

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

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующая кафедрой  
\_\_\_\_\_ Т.Г. Волова  
« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 - Биология

ИЗУЧЕНИЕ БИОРАЗРУШАЕМЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ РЕПАРАЦИИ  
КОЖИ

Научный руководитель \_\_\_\_\_ профессор, д.б.н Шишацкая Е.И.

подпись, дата      должность, ученая степень      инициалы, фамилия

Выпускник \_\_\_\_\_ Шароватова Н.В.

подпись, дата      инициалы, фамилия

Красноярск 2021

## Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Строение кожи	7
1.2 Традиционные способы восполнения тканевого дефицита кожи	8
1.2.1 Ксенотрансплантаты	8
1.2.2 Аутоотрансплантаты	9
1.2.3 Аллотрансплантаты	10
1.3 Тканевая инженерия кожи	11
1.3.1 Тканеинженерные заменители кожи	11
1.3.2 Синтетические кожные заменители	12
1.4 Биоматериалы для тканевой инженерии кожи	14
1.4.1 Натуральные полимеры	14
1.4.1.1 Коллаген	14
1.4.1.2 Фибрин	15
1.4.1.3 Гиалуроновая кислота	16
1.4.1.4 Хитозан	17
1.4.1.5 Альгинат и агароза	18
1.4.2 Синтетические полимеры	18
1.4.2.1 Поликапролактон	19
1.4.2.2 Полиэтиленгликоль	20
1.4.2.3 Поливиниловый спирт	20
1.4.2.4 Полигидроксиэфир	21
1.4.2.4.1 Полигидроксиалканоаты	21

1.4.2.4.2	Виды полигидроксиалканоатов	23
1.4.2.4.3	Поли-3-гидроксibuтират	24
1.5	Технологии клеточных культур	24
2	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	27
2.1	Объекты исследования	27
2.2	Изготовление полимерных пленочных образцов	27
2.3	Изучение свойств поверхности пленочных образцов	28
2.4	Ведение клеточной культуры	29
2.5	Исследования цитотоксичности полимерных пленочных образцов	29
2.5.1	Оценка абсолютного количества адгезированных клеток	30
2.5.2	МТТ-тест	31
2.5.3	Окраска клеток флуоресцентными красителями DAPI и FITC	32
2.6	Статистическая обработка	32
3	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	33
3.1	Получение пленочных образцов и изучение их свойств поверхности	33
3.3	Исследование цитотоксичности полимерных пленочных образцов	34
3.3.1	Оценка абсолютного количества адгезированных клеток на пленочных образцах	34
3.3.2	МТТ-тест	35
3.3.3	Изучение клеток после окраски флуоресцентными красителями	37
	ВЫВОДЫ	38
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:	39
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:	40

## ВВЕДЕНИЕ

Различные заболевания кожи в современном мире достаточно широко распространены среди населения всего земного шара и значительно влияют на качество жизни человека. Демографически число больных, страдающих хроническими ранами и нарушенными условиями заживления, достигает масштабов эпидемии и становится еще более обременительным как с точки зрения здоровья человека, так и с экономической [1].

В связи с ростом числа разного рода травм, стихийных бедствий, а также военных конфликтов одной из наиболее актуальных медико-социальных проблем науки является восстановительное лечение ран, использующее различные биоматериалы. Стимулом развития отечественной индустрии биоматериалов - кожных трансплантатов считается их значительная востребованность для лечения поврежденной кожи при ожогах, травмах, затяжных продолжительно незаживающих ранах, в терапевтической косметологии с целью омолаживающей терапии [2].

Кожа является барьером между внутренней и внешней средой и является самым большим органом человеческого тела. Она занимает с учетом подкожно-жировой клетчаткой до 25% от общей массы тела взрослого человека и обеспечивает защиту от внешних физических, химических и биологических агентов [3].

Благодаря наличию резидентных стволовых клеток, поврежденный эпидермис способен реализовать самовосстановление, однако при глубоких травмах и ожогах естественный процесс заживления не является адекватным, что приводит к несовершенной репарации, заключающейся в формировании хронических ран и рубцов. Потеря толщины кожи и подлежащих мягких тканей по любым причинам более 4 см нуждается в пересадке кожи для его лечения [4]. Кроме того, любая травма часто приводит к острым ранам кожи. После завершения процессов репарации без специфического лечения на месте ран формируются, так называемые, доброкачественные рубцы [11]. Лечение

пространных ран кожи и мягких тканей составляет значительный сегмент расходов на здравоохранение. При стандартном восстановлении кожи при помощи ауто- и аллотрансплантации существует выраженный дефицит доступной здоровой донорской ткани.

Альтернативой традиционным стратегиям заживления ран и регенерации мягких тканей служат тканеинженерные (ТИ) заменители кожи. Среди ТИ органов кожа была первым биоинженерным органом, который прошел путь от лабораторных исследований до применения в клинике [5]. В последние десятилетия были разработаны различные биоинженерные и синтетические заменители, которые, как правило, позиционируются для одномоментного лечения в острой фазе повреждений и обеспечивают барьерную функцию наряду с защитой от микроорганизмов, уменьшением боли в ранах и стимулированием заживления ран путем регенерации тканей [3-5].

В тканевой инженерии используют различные материалы природного и синтетического происхождения.

В последнее время популярностью в исследованиях материалов для ТИ заменителей кожи пользуются биodeградируемые полиэфиры бактериального происхождения – полигидроксиалканоаты (ПГА) [14]. Этот класс полимеров обладает несколькими преимуществами, так как подходит под требования, предъявляемые для создания искусственного внеклеточного матрикса (ВКМ) многих тканей, в том числе базальной мембраны дермы. В первую очередь это такие важные свойства, как биосовместимость и биodeградация.

Последние годы исследователями был доказан потенциал применения полимеров ПГА в качестве раневых повязок для лечения больших кожных дефектов, а именно ожоги и гнойные раны. Показано, что раневые покрытия пленочного типа из ПГА отлично имитируют ВКМ и создают условия для поддержки главных физиологических функций кожи [6]. В России подобного рода исследования не проводятся.

Цель работы – получить и исследовать пленочные образцы из поли-3-гидроксибутират-со-поли-3-гидроксивалерата с включением валерата 10 %

(П(ЗГБ\ЗГВ10)) с высокой степенью очистки в качестве основы для тканеинженерного заменителя кожи.

Для выполнения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Изготовить пленочные образцы с из (П(ЗГБ\ЗГВ10)) разной степени очистки и сравнить их.
2. Исследовать пленочные образцы на цитотоксичность:
  - А. Провести МТТ-тест на пленочных образцах.
  - Б. Исследовать абсолютное количество адгезированных клеток на поверхности пленочных образцов и провести сравнительный анализ.
  - В. Изучить морфологию клеток HeLa, культивируемых на поверхности пленочных образцов.
3. Исследовать свойства поверхности и провести сравнительный анализ поверхностных характеристик пленочных образцов из (П(ЗГБ\ЗГВ10)) с разной степенью очистки.

# 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Строение кожи

Кожа - это орган, образующий общий покров тела. В ней заложены чувствительные нервные окончания, потовые и сальные железы, мышцы и волосяные фолликулы. Она помогает нам регулировать температуру тела, выполняет метаболические функции, осуществляет синтез витаминов, защищает нас от повреждений ультрафиолетом и различных инфекций, является органом осязания, благодаря чему мы можем воспринимать раздражения окружающей среды.

Кожа состоит из трех слоев: эпидермиса, дермы и подкожной клетчатки. Эпидермис имеет множество слоев, с клетками, простирающимися от базальной мембраны до дермы. Самая внешняя часть эпидермиса (роговой слой) в толстой коже состоит из 15-20, а в тонкой - 3-4 слоев роговых чешуек. Между чешуйками располагается межклеточный цемент, состоящий из смеси липидов. Эти липиды обуславливают водонепроницаемость рогового слоя эпидермиса, и, таким образом, роговой слой препятствует проникновению патогенов и других инородных веществ в организм. В эпидермисе различают несколько типов клеток: кератиноциты, меланоциты, клетки Лангерганса (внутриэпидермальные макрофаги) и клетки Меркеля.

Дерма является самым толстым из трех слоев кожи и находится чуть ниже эпидермиса. Это соединительная ткань, состоящая из ВКМ, фибробластов, эндотелиальных клеток сосудов кожи, а также волосяных фолликулов, потовых желез, сальных желез, кровеносных сосудов и нервных окончаний. Фибробласты являются основными клетками дермы, которые синтезируют коллаген и эластин и, таким образом, обеспечивает механическую прочность и эластичность кожи.

