

УДК 57.085.23

Разработка наноструктурированного биопластического материала для комбустиологии

© 2020 И.Р. ГИЛЬМУТДИНОВА^{1*}, Е.Ю. КОСТРОМИНА¹, Р.Д. ЯКУПОВА², П.С. ЕРЕМИН¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 121099

² ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 119146

*e-mail: gilm.ilmira@mail.ru

Поступила в редакцию 02.03.2020 г.

После доработки 20.03.2020 г.

Принята к публикации 08.07.2020 г.

Описана методика получения нового биопластического материала на основе коллагена, эластина и гиалуроновой кислоты, а также представлены результаты исследования структуры и свойств биоматериала с целью оценки перспективы его дальнейшего использования в клинической практике. При изготовлении образцов биоматериала коллаген, эластин и гиалуроновая кислота смешивались в заданных пропорциях; полученная пленка подвергалась фотохимической сшивке под действием ультрафиолетового излучения. Для оценки цитотоксичности и биосовместимости биоматериала использовали коммерческую культуру клеток фибробластов кожи человека HDF. Цитотоксического действия образцов материала не обнаружено. Визуализацию и исследование структуры опытных образцов проводили с использованием световой микроскопии. Показано, что полученный биоматериал характеризуется высокой эластичностью и упругостью, а также отличается высокой пористостью (с диаметром пор 100-200 мкм). Установлено, что биоматериал способен сохранять свои физические свойства в культуральной среде на протяжении более 10 сут, при этом полная деструкция матрикса наблюдалась через 3-4 недели после начала инкубации. Благодаря своим физическим свойствам и структуре, а также способности обеспечивать эффективные условия для хорошей пролиферации клеток созданный биоматериал может быть использован на поврежденных участках кожи в качестве раневого покрытия. Это позволяет рассматривать его в качестве перспективного биоматериала для использования в клинической практике.

Ключевые слова: клеточные технологии, тканеинженерные конструкции, биопластический материал, коллаген, фибробласты человека

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-65-68

Лечение ран различной этиологии консервативными методами не всегда приводит к ожидаемым результатам [1]. В связи с этим требуется разработка новых современных раневых покрытий, способствующих более эффективному лечению и регенерации кожных покровов [2]. Важным требованием к созданию биопластических материалов является их адгезивность, пластичность, биосовместимость, максимальная приближенность по фиброархитектонике к тканям организма и биологическая активность, позволяющая достигать определенного фармацевтического эффекта от их применения [3,4]. Для получения биопластических материалов используют полимеры (природные и синтетические), металлы, неорганические материалы, материалы на основе

углерода и композиты на их основе. Природными полимерами могут быть белки (например, коллаген, фибрин), полисахариды (например, хитозан, альгинат, декстран и др.), а синтетическими – поливиниловый спирт, полиэферы, полифосфазены, полиангидриды и др [2,5]. В настоящее время при разработке имплантируемых материалов для восстановительной и заместительной медицины предпочтение отдается полимерам природного происхождения (биополимерам) и их производным [2]. При имплантации они расщепляются на более простые соединения, которые выводятся из организма, либо принимают участие в метаболизме на клеточном уровне. Преимуществом биополимеров является то, что при их деградации не образуются токсичные продукты [6]. Для

получения систем с оптимальными свойствами (пористость, набухаемость, эластичность, механическая прочность и т.д.) разрабатываются композитные матрицы, включающие в состав несколько взаимодополняющих компонентов. Среди таких продуктов особое внимание заслуживают материалы на основе коллагена и гиалуроновой кислоты – главных компонентов внеклеточного матрикса, которые принимают участие в восстановлении поврежденных структур дермы [3,4,7].

Цель настоящей работы заключалась в создании биопластического материала на основе коллагена, эластина и гиалуроновой кислоты и исследовании его структуры и свойств для оценки перспективы дальнейшего использования в клинической практике.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Получение биопластического материала

В процессе разработки материала подбирали условия получения гидрогеля и время воздействия на него ультрафиолетовым излучением для формирования фотохимической сшивки будущего биоматериала. Технология, при использовании которой полученные образцы сохраняли свои физические свойства и стабильность в ростовой среде на протяжении максимального периода времени, была использована для дальнейшего получения экспериментальных образцов.

Для изготовления биопластического материала использовали следующие компоненты: коллаген, эластин и гиалуроновую кислоту. При подборе соотношения используемых компонентов ориентировались на пропорции их содержания в дерме взрослого человека: коллаген: 70–90%, гиалуроновая кислота 5–26%, эластин 1–25%. Для получения гидрогеля сухие вещества смешивали в пропорции: коллаген – 70 %, гиалуроновая кислота – 20 %, эластин – 10 %. Добавляли дистиллированную воду и с помощью лопастной мешалки с подогревом до 37 °С, мешали на средней скорости 5 мин. Жидкость разливали по гидрофобным поддонам и оставляли в ламинарном шкафу под ультрафиолетовым излучением на 6 ч. Фотохимическую сшивку осуществляли с помощью источника ультрафиолетового излучения ($\lambda < 230$ нм, при расстоянии от источника излучения до биоматериала 30 см). Затем полученную пленку выдерживали при комнатной температуре в течение 18 ч.

Оценка физических свойств биопластического материала. При помощи лабораторных аналитических весов (Ohaus Corp., США) подготавливали одинаковые по массе образцