. 561–568.
15. Koon-Yang, L. More than Meets the Eye in Bacterial Cellulose: Boisynthesis, Bioprocessing, and Applications in Advanced Fiber Composites / L. Koon-Yang, G. Buldum // Macromolecular Bioscience. – 2014. – № 6. – P. 10-32.
16. Юркевич, Д.И. Чайный гриб: научная история, состав, особенности физиологии и метаболизма / Д.И. Юркевич, В.П. Кутышенко // Биофизика. – 2002. – № 6. – С. 1116-1129.
17. Frago, A. Dielectric study of the adhesion of mesenchymal stem cells from human umbilical cord on a sugarcane biopolymer / A. Frago, M. Silva, J. Aguiar, C. Rodrigues, D. Oliveira // J Mater Sci Mater Med. – 2014. – P.229-37
18. Ensuncho, L. Removal of aqueous phenol using immobilized enzymes in a bench scale and pilot scale three-phase fluidized bed reactor / L. Ensuncho, M. Alvarez-Cuenca, R.L. Legge // Bioprocess. Biosyst. Eng. – 2005 – P.185-191
19. Karam, J. Potential applications of enzymes in waste treatment / J. Karam, J.A. Nicell // Journal Biotechnol. – 1997. – P.141–153.
20. Madigan, M. Brock Biology of Microorganisms / M. Madigan, J. Martinko // Biotechnol. – 2005. – P.547-563.
21. Franke, I. H. Description of *Gluconacetobacter sacchari* sp. nov., a new species of acetic acid bacterium isolated from the leaf sheath of sugar cane and from

the pink sugar-cane mealy bug / I. H. Franke // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. –1999. V. 49. №. 4. – P.1681-1693.

22. Назаренко, Г. И. Рана. Повязка. Больной. / Г. И. Назаренко, И. Ю. Сугурова, С.П. Глянцев // Руководство для медсестер. – Москва, 2002.– С.315.

23. Федоров, В. Д. Биологически активные перевязочные средства в комплексном лечении гнойно-некротических ран / В. Д. Федоров // Руководство для медсестер. –Москва, – 2000.– С. 217

24. Жуковский, В.А. Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств, шовных материалов и полимерных имплантатов / В.А. Жуковский, С.Ю. Коровичева, А.В. Лисовска // Материалы II межд. Конф. – Москва, 2005 – С. 314-316.

25. Кузин, М. И. Раны и раневая инфекция / М. И. Кузин, Б. М. Костюченко // Руководство для медсестер.– Москва, 2001.– С.22.

26. Чистяков, А.А. Современные подходы к разработке клиническому применению эффективных перевязочных средств, шовных материалов и полимерных имплантатов / А.А Чистяков // Материалы IV межд. Конф. – Москва, 2006. – С.23.

27. Калуцкий, Ф. Н. Лекарственные препараты на основе производных целлюлозы / Ф. Н. Калуцкий, Т. Л. Юркштович // Уч.пособ.– Минск, 1989. – С.124.

28. Холоденко, Б.Л. Лекарственные препараты на основе модифицированных полисахаридов / Б.Л. Холоденко // Тез. докл. межд. симп., НИИ ФХГТ. –Минск, 2000. –С.62-63.

29. Машковский, М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский // Торсинг. – Харьков, 1997. – Т.1. –С. 344.

30. Васильев, М.П. Биологически активные коллагеновые волокна и волокнистые материалы / М.П. Васильев, Л.А. Вольф // Хим. волокна. – Тверь, 2001. – №6. – С.39-41.

31. Кивман, Г. Я. Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств / Г. Я. Кивман, Ю. В. Ляшенко, З.З. Рабинович, Л. И. Флейлерман // Хим. – фарм. журн. – 1994. – С.41-43.

32. Федорова, В.Д. Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств, шовных материалов и полимерных имплантатов / В.Д. Федорова, А.А. Адамян // МЭ РФ. – Москва, 2008. – С.367.

33. Волова, Т.Г. Разрушаемые биополимеры: получение, свойства, применение / Т.Г. Волова, Е.И. Шишацкая. – Красноярск: Красноярский писатель, 2011. – 392 с.

34. Войнов, Н. А. Современные проблемы и методы биотехнологии / Н. А. Войнов, Т. Г. Волова, Н. В. Зобова, С. В. Маркова, Л. А. Франк, Е. И. Шишацкая // Электронный учебно-методический комплекс. – 2010.

35. Бессонова, В.А. Полигидроксиалканоаты – новые биоматериалы / В.А. Бессонова, К.М.Ануфриева // Современные научные исследования и инновации. –2016.–№ 7–2С.

36. Williams, S. F. Peoples O. P. PHA applications: addressing the price performance issue. I. Tissue engineering / S. Williams, F. Martin, D. P. Horowitz // Int. J. Biol. Macromol. – 1999. V. 25, № 1–3. – P. 11–121

37. Волова, Т.Г. Полиоксиалканоаты- биоразрушаемые полимеры для медицины / Т.Г. Волова, В.И. Севастьянов, Е.И. Шишацкая.–Красноярск: изд. СО РАН, 2003–330с.

38. Baptist, J. N. Method of making absorbable surgical sutures from poly beta hydroxy acid / J. N. Baptist, J. B. Ziegler // US Patent № 3 229 766. – 2005.

39. Behrend, D. Resorbable scaffold for tissue engineering / D. Behrend, C. Nishan Kunzer, M. Sass Schmitz. // Proc. European Medical and Biological Engineering Conference. – 1999. V. 37– P. 1510–1511.

40. Webb, A. Wound dressings/ A. Webb, J. R. Adsetts // UK Patent Application № 2 166 354. – 17.09.1986.

41. Steel, M. L. Non-woven fibrous materials / M. L. Steel, P. Norton–Berry // US Patent № 4 603 070. – 1986.

42. Davies, S. Cell attachment to gel-spun polyhydroxybutyrate fibers/ S. Davies, B. Tighe // Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.). – 1995. V. 36. – P. 103–104.

43. Ishikawa, K. Flexible triempler for use as a medical bag/ K. Ishikawa // US Patent № 5 480 394. –10.07. 1996.

44. Севастьянов, В. И. Пути повышения гемосовместимости биомедицинских изделий. / В. И. Севастьянов, Е. А. Немец // ИЦ ВНИИ геосистем. – Москва, 1999. – С. 295–352.

45. Тандзава, Х. Полимеры, совместимые с живым организмом / Х. Тандзава // В кн. Полимеры медицинского назначения.– 2001. –87 с.


46. Пхакадзе, Г.А. Полимеры медицинского назначения / Г.А. Пхакадзе // Биосовместимость. –1999–С.143.

47. Hocking, P. J. Biopolyesters / P. J.Hocking, R. H. Marchessault // Chemistry and technology of biodegradable polymers. – 2014. – P. 48–96.

48. Попова, Л. Н. Как измеряются границы вновь образующегося эпидермиса при заживлении ран : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Воронеж, 1947. – 26 с.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

 Т.Г. Волова

« 18 » июня 2018 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Медико-биологическое тестирование биосовместимых природных полимеров
микробного происхождения для реконструктивной хирургии

Руководитель




д.б.н.

д.б.н.

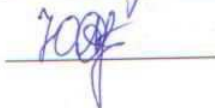
к.б.н.

С.В. Прудникова

Е.И. Шишацкая

А.А. Шумилова

Выпускник



Ю.А. Сковородина

Красноярск 2018