Под дермой находится слой подкожной жировой ткани. Он обеспечивает изоляцию и амортизацию между кожей и скелетными структурами, такими как кости и мышцы, а также служит для хранения энергии.

## **1.2 Традиционные способы восполнения тканевого дефицита кожи**

В наше время общепринятая тактика лечения ран большой площади имеет следующие принципы: профилактика и борьба с инфекцией и интоксикацией; принятие во внимание общей реакции организма на травму и инфекцию раны; периодизация раневого процесса; учет индивидуальности пациента (его возрастные и типологические особенности); подготовка и пересадка кожного трансплантата. Задача терапии включает не только ускорение заживления раны, стимуляцию процессов эпителизации, но и устранение возможности последующих осложнений в виде рубцов и скрытых очагов инфекции, а также полное восстановление целостности и функций участка повреждения в максимально короткий срок.

Выбор трансплантата для репарации кожного покрова является также важным фактором такого лечения. Трансплантат можно назвать заменителем кожи, представляющий собой анизотропную систему, направленную на закрытие различных типов ран. Заменители кожи применяются для лечения крупных и глубоких поврежденных участков, поскольку они требуют меньшего формирования кровеносных сосудов, увеличивают кожный компонент раны, уменьшают подавляющие факторы и воспаление, а также обеспечивают скорое и безопасное закрытие раны. На данный момент традиционно используются такие виды заменителей как: ксено-, ауто- и аллотрансплантаты.

### **1.2.1 Ксенотрансплантаты**

Ксенотрансплантаты - это хирургический трансплантат ткани одного биологического вида организма, используемый в качестве временного или постоянного трансплантата для другого вида. Их получают из тканей животных



(наиболее частым используемым в медицине являются свиные продукты) и применяют в качестве временных трансплантатов для человеческих ран [7].

Ксенотрансплантаты вводят экзогенный коллаген в рану, что стимулирует регенерацию кожи. Экзогенный коллаген считается хемотаксическим для макрофагов и фибробластов и обеспечивает трехмерную структуру для врастания ткани [8,9]. Материал внеклеточного матрикса (ВКМ), доставляемый в раневое ложе, помогает снизить высокий уровень матриксных металлопротеиназ, которые ингибируют процесс заживления при хронических незаживающих ранах [10].

Трансплантаты из свиной кожи часто модифицируют путем альдегидного сшивания и пропитки ионами серебра в целях обеспечить более устойчивые к микробам препараты.

Трансплантат не становится васкуляризированным, не имеет врастания капилляров и соединения сосуда с сосудом, хотя некоторое врастание грануляционной ткани в дермальный слой можно увидеть гистологически. Пассивное плазматическое питание поддерживает гидратацию биологического материала и любых жизнеспособных клеток в течение короткого времени, но в конечном итоге происходит иссушение и аваскулярный некроз. На границе трансплантат-рана имеется умеренная клеточная инфильтрация и иммунологического ответа не наблюдается. Ксенотрансплантат отторгается после формирования под ним полного эпителия [11].

Данный вид кожных заменителей функционируют только как биологическая повязка, поскольку клетки в трансплантате не жизнеспособны и такие заменители не васкуляризируются.

### 1.2.2 Аутооттрансплантаты

Процедура, когда участок кожи пациента пересаживается с одного места на другое называется пересадкой кожи - «аутооттрансплантатом». Такие трансплантаты как правило подразделяются на 3 основные категории:

расщепленные кожные лоскуты, полнослойные кожные трансплантаты и культуральная аутологичная кожа [12].

Расщепленные кожные лоскуты содержат эпидермис и некоторое количество дермы, оставляя глубокие слои дермы на месте, при этом такие участки забора кожи самостоятельно восстанавливаются в асептических условиях за счет вторичной эпителизацией с краев раны и кератиноцитов волосных фолликулов.

Полнослойные кожные трансплантаты содержат эпидермис и всю дерму [13]. Эти трансплантаты предпочтительны в областях, где значительные рубцы или контрактуры трансплантатов могут привести к нежелательным эстетическим или функциональным последствиям (голова, шея, лицо, а также области груди и половых органов).

Культивированные аутологичные заменители кожи часто называют культивированными эпидермальными аутооттрансплантатами. Этот заменитель включает культуру аутологичных кератиноцитов, полученных из биопсионного материала кожи самого пациента. Заживление раны зависит от толщины подлежащей дермы в трансплантате. Толстая дерма приводит к более быстрому заживлению и лучшему косметическому и эстетическому виду зажившей раны.

Поскольку аутооттрансплантат получают из собственных биоматериалов пациента риски отторжения отсутствуют.

### 1.2.3 Аллотрансплантаты

Трансплантаты, пересадку которых проводят от одного организма другому одного вида носит название аллотрансплантат. Для замены повреждений кожи человека такой вид трансплантатов подразделяют на прижизненную и трупную трансплантацию.

Такие трансплантаты, в общем, делят на три группы: эпителиальные/эпидермальные, дермальные или композитные (эпидермальные и дермальные).

Трупные аллотрансплантаты широко используются при лечении ожоговых ран во многих ожоговых центрах по всему миру. Аллотрансплантаты создают антимикробный барьер наряду с стимулированием ангиогенеза, формируя благоприятные профили факторов роста и цитокинов для заживления ран [7], при этом они также служат временной защитой от иммунологического отторжения [14,15] и вирусов (гепатиты В и С, ВИЧ). Применение аллотрансплантата кожи человека защищает подлежащие ткани, способствуя формированию грануляционную ткани и сокращению площади раны.

Аллотрансплантаты в целом стимулируют эпителизацию. Адгезия аллотрансплантатов к раневому ложу способствует успешности аллотрансплантации.

### **1.3 Тканевая инженерия кожи**

Несмотря на то, что арсенал традиционной терапии кожи включает в себя широкий спектр средств для переноса тканей, все эти подходы пока не соответствуют истинной полной регенерации. Традиционные заменители кожи могут содержать дремлющие вирусы, а также нельзя исключать риск заживления раны с формированием рубцов, при этом не идет спонтанна регенерация потовых желез, нервов и волосяных фолликулов [16].

Главная проблема ТИ – это воссоздание среды, содействующей формированию базовых гомеостатических элементов. Эффективность ТИ заменителя заключается в следующих факторах: в создании условий для соединительно-тканной поддержки, формированию сигнальных путей, ангиогенеза, оптимальной выживаемости клеток, а также их нормальной пролиферации, дифференцировки и апоптоза.

Конечная цель тканевой инженерии кожи – создание новых альтернативных методов терапии кожных повреждений, которые будут удовлетворять большинство характеристик.

### 1.3.1 Тканеинженерные заменители кожи

ТИ заменители кожи - это широкая группа терапевтических средств разных типов. Заменители кожи действуют как временное защитное покрытие раны, защищая поврежденные участки от потери жидкости и загрязнения, а также ускоряя процессы регенерации ткани за счет стимуляции высвобождения цитокинов и факторов роста в области раны [17].

Тканеинженерный препарат заменителя кожи включает клетки и/или искусственный ВКМ [18]. Идеальный синтезированный заменитель кожи должен быть стерильным и нетоксичным, обладать барьерными функциями и низкую воспалительную реакцию, допускать аэрацию аналогично нормальной коже. Такие заменители кожи должны обладать высокой адгезионной способностью к реципиентному ложу раневой поверхности, иметь необходимые физико-механические свойства для кожи и мягких тканей и проходить контролируемую биodeградацию [19]. Они также должны быть легкими в обращении, гибкими, эластичными и относительно недорогими.

ТИ заменители для кожных ран чрезвычайно эволюционировали за последние несколько лет. Были достигнуты новые успехи в разработке заменителей кожи, состоящих из искусственных и натуральных материалов.

В зависимости от продолжительности срока эксплуатации они классифицируются как постоянные, полупостоянные или временные. Они также могут быть классифицированы на основе состава заменителя кожи как клеточные или ацеллюлярные. Точно так же, в зависимости от типа используемого биоматериала, они могут быть биологическими (аутологичными, аллогенными, ксеногенными) или синтетическими (биоразлагаемыми и неразлагаемыми).

### 1.3.2 Синтетические кожные заменители

Синтетические заменители кожи построены из небιологических молекул и полимеров, которые не присутствуют в нормальной коже [20]. Эти конструкции должны быть стабильными, биоразлагаемыми и обеспечивать адекватную среду для регенерации тканей. Известно, что такой заменитель должен сохранять свою трехмерную структуру и прочностные характеристики не менее 3 недель, чтобы обеспечивать вращание кровеносных сосудов, миграцию фибробластов и покрытие эпителиальными клетками (эпителизация конструкции). Предпочтительно, биодegradация должна происходить после этого периода и протекать без воспалительной реакции организма. Для этого синтетический ТИ заменитель должен состоять из иммуносовместимых материалов.

Искусственная природа таких заменителей кожи имеет некоторые явные преимущества и недостатки по сравнению с естественными биологическими материалами. Состав и свойства препарата можно гораздо точнее контролировать. Для усиления эффекта можно добавлять различные добавки, такие как факторы роста и компоненты ВКМ, однако эти синтетические заменители обычно не имеют базальной мембраны, и их архитектура не похожа на нативную кожу. Один из недостатков – это использование небιологических компонентов, которое может быть проблематичным при попытке получения биологически совместимого материала [20].

В наше время синтетических заменителей кожи, доступных на рынке, существует немного. Среди них Biobrane, состоящий нейлоновой сетки в качестве внутреннего слоя, которая обеспечивает фиброваскулярное вращание, и наружного слоя силикона, который выполняет газобарьерную и антибактериальные функции [21]. Еще один препарат Dermagraft, представляет собой сетку из полилактина (полилактид/полигликолид 9:1), засеянную аллогенными предшественными фибробластами [22].

Также имеется несколько препаратов на основе коллагенов:

1) Integra (композит из бычьего коллагена, хондроитин-6-сульфата и силиконовой мембраны, выступающий в качестве замены эпидермиса);

- 2) Apligraf (двухслойный эквивалент кожи, состоящий из бычьего коллагена I типа, аллогенных кератиноцитов и неонатальных фибробластов);
- 3) Matriderm (матрица из бычьего коллагена I типа с эластином);
- 4) OrCel (повязка, в которой эпидермальные кератиноциты и дермальные фибробласты культивируются в два отдельных слоя в губке из бычьего коллагена I типа) [20,22–24].

#### **1.4 Биоматериалы для тканевой инженерии кожи**

В целом, области материаловедения для ТИ-матриц и каркасов, которые содействуют поддержке структуры ткани и способствуют миграции клеток, считается уже широко и хорошо изученным сегментом науки. Исследования различных материалов, подходящих для создания кожных заменителей, активно проводятся в настоящее время. Такие материалы характеризуются специфическими физическими и биологическими свойствами, такими как количество и размер пор (пористость), эластичность, а также запрограммированные параметры клеточной активности.

Широко исследованы природные и синтетические полимеры, они обладают подходящей гибкостью, поскольку их структура и состав могут быть адаптированы к конкретным потребностям [25].

##### **1.4.1 Натуральные полимеры**

Натуральные полимеры получают из природных источников – живых организмов. Данная группа полимеров имеют преимущества над другими, так как обладают структурой достаточно похожей на структуру ВКМ кожи, состоящий на 80-90% из белка коллагена. Также для целей ТИ кожи используют различные полипептиды, полисахариды, а также их комбинации [26].

#### 1.4.1.1 Коллаген

Широко известным натуральным полимером, на основе которого получают тканеинженерные конструкции (ТИК) или матриксы (scaffolds), является коллаген. Это фибриллярный белок, он входит в состав основы соединительной ткани всех живых организмов и обеспечивает ее прочность и эластичность. Он взаимодействует с клетками во всех типах соединительных тканей и трансдуцирует важные сигналы клеточной сигнализации и регуляции. Коллаген определяется высокой механической прочностью, хорошей биосовместимостью, низкой антигенностью и способностью к химическому сшиванию, а также подвержен механической деградации и хорошо поглощают воду; на сегодняшний день идентифицировано двадцать семь типов коллагенов, при этом коллаген I типа является наиболее распространенным в теле человека и наиболее исследованным для биомедицинских применений [27].

Тем не менее, в связи с белковым происхождением, коллаген имеет и значительные недостатки для создания ТИК. Коллаген обладает высокой скоростью биodeградации, так как является хорошо биоразлагаемым материалом за счет влияния на полимер катаболических процессов, включая действие специфических коллагеназ и фагоцитоза. Данный минус можно устранить с помощью внедрения сшивок между полипептидными цепями [28]. Также структура коллагена имеет на краях тройной спирали короткие неспиральные последовательности и телопептиды, которые обладают иммунологической активностью – и это второй его недостаток [28–30]. Не воздействуя на тройную спираль коллагена, избавиться от нежелательных доменов можно с помощью ферментативной экстракцией протеазами.

Еще одним минусом, в целом, являются достаточно слабые механические характеристики, что нередко вызывает ограничения при использовании коллагена в качестве ТИК. Это ограничение также снимается при химической модификации биологического коллагена.

Достоинством коллагена является его доступность и относительная легкость переработки в пористые губки, гели и пласты.

#### 1.4.1.2 Фибрин

Фибрин — это высокомолекулярный белок, сгустки его волокон составляют основу тромба, который образуется во время сворачивания при кровотечении.

Фибрин образуется путем ферментативного расщепления белка-фибриногена, постоянно присутствующего в плазме крови. Растворимые молекулы фибриногена под влиянием тромбина переходят с образованием полимерной сети в виде геля (фибриновая сеть) в нерастворимую форму. Фибриновая сеть имеет нанометровую размерность и обладает схожими параметрами с ВКМ кожи по высокому соотношению объема и площади [31]. Эта сеть – естественная ранозаживляющая матрица, которая образуется при повреждении кожи и травме сосудов. На этом основывается использование для регенерации мягких тканей гидрогелей, имеющих в своем составе фибрин, при этом происходит активная миграция клеток в зону регенерации и хорошая адгезия этой матрицы [32–34]. Показано, что активность клеточных процессов снижается при увеличении плотности фибриновой сети.

Недостатком использования полимера считается высокая корреляция между механическими свойствами ТИК и такими характеристиками фибрина, как размер волокон и плотность фибриллярной сети [35]. Для улучшения механических характеристик необходимо увеличивать плотность фибриновой сети, что является негативным фактором для пролиферации и миграции клеток в структуру ТИК.

#### 1.4.1.3 Гиалуроновая кислота



Гиалуроновая кислота (ГК) является основным и обязательным компонентом нативного ВКМ кожи и других мягких тканей, ее молекулы в большом количестве содержатся в различных типах соединительной ткани [36]. ГК - это природный полисахарид, который может быть химически модифицирован для многих применений тканевой инженерии, при этом он ферментативно очищается для использования *in vivo* [37]. В тканевой инженерии используются гидрогели гиалуронана, свойства которого можно модифицировать путем добавления различных компонентов, а также меняя количественные соотношения компонентов гиалуронана, плотность сшивки, химическую природу модификатора и степень модификации [38]. ГК широко используется в контурной пластике в эстетических целях, когда ее инъекционно вводят в/под кожу.

#### 1.4.1.4 Хитозан

Хитозан – это деацетилированный продукт хитина, который является богатым возобновляемым природным щелочным полисахаридом. Известно, что он не обладает системной токсичностью и другими побочными эффектами, а также имеет хорошие увлажняющие и адсорбционные свойства. Также, хитин считается вторым по распространенности полимеризованным углеводородом, встречающимся в природе [39].

В настоящее время производные хитозана широко используются для создания ТИК, в том числе кожи. Его можно использовать для получения раневых покрытий, доставки различных препаратов, а также в тканевой инженерии мягких и жесткой соединительной (хрящевой) тканей, а также высокодифференцированных тканей (нервная и печеночная ткани). Хитозан характеризуется низкой иммуногенностью, мягкими условиями его обработки, растворимостью при  $pH < 5,5$ , контролируемые механическими и биодegradационными свойствами, которые формируются на основе пористости каркаса и молекулярной массы. Также у хитозана имеется множество боковых

химических групп, которые обеспечивают высокую реакционную способность по отношению к различным молекулам [40].

Как и у всех натуральных полимеров, недостатками хитозана являются его низкие механические характеристики. Эта проблема может быть решена композицией хитозана с материалами, обладающими большим уровнем прочности [41]. Однако, для обширных повреждений кожи ТИК на основе хитозана редко используется в силу вышеописанного недостатка.

#### 1.4.1.5 Альгинат и агароза

Альгинат и агароза — линейные полисахариды, выделяемые из красных и бурых водорослей. Обычно эти полисахариды используют вместе для улучшения механических и адгезивных свойств ТИК [42].

Альгинат представляет собой сочетание мономеров  $\beta$ -D-маннуроновой кислоты и  $\alpha$ -L-гулууроновой кислоты, а агароза состоит из  $\beta$ -D-галактопиранозы и 3,6-ангидридо- $\alpha$ -1-галактопиранозы. В присутствии двухвалентных катионов, таких как  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$  и  $Sr^{2+}$ , эти полисахариды подвергаются гелированию. В целом, материалы на их основе демонстрируют хорошую биосовместимость, пористость, оптимальную для клеточной миграции и доставки питательных веществ, также описано поддержание хондрогенной дифференцировки стволовых клеток [42,43]. Еще одним преимуществом альгинатных гелей является их термическая стабильность, нетоксичность и активная биоразлагаемость. Однако, показано, что биодegradация альгината и агарозы *in vivo* является довольно медленным и мало контролируемым процессом, что ограничивает его использование в качестве биоискусственного внеклеточного матрикса кожи при других хороших характеристиках [41].

#### 1.4.2 Синтетические полимеры

Анализ свойств натуральных полимеров показывает, что одним из объединяющих их недостатков является малая механическая прочность. Каркасная функция – это одна из главных функций искусственных ТИ-матрикс, и этот недостаток является существенной проблемой для полноценной регенерации тканей.

Альтернативным вариантом натуральным материалам служат синтетические полимеры. Благодаря большому количеству методов синтеза и обработки материалов можно получить как необходимую форму, так и адаптацию материала к получению широкого спектра физико-химических свойств и механических свойств и скоростей деградации. Синтетические полимеры также представляют собой более надежный источник сырья, при возможности получения неиммунногенных продуктов. Также, можно легко реализовывать композицию разных материалов в одном продукте.

Синтетические полимеры делят на две группы: биodeградируемые и небиodeградируемые. Биodeградируемые материалы включают полилактид, полигликолид, их сополимеры – полилактогликолид и полиглактин 9:1, поликапролактон, полицианоакрилаты, поливиниловый спирт, др. В группу небиodeградируемых полимеров входят полигидроксиэтилметакрилат, поли-N-изопропилакриламид и др [44].

#### 1.4.2.1 Поликапролактон

Поликапролактон (ПКЛ) — биodeградируемый, полукристаллический, алифатический полиэфир, в качестве мономера которого выступает капролактон. Этот полимер имеет низкую температуру плавления около 60 °С. ПКЛ разлагается гидролизом его сложноэфирных связей в физиологических условиях (в том числе, в организме человека) и поэтому получил большое внимание исследователей как материал для создания ТИК. Обычно ПКЛ используется в фармацевтических продуктах и раневых повязках [45].

Этот материал обладает хорошими механическими свойствами, биосовместимостью, а также довольно удобен в обработке [46]. Однако из-за внутренней гидрофобной структуры и отсутствия биоактивных функциональных групп ПКЛ представляет собой не очень благоприятную среду для роста клеток, что ограничивает применение этого полимера в тканевой инженерии в качестве матричных конструкций значительных размеров [47,48]. На данный момент многие методики направлены на модификацию поверхности поликапролактона адгезивными материалами.

#### 1.4.2.2 Полиэтиленгликоль

Полиэтиленгликоль (ПЭГ), также известный как полиэтиленоксид (ПЭО) или полиоксиэтилен, который относится к олигомеру или полимеру этиленоксида, препятствующему адсорбции белка и клеточной адгезии [49]. Эти свойства помогают минимизировать иммунный ответ после имплантации [50]. Из гидрофильных ПЭГ гидрогелей можно изготавливать каркасы с различной степенью деградации [51]. Для модификации данных гелей добавляют дополнительные сайты для клеточной адгезии или молекулы ВКМ, чтобы помочь клеткам проникнуть в каркас из гидрогеля, при этом расширяется область их применения. Биоактивные молекулы, такие как лиганды клеточной адгезии, факторы роста и сайты протеолитической деградации, включают в ПЭГ гидрогели, это значительно влияет на адгезию, пролиферацию и миграцию клеток [40].

#### 1.4.2.3 Поливиниловый спирт

Благодаря благоприятным свойствам поливинилового спирта (ПВС), таким как нетоксичность, биосовместимость и биodeградируемость, он использовался для широкого спектра биомедицинских применений, таких как костные имплантаты [53] и различные биоискусственные органы, а также ТИ-

кожа [54]. Поскольку ПВС обладает хорошими волокнообразующими характеристиками, нановолокна смесей ПВС и хитозана, полученные методом электроспиннинга, применяли для тканевой инженерии и в процессе заживления [55,56]. Также для тканевой инженерии кожи использовались нановолокна ПВС и полигидроксибутирата [57].

#### 1.4.2.4 Полигидроксиэфиры

Полигидроксиэфиры, такие как полигликолевая кислота (ПГК), полимолочная кислота (ПМК) и их сополимеры широко применяют для тканевой инженерии [58].

Системы на основе ПЛГК часто использовали в синтезе кожных скаффолдов [59]. При этом обнаружено, что эти полиэфиры разлагаются до своих кислых компонентов, вызывая высокую локальную кислотность в зоне имплантации ТИ-конструкций из них, которая может разрушать белки [60].

Быстрая деградация этого полимера может часто препятствовать обработке материала после воздействия водных сред. Для преодоления этих проблем использовали комбинаций ПМК/ПГК. Также было доказано, что смешивание поли-4-гидроксибутирата с ПМК и его сополимерами повышает вязкость и снижает жесткость материала [61].

Поли-D,L-молочная-со-гликолевая кислота (ПМГК) - аморфный биоразлагаемый полиэфир, используют уже несколько десятилетий в качестве scaffold-материала, исследования и разработки датируются с тех пор, как он был создан. Он обладает свойствами, аналогичными свойствам нормальных тканей [62]. Скаффолды, изготовленные из биоразлагаемых полимеров, таких как ПГК, ПМК и ПМГК, широко применяются в тканевой инженерии хрящей, костей, связок и кожи [63].

ПМК и ПГК имеют тенденцию к медленному разложению, что делает их привлекательными материалами для имплантации в ткани [64]. Для ранозаживляющего применения исследователями готовили биосовместимый каркас, в котором ПМГК-молекулы были встроены в микрочастицы куркумина.

Их результаты показали, что этот каркас может быть использован в качестве системы доставки лекарств для лечения тяжелых и хронических кожных ран[65].

#### 1.4.2.4.1 Полигидроксиалканоаты

ПГА – линейные полукристаллические полиэфиры микробиологического происхождения. По ряду физико-химических свойств ПГА сходны с такими синтетическими полимерами, как полиэтилен и полипропилен. Полигидроксиалканоаты обладают широким спектром свойств: оптической активностью, антиоксидантными свойствами, пьезоэлектрическим эффектом и, что самое главное, биодegradацией и биосовместимостью [66]. Последнее обуславливается тем, что основным компонентом большинства ПГА является 3-гидроксимасляная кислота, которая утилизируется в цикле трикарбоновых кислот. После имплантации ПГА-полимеры медленно разлагаются при температуре тела и образует нетоксичные метаболиты (в аэробных условиях -  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ) [41].

ПГА не гидролизуются в жидких средах, биодegradация ПГА является биологической и происходит клеточным и гуморальным путями; образующиеся при этом мономеры гидроксимасляной кислоты не вызывают закисления тканей и выраженной воспалительной реакции, в отличие от ПМГК-материалов. Скорости биорезорбции ПГА значительно ниже, чем полилактидов и полигликолидов, изделия из ПГА, в зависимости от формы и места имплантации *in vivo* могут функционировать до нескольких лет, при этом, скоростью дegradации ПГА можно управлять [67].

Природные ПГА обладают линейной структурой, благодаря которой при нагревании становятся пластичными. Показана возможность переработки ПГА общепринятыми способами (экструзия, прессование, электростатическое формование, получение микрочастиц из эмульсий и т.д.) в различные изделия [66].

Все эти характеристики делают ПГА перспективным материалом для использования не только в тканевой инженерии, но и в других областях медицины и биомедицинской инженерии. Хорошая механическая плотность отливных пленок и матриксов из ПГА делают перспективными для тканевой инженерии кожи [6,68,69].

#### 1.4.2.4.2 Виды полигидроксиалканоатов

В зависимости от таксономического положения и физиолого-биохимических свойств микроорганизмов-продуцентов, условий биосинтеза и типа углеродного субстрата различают множество видов полимеров класса ПГА. Все они различаются между собой по структуре и широкому спектру физико-химических свойств (гибкости, жесткости, эластичности, степени кристалличности, температурным характеристикам и др.). ПГА делят на гомо/гетерополимеры по составу мономеров основной цепи.

Первым изученным представителем гомополимеров является поли-3-гидроксибутират (ПЗГБ). Макромолекулы этого полимера состоят из одинаковых по строению повторяющихся структурных единиц (мономеров 3-гидроксибутирата).

К группе гетерополимеров, чьи макромолекулы содержат мономерные звенья разных типов, можно отнести сополимер 3-гидроксибутирата с 3-гидроксиивалератом (ПЗГБ/ЗГВ). Также различают регулярные сополимеры, структурные звенья которых расположены упорядоченно, и нерегулярные – структурные звенья беспорядочной последовательности.

Основная структурная формула ПГА:

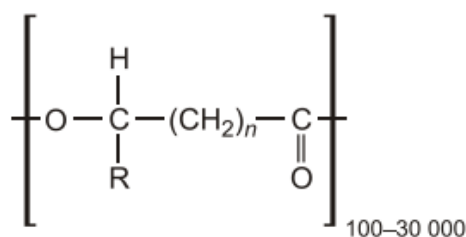


Рисунок 1. Структурная формула ПГА

По длине боковой цепи ПГА-полимеры разделяют на три основные группы: короткоцепочечные (от 3-х до 5-ти углеродных атомов), среднецепочечные (от 6 до 14) и длинноцепочечные (17 и 18).

#### 1.4.2.4.3 Поли-3-гидроксibuтират

Полигидроксibuтират (ПГБ) - линейный гомополимер (R)-b-гидроксibuтириновой кислоты, который образует кристаллические цитоплазматические гранулы в большом количестве различных бактерий [70]. Этот материал биodeградируемый и биосовместимый, после имплантации в организм медленно разлагается при температуре тела и образует нетоксичный метаболиты, выделяемые с мочой [71].

Показано, что ПГБ хорошо зарекомендовал себя при использовании в качестве скаффолда, предназначенного для поддержки и защиты раны от повреждения, способствуя заживлению путем стимулирования клеточного роста на раневой поверхности и внутри нее [72]. Также, он использовался для получения нановолокон методом электроспиннинга из смесей поливинилового спирта и ПГБ, которые являются потенциальным материалом каркаса для тканевой инженерии кожи [57]. При этом, трансплантат, покрытый коллагеном нановолокнистого каркаса ПГБ, нагруженного соматическими стволовыми клетками, показал лучшие результаты в процессе заживления дефектов кожи на модели крыс [73].

### 1.5 Технологии клеточных культур

Перспективным и важным достижением биологии и биомедицинской инженерии стало создание клеточных технологий – совокупность методов, направленных на выделение из какого-либо типа ткани отдельных типов клеток и на их последующее культивирование *in vivo* для использования в научно-практических целях. Впервые технология культивирования тканей была



разработана в начале 20 века для изучения свойств животных клеток в различных условиях [74].

Главный объект такой технологии – это клеточная культура, которая представлена клетками животных или человека, имеющие одно гистологическое происхождение. Клетки культивируются в чашках Петри или специальных пластиковых флаконах и планшетах с использованием питательной среды, в состав которой входят буферы, физиологические соли, аминокислоты, витамины и белковые компоненты, антибактериальные добавки. Для культивирования очень важен контроль температуры, влажности и уровня углекислого газа в среде.

По методу формирования культур различают три основных вида: органичная, эксплантатная и диссоциированная клеточная культура [75]. Исходная культура, взятая непосредственно у индивидуума, называется «первичной культурой», а когда ее разбавляют и переносят в другие контейнеры (процесс, называемый «пассажем»), она становится «клеточной линией». Клеточные линии могут быть классифицированы как «непрерывные» линии, которые имеют потенциал для неограниченного расширения популяции, или «конечные» линии., которые претерпевают ограниченное количество удвоений клеток до «старения» [76].

Клеточные линии могут существовать либо в виде адгезивных культур, либо расти в суспензии. Большинство типов клеток будут прилипать к субстрату, такому как пластик или стекло, и размножаться как монослой, в то время как суспензионные культуры не прикрепляются к субстрату и будут расти во взвеси при динамическом перемешивании в среде.

Как модельные системы, клеточные линии обладают рядом преимуществ перед первичными культурами. Их преобладающей силой является способность повторять исследования с хорошо охарактеризованной системой культуры, которая может быть использована в нескольких лабораториях. При продолжительном культивировании возникнет относительно однородная клеточная популяция в отличие от первичной культуры, которая может

содержать много типов стромальных и инфильтрирующих типов клеток, потенциально усложняющих интерпретацию данных.

Первой непрерывной клеточной линией стала HeLa – линия раковых клеток человека. Она была выведена в 1951 году Джорджем Гаем в госпитале Джонса Хопкинса [77]. Клетки выделены из фрагмента ткани шейки матки, полученного биопсией от пациентки Генриетты Лакс, в память которой и названа эта клеточная линия.

Основные преимущества этой культуры – это бесконечное число циклов деления и быстрый рост при плотной адгезии к субстрату. Клетки HeLa служат имитацией организма человека *in vivo*, и широко используются в качестве исследования действия различных веществ во многих лабораториях, что делает культуру – универсальным тест-объектом. Также, эта клеточная культура достаточно проста в культивировании на разных средах и отлично переносит процедуру криоконсервации.

## **2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **2.1 Объекты исследования**

В качестве объекта исследования взят образец полигидроксиалканоатов (ПГА), полученный в Лаборатории биотехнологии новых биоматериалов Сибирского федерального университета: двухкомпонентный сополимер 3-гидроксибутирата и 3-гидроксивалерата с включением 3-гидроксивалерата 10 мол.% (П(ЗГБ/ЗГВ10)).

Моделью для оценки цитотоксичности и адгезионности пленочных образцов П(ЗГБ/ЗГВ10) послужила культура HeLa, 20 тысяч клеток на единицу площади образца, в соответствии с ГОСТ Р ИСО 10993-5-2009.

### **2.2 Изготовление полимерных пленочных образцов**

Пленочные образцы для исследования получали методом полива раствора полимера на предварительно обезжиренные чашки Петри.

Изготовление раствора из П(ЗГБ/ЗГВ10) проводили в вытяжном шкафу «Labconco» с использованием средств индивидуальной защиты. На аналитических весах «OHAUS CORPORATION Discovery DV215CD» отвешивали навеску П(ЗГБ/ЗГВ10). В качестве растворителя использован трихлорметан (хлороформ, ХЧ, Экос-1, Россия). Гомогенные растворы получали при тщательном перемешивании с магнитным сердечником на магнитной мешалке с подогревом Heidolph MR-Hei-Standard в режиме 250 rpm при температуре до 50 градусов Цельсия, до полного растворения навесок. Раствор процеживали через мельничный газ с размером ячейки 80 мкм, при атмосферном давлении, с помощью стеклянной воронки.

Для очистки использовали повторное перерастворение П(ЗГБ/ЗГВ10) в хлороформе и осаждение в органическом растворителе (гексан) с последовательной фильтрацией растворов. Процедуру перерастворения-осаждения полимера проводили один, два и три раза. Отфильтрованную массу

высушивали в вытяжном шкафу в открытых чашках Петри при комнатной температуре в течении нескольких дней.

Образцы использованы для изготовления растворов и отлива пленок, для одной пленки диаметром 80 мм брали навеску 300 мг и растворяли в 20 мл хлороформа. Пленочные образцы высушивались в асептических условиях в закрытом боксе-ламинаре в закрытых чашках Петри в течение 48 часов, при постепенном испарении растворителя. Пленки снимали с чашек под слоем дистиллированной воды температуры 95 °С. Край пленки подрезался стерильным скальпелем. Для хранения пленок использовалась стерильная упаковка.

### 2.3 Изучение свойств поверхности пленочных образцов

Поверхностные характеристики полимерных изделий оценивали с помощью прибора DSA-25E (Krüss, Германия) с использованием программного обеспечения DSA-4 для Windows. На поверхность образца с помощью микрошприца наносили капли воды объемом 1,5 мкл с видеофиксацией взаимодействия жидкости с поверхностью образца. Для нахождения краевых углов смачивания кадр видеозаписи капли после ее стабилизации обрабатывался в полуавтоматическом режиме встроенным в программный пакет методом «Circle». Из полученных значений краевых углов смачивания ( $\theta$ , град) вычисляли свободную поверхностную энергию ( $Y_S$ ), свободную энергию межфазовой поверхности ( $Y_{SL}$ ) и величину сил сцепления ( $W_{SL}$ ) (эрг/см<sup>2</sup>), используя известные уравнения.

$$Y = Y (1 + \cos \theta)^2 / 4, \quad (1)$$

где  $Y$  - поверхностное натяжение свободной воды (72,8 эрг/см<sup>2</sup>).

Свободная энергия границы раздела полимер-вода ( $Y_{SL}$ , эрг/см<sup>2</sup>) была найдена из уравнения:

$$Y_{SL} = Y_S + Y_L - W_{SL}, \quad (2)$$

где  $Y_{SL}$  - критерий остаточной энергии интерфейса,

$Y_S$  и  $Y_L$  - свободные энергии пленочной и водной поверхностей соответственно.

Силу сцепления, которая характеризует прочность адгезионного шва на границе раздела, рассчитывали по соотношению:

$$W_{SL} \approx 2\sqrt{Y_S} \times Y_L \text{ (эрг/см}^2\text{)} \quad (3)$$

Для каждого образца проводилось не менее десяти измерений; рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение.

## **2.4 Ведение клеточной культуры**

Для наработки и поддержания клеточной культуры использованы культуральные флаконы (Techno Plastic Products, Швейцария). Культуру вели в CO<sub>2</sub>-инкубаторе MCO-5AC (Sanyo, Япония) в гумидной атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Для приготовления полной питательной среды использовали многокомпонентную среду DMEM (Gibco, США), 10% эмбриональной телячей сыворотки (Gibco, США) и 5% раствор антибиотиков (пенициллин, стрептомицин) (Gibco, США). Для снятия клеток с поверхности культуральных флаконов использовали трипсин (Gibco, США), титр суспензии определяли с помощью камеры Горяева (соотношение жизнеспособных и мёртвых клеток оценивали после окрашивания трипановым синим 0,4% (Gibco, США)).

Все манипуляции с клетками осуществляли в ламинарном шкафу второго класса защиты NB602-WSL (N-biotek, Корея). Перед началом любых операций проводилось облучение ультрафиолетовым светом рабочего пространства ламинарного шкафа в течение 20 мин. В ходе работы использовали средства индивидуальной защиты.

## **2.5 Исследования цитотоксичности полимерных пленочных образцов**

Оценку цитотоксичности пленочных образцов оценивали в постоянной клеточной линии карциномы шейки матки человека HeLa. В качестве контроля приняли полистироловую поверхность лунки культуральных планшетов.

Пленочные образцы нарезали специальной металлической формой диаметром 10 мм для культивирования на их поверхности клеточной культуры в 48-луночном планшете. Полученные диски помещали на дно лунки шероховатой матовой стороной вверх.

Перед началом эксперимента все образцы пленок проходили стерилизацию в этиловом спирте 96%, с отмыванием в стерильном дистилляте и далее под ультрафиолетовым излучением в ламинарном боксе, 10 минут для каждой стороны пленок. Для создания благоприятных условий для прикрепления клеток к поверхности образцов после стерилизации пленочные образцы замачивали в полной питательной среде в течении 48 часов.

#### 2.5.1 Оценка абсолютного количества адгезированных клеток

Адгезионные свойства оценивали после культивирования клеток на пленочных образцах в 48-луночном планшете. На каждую лунку высевали  $2 \times 10^4$  клеток и доводили питательной средой до общего объема в 1 мл. Оценка количества адгезированных клеток проводилась на первые и третьи сутки культивирования.

Перед процедурой подсчета из исследуемой лунки удаляли старую питательную среды, промывали неполной средой MEM и обрабатывали раствором трипсина (500 мкл) в течении 7 минут в инкубаторе. После этого добавляли среду питательную среду (500 мкл) для нейтрализации действия трипсина и затем центрифугировали в центрифуге Sigma 3-16L (Sigma, Германия) 5 минут со скоростью 3000 об/мин. Далее сливали супернатант и ресуспендировали клеточный осадок в питательной среде. Из полученной суспензии брали 20 мкл и добавляли к ним равный объем трипанового синего.

После чего заполняли камеру Горяева и считали количество живых (неокрашенных) клеток в пяти больших квадратах по диагонали.

Количество клеток считали по формуле:

$$X = N \times 0,05 \times 10^6 \times m, \quad (4)$$

где  $X$  – концентрация клеток (млн/мл),

$N$  – количество клеток в 5 больших квадратах,

$m$  – разбавление

### 2.5.2 МТТ-тест

МТТ-тест заключается в определении митохондриальной активности клеток. Он основан на восстановлении (4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Нтетразолиум бромида (МТТ) клеточными ферментами – оксиредуктазами. В результате восстановления образуется водонерастворимый формазан, количество которого коррелирует с количеством жизнеспособных клеток. Определяют количество формазана оптическим методом с помощью микропланшетного фотометра Bio-Rad 680 (Bio-Rad Laboratories Inc, США), поскольку раствор формазана поглощает свет на длине волны около 540 нм.

Предварительно стерилизованные плёнки помещали в лунки 48-луночного планшета, высевали  $2 \times 10^4$  клеток на лунку, доводили питательной средой содержимое каждой лунки до 1 мл. Инкубировали в течение 1 и 3 суток. Отбирали культуральную жидкость, затем вносили в каждую лунку 50 мкл рабочего раствора МТТ (конечная концентрация МТТ 0,25 мг/мл) и 950 мкл полной среды DMEM с сывороткой и антибиотиками. Через четыре часа инкубирования заменяли среду на DMSO. После полного растворения кристаллов формазана аликвоты переносили в 96-луночный планшет и проводили измерение оптической плотности при  $\lambda=550$  нм на микропланшетном фотометре. Рассчитывают процент жизнеспособных клеток в каждой опытной лунке относительно оптической плотности лунок контроля,

жизнеспособность которых принимают за 100%. Количество клеток оценивали по калибровочному графику.

### 2.5.3 Окраска клеток флуоресцентными красителями DAPI и FITC

Определение морфологии клеток, прикрепившихся на поверхности пленочных образцов, проводили с помощью окраски флуоресцентным красителем DAPI (окраска ядер клетки). Для анализа цитоскелета использовали фаллоидин, меченный FITC.

Для этого с начала удаляли среду с лунок планшета и промывали фосфатно-буферным раствором (PBS). Далее фиксировали в формалине в течении 5 минут, после чего удаляли формалин и промывали PBS. Затем обрабатывали раствором Triton-X 5 минут, по концу процедуры снова промыли PBS. Следующим шагом добавили раствор фаллоидина-FITC 50мг/мл по 1 мл на образец и окрашивали в течении 1 часа. После этого удаляли раствор и добавляли раствор DAPI 1 мгк/мл по 50 мкл в каждую лунку и оставляли на 5 минут. Затем тщательно промыли PBS два раза. Результат окрашивания клеток смотрели через флуоресцентный микроскоп (Leica DM4000B, Швейцария).

## 2.6 Статистическая обработка

Статистическая обработка полученных данных и статистический анализ произведены с помощью программы Microsoft Excel. Результаты представлены в виде среднего арифметического со стандартным отклонением. Достоверность проверяли с помощью критерия Стьюдента со значением  $p = 0,05$ .



### **3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Изъято 6 страниц

## ВЫВОДЫ

1. Изготовлена серия матриц из П(ЗГБ\ЗГВ10) высокой степени очистки в виде полимерных пленок
2. Исследование свойств поверхности образцов показало незначительное различие в характеристиках, при величине контактного угла смачивания образцов, которая составила от 59,4 до 60,2, а величина свободной поверхностной энергии от 39,05 до 39,25 эрг/см<sup>2</sup>.
3. За время культивирования количество прикрепленных живых клеток на пленочных образцах было близко по отношению к контролю и составило более 95% для образцов № 2, 3 и контроля, и примерно 88 % клеток для образца №1 – однократная очистка.
4. Исследование пленочных образцов с помощью МТТ-теста на примере клеток HeLa показала отсутствие цитотоксического эффекта полимерных пленочных матриц.
5. Результаты флуоресцентного окрашивания клеток HeLa на пленочных образцах показали их равномерное распределение по поверхности и нормальную морфологию клеток.
6. Полученные в результате исследования данные позволяют сделать выводы о пригодности образцов П(ЗГБ\ГВ10) высокой очистки для культивирования адгезионных культур для целей тканевой инженерии. По результатам подсчета количества адгезированных клеток и МТТ-теста ближе всего к контролю оказался пленочный образец №3, прошедший трехкратную очистку. Результаты, достигнутые с модельной культурой адгезирующих к субстрату клеток, служат основой для использования ПГА в тканевой инженерии кожи, имеющие четкую стратификацию анатомических отделов относительно базальной мембраны.

## Список сокращений:

ТИ – тканевая инженерия

ТИК – тканеинженерная конструкция

ВКМ – внеклеточный матрикс

ГК – гликолевая кислота

ПГК- полигликолевая кислота

ПМК - полимолочная кислота

ПМГК – поли-D, L-молочная-со-гликолевая кислота

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ПГБ – полигидроксibuтират

П(ЗГБ\ЗГВ10) - поли-3-гидроксibuтират-со-поли-3-гидроксивалерат с включением валерата 10%

PBS – фосфатно-буферный раствор

DMSO - диметилсульфоксид

## Список литературы:

1. Sen, C. Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy: perspective article / C. Sen, G. Gordillo, S. Roy. // *Wound Repair and Regeneration*. – 2009. – Т.17. – №9. – С. 763-771.
2. Dieckmann, C. Regenerative medicine in dermatology: Biomaterials, tissue engineering, stem cells, gene transfer and beyond / C. Dieckmann, R. Renner, L. Milkova et al. // *Experimental Dermatology*. – 2010. – №19. – С. 697–706.
3. Vig, K. Advances in skin regeneration using tissue engineering / K. Vig, A. Chaudhari, S. Tripathi // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – №4. – С.789.
4. Herndon, D.N. A comparison of conservative versus early excision. Therapies in severely burned patients /D. Herndon, R. Barrow, R. Rutan // *Annals of Surgery*. – 1989. – № 5. –С. 547-553.
5. Rheinwald, J.G. Human epidermal keratinocyte cell culture and xenograft systems: applications in the detection of potential chemical carcinogens and the study of epidermal transformation. // *Progress in clinical and biological research*. - 1989.
6. Шишацкая, Е.И. Исследование пленочных матриц из резорбируемых полигидроксиалканоатов различного химического состава in vivo: реакция тканей и кинетика биоразрушения / Е.И. Шишацкая, Е.Д. Николаева, А.В. Горева // *Гены и клетки*. – 2012. – Т.12, № 1. – С. 73–80.
7. Halim, A.S. Biologic and synthetic skin substitutes: An overview / A.S. Halim, , T.L. Khoo, S.J. Shah et al. // *Indian Journal of Plastic Surgery*. – 2010.
8. Mian, M. Collagen as a pharmacological approach in wound healing / Mian M., Beghe F., Mian E. // *International Journal of Tissue Reactions*. – 1992. – №14. – С. 1-9.
9. Harper, C. Permacol<sup>TM</sup>: Clinical experience with a new biomaterial // *Hosp. Med*. – 2001. – №2. – С.90-95.

10. Trengove, N.J. Analysis of the acute and chronic wound environments: The role of proteases and their inhibitors / N. Trengove, M. Stacey, S. Macauley // *Wound Repair and Regeneration*. – 1999. – №6. – C. 442-452.
11. Chiu, T. “Xenograft” dressing in the treatment of burns / T. Chiu, A. Burd // *Clin. Dermatol.* – 2005. – №23. – C.419-423.
12. Shores, J.T. Skin substitutes and alternatives: a review / J.T. Shores, A. Gabriel, S. Gupta // *Advances in skin & wound care*. – 2007. – №9. – C.493-508
13. Thorne, C.H. Techniques and principles in plastic surgery / C.H. Thorne // *Grabb and Smith’s Plastic Surgery*. – 2007. – C.1-12.
14. Cardinal, M. Serial surgical debridement: A retrospective study on clinical outcomes in chronic lower extremity wounds: Original Research - Clinical Science / M. Cardinal, D. Eisenbud, D. Armstrong // *Wound Repair Regen.* – 2009. – №17. – C.306-311.
15. Norman, P. Immunobiology: The immune system in health and disease / Norman P. // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 1995. – № 96. – C.274-274.
16. Boyce, S.T. Cultured skin substitutes: A review / S.T. Boyce // *Tissue Engineering*. – 1996. – №2. – C.255-266.
17. Kroner, E. Bioinspired polymeric surface patterns for medical applications / E. Kroner // *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* – 2012. – №. 3. – C.287-292.
18. Bello, Y.M Tissue-engineered skin: Current status in wound healing / Y.M. Bello, A.F. Falabella, W.H. Eaglstein // *American Journal of Clinical Dermatology*. – 2001. – №2 – C. 305–313.
19. MacNeil, S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin / S. MacNeil // *Nature*. – 2007. – № 445. – C. 874–880.
20. Van der Veen, V.C. Biological background of dermal substitutes / V.C. Van der Veen // *Burns*. – 2010. – №3 – C. 305-321.

21. Demling, R. Managing the burn wound / M.D. Demling, R.N. DeSanti // Brigham and Women's Hospital Burn Center Harvard Medical School Boston. – 1985.
22. Hansen, S.L. Using skin replacement products to treat burns and wounds. / S.L. Hansen, D.W. Voigt, P. Wiebelhaus // Advances in skin & wound care. – 2001. – №1. – C.37-46.
23. Ryssel, H. The use of MatriDerm in early excision and simultaneous autologous skin grafting in burns-A pilot study / H. Ryssel, E. Gazyakan, G. Germann // Burns. – 2008. – №1 – C.93-97.
24. Heimbach, D. Artificial dermis for major burns. A multi-center randomized clinical trial / D. Heimbach, A. Luterman, J. Burke // Annals of Surgery. – 1988. – №3. – C.313-320.
25. Seyednejad, H. Preparation and characterization of a three-dimensional printed scaffold based on a functionalized polyester for bone tissue engineering applications / H. Seyednejada, D. Gawlittab, W. Dhert //Acta Biomater. – 2011. – №5. – C.1999-2006.
26. Rosso, F. Smart materials as scaffolds for tissue engineering / F. Rosso, G. Marino, A. Giordano // Journal of Cellular Physiology. – 2005. – №3. – C.465-470.
27. Yang, C. The application of recombinant human collagen in tissue engineering / C.Yang, P. J. Hillas, J.A. Báez // BioDrugs. – 2004. – №18. – C.103–119
28. Chevally, B. Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: Applications for tissue engineering and gene therapy / B. Chevally, D. Herbage // Medical and Biological Engineering and Computing. – 2000. – №38. – C.211–218.
29. Eyre, D.R. Collagen cross-links / D.R. Eyre, J.J. Wu // Topics in Current Chemistry. – 2005. – №247. – C.207-229.

30. Orgel, J.P. The in situ conformation and axial location of the intermolecular cross- linked non-helical telopeptides of type I collagen / J.P. Orgel, T.J. Wess, A. Miller // *Structure*. – 2000. – №2. – C.137-142.
31. Barsotti, M.C. Fibrin acts as biomimetic niche inducing both differentiation and stem cell marker expression of early human endothelial progenitor cells /M. C. Barsotti, A. Magera, C. Armani // *Cell Prolif.* – 2011. – №44. – C.33-48.
32. Ho, W. The behavior of human mesenchymal stem cells in 3D fibrin clots: Dependence on fibrinogen concentration and clot structure / W. Ho, B. Tawil, J. Dunn // *Tissue Eng.* – 2006. – №12. – C.1587-1595.
33. Rowe, S.L. Influence of thrombin concentration on the mechanical and morphological properties of cell-seeded fibrin hydrogels / S.L. Rowe, S.Y. Lee, J.P. Stegemann // *Acta Biomater.* – 2007. – №3. – C.59-67.
34. Sadeghi-Ataabadi, M. Fabrication and characterization of platelet-rich plasma scaffolds for tissue engineering applications / M. Sadeghi-Ataabadi, Z. Mostafavi-pour, Z. Vojdani // *Materials Science and Engineering C*. – 2017. – №71. – C.372-380.
35. Brown, A.E.X. Multiscale mechanics of fibrin polymer: Gel stretching with protein unfolding and loss of water / A. E. X. Brown, R. I. Litvinov, D. E. Discher // *Science*. – 2009. – №325. – C.741-744.
36. Almond, A. Hyaluronan / A. Almond // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2007. – 64. – C.1591–1596.
37. Koivusalo, L. Tissue adhesive hyaluronic acid hydrogels for sutureless stem cell delivery and regeneration of corneal epithelium and stroma / L. Koivusalo, M. Kauppila, S. Samanta // *Biomaterials*. – 2019. – №225.
38. Liu, X. Biomimetic nanofibrous gelatin/apatite composite scaffolds for bone tissue engineering / X. Liu // *Biomaterials*. Elsevier, – 2009. – Vol. 30. – №12. – C. 2252–2258.
39. Khor, E. Implantable applications of chitin and chitosan / E. Khor, L.Y. Lim // *Biomaterials*. – 2003. – №24(13). – C.2339-2349

40. Willerth, S.M. Approaches to neural tissue engineering using scaffolds for drug delivery / S.M. Willerth, S.E. Sakiyama-Elbert // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2007. – №59. – C. 325-338.
41. Amoabediny, G. The Role of Biodegradable Engineered Scaffold in Tissue Engineering / G. Amoabediny, N. Salehi-Nik, B. Heli // *Biomaterials Science and Engineering*. – 2011.
42. Sun J., Tan H. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications / J. Sun, H. Tan // *Materials*. – 2013. – №6. – C.1285-1309.
43. Awad H.A. et al. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds / H. Awad, M. Wickham, H. Leddy // *Biomaterials*. – 2004. – № 25(16). – C.3211-3222.
44. Garg, T. Scaffold: A novel carrier for cell and drug delivery / T. Garg, O. Singh, S. Arora // *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. – 2012. – №.29. – C.1-63.
45. Venugopal, J. et al. In vitro study of smooth muscle cells on polycaprolactone and collagen nanofibrous matrices / J. Venugopal, L. Ma, T. Yong // *Cell Biol. Int*. – 2005. – №29. – C.861-897.
46. Mei, N. Biocompatibility of poly( $\epsilon$ -caprolactone) scaffold modified by chitosan - The fibroblasts proliferation in vitro / N. Mei, G. Chen, P. Zhou // *J. Biomater. Appl*. – 2005. – №19. – C.323-339.
47. Gloria, A. Three-dimensional poly( $\epsilon$ -caprolactone) bioactive scaffolds with controlled structural and surface properties / A. Gloria, F. Causa, T. Russo et al. // *Biomacromolecules*. – 2012. – №11. – C.3510–3521.
48. Zhu, Y. Surface modification of polycaprolactone with poly(methacrylic acid) and gelatin covalent immobilization for promoting its cytocompatibility / Y. Zhu, C. Gao, J. Shen // *Biomaterials*. – 2002. – №23. – C.4889-4895.
49. Bryant S.J., Anseth K.S. Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly(ethylene glycol) hydrogels // *J. Biomed. Mater. Res*. – 2002. – №59. – C.63-72.



50. Lee, S.H. Poly(ethylene glycol) hydrogels conjugated with a collagenase-sensitive fluorogenic substrate to visualize collagenase activity during three-dimensional cell migration // *Biomaterials*. – 2007. – №18. – C.397-399.
51. Veronese, F.M. PEGylation, successful approach to drug delivery / F.M. Veronese, G. Pasut // *Drug Discovery Today*. – 2005. – №10. – C.1451-1458.
52. Allen, M.J. Preclinical Evaluation of a Poly (Vinyl Alcohol) Hydrogel Implant as a Replacement for the Nucleus Pulposus / M.J. Allen, J.E. Schoonmaker, T.W. Bauer // *Spine (Phila. Pa. 1976)*. – 2004. – №29. – C.515-523.
53. Chen, D. Transport and hydrolysis of urea in a reactor–separator combining an anion-exchange membrane and immobilized urease / D. Chen, J. Leu, T. Huang // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* – 1994. – №61. – C.351-357.
54. Zhou, Y. Electrospinning of chitosan/poly(vinyl alcohol)/ acrylic acid aqueous solutions / Y. Zhou, D. Yang, J. Nie // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2006. – №102. – C.5692-5697.
55. Zhang, Y. Preparation of electrospun chitosan/poly(vinylalcohol) membranes/ Y. Zhang, X. Huang, B. Duan // *Colloid Polym. Sci.* – 2007. – №285. – C.855-863.
56. Asran, A.S. Nanofibers from blends of polyvinyl alcohol and polyhydroxybutyrate as potential scaffold material for tissue engineering of skin/ A.Asran, K. Razghandi, N. Aggarwal // *Biomacromolecules*. – 2010. – №11(12). – C.3413-3421.
57. Moran J.M., Pazzano D., Bonassar L.J. Characterization of polylactic acid-polyglycolic acid composites for cartilage tissue engineering/ J.M. Moran, D. Pazzano, L.J. Bonassar // *Tissue Eng.* – 2003. – №9(1). – C.63-70.
58. Singhal A.R., Agrawal C.M., Athanasiou K.A. Salient degradation features of a 50:50 PLA/PGA scaffold for tissue engineering/ A.R. Singhal, C.M. Agrawal, K.A. Athanasiou // *Tissue Eng.* – 1996. – №2(3). – C.197-207.
59. Li, X. In situ injectable nano-composite hydrogel composed of curcumin, N,O-carboxymethyl chitosan and oxidized alginate for wound healing

application/ X. Li, S. Chen, B. Zhang // *Int. J. Pharm.* – 2012. – №431(1). – С.110-119.

60. Khalilov, R.I. Effect of ultraviolet radiation on structural-functional characteristics of the thylakoid membrane/ R.I. Khalilov, G.B. Khomutov, A.N. Tikhonov // *Russ.Plant Physiol.* – 1993. – №40. – С.338-442.

61. Zhang, J. A comparative study of porous scaffolds with cubic and spherical macropores/ J. Zhang, L. Wu, D. Jing // *Polymer.* – 2005. – №46(13). – С.4979-4985.

62. Chen, G. Scaffold design for tissue engineering/ G. Chen, T. Ushida, T. Tateishi // *Macromolecular Bioscience.* – 2002. – №2(2). – С.67-77.

63. Cheng, Y.L. Development of dynamic masking rapid prototyping system for application in tissue engineering/ Y.L. Cheng, M.L. Lee // *Rapid Prototyp. J.* – 2009. – №15(1). – С.29-41.

64. Amirthalingam, M. Bioactive PLGA–curcumin microparticle-embedded chitosan scaffold: in vitro and in vivo evaluation / M. Amirthalingam, N. Kasinathan, A. Amuthan // *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* – 2017. – №45(2). – С.233-241.

66. Волова, Т. Г. Полиоксикалканоаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины / Т. Г. Волова, В.И. Севастьянов, Е.И. Шишацкая. – Новосибирск: Издательство СО РАН. – 2003. – 330 с.


67. Волова, Т. Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии [Электронный ресурс]: электрон. учеб. пособие / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов. – Электрон. дан. (6 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2009. – (Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии: УМКД №1324– 2008 / рук. творч. коллектива Т. Г. Волова). – 1 электрон. опт. диск (DVD).

68. Vinnik, I.S. The current dressings for wound care in the treatment of purulent wounds/ I. Vinnik, N. Markelova, N. Solov'Eva // *Nov. Khirurgii.* – 2015. – №23(5). – С.552–558.

69. Murueva, A. V. The Use of Polymeric Microcarriers Loaded with Anti-Inflammatory Substances in the Therapy of Experimental Skin Wounds/ A. Murueva A. Shershneva, E. Shishatskaya // Bull. Exp. Biol. Med. – 2014. – №157(5). – С. 597–602.
70. Philip, S. Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable polymers with a range of applications / S. Philip, T. Keshavarz, I. Roy // Journal of Chemical Technology and Biotechnology. – 2007. – №82(3). – С.233-247.
71. Chen, G.Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials/ G.Q. Chen, Q. Wu // Biomaterials. – 2005. – №26(33). – С.6565-6578.
72. Ljungberg, C. Neuronal survival using a resorbable synthetic conduit as an alternative to primary nerve repair / C. Ljungberg, G. Johansson-Ruden, K. Junemo Boström // Microsurgery. – 1999. – №19(6). – С.259-264.
73. Keshel, S.H. The healing effect of unrestricted somatic stem cells loaded in collagen-modified nanofibrous PHBV scaffold on full-thickness skin defects/ S. Keshel, E. Biazar, M. Rezaei Tavirani // Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol. – 2014. – №26(33). – С.6565-6578.
74. Harrison, R.G. Observations on the living developing nerve fiber / Harrison, R.G. // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1907.
75. Schaffer, W.I. Terminology associated with cell, tissue and organ culture, molecular biology and molecular genetics/ W.I Schaffer // Vitro. Cell. Dev. Biol. – 1990. – №26(1). – С.97-101.
76. Фрешни, Р. Я. Культура животных клеток : практическое руководство /Р. Я. Фрешни. — пер. 5-го англ. изд. — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. — С. 691.
77. Gey, G.O. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium / G.O. Gey, W.D. Coffmann, M.T. Kubicek // Cancer Res. 1952.

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующая кафедрой  
 Т.Г. Волова

« 28 » июня 2021 г.


**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 - Биология

ИЗУЧЕНИЕ БИОРАЗРУШАЕМЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ РЕПАРАЦИИ  
КОЖИ

Научный руководитель  профессор, д.б.н. Шишацкая Е.И.

Выпускник

  
подпись, дата      должность, ученая степень      инициалы, фамилия  
Шароватова Н.В.  
подпись, дата      инициалы, фамилия

Красноярск 2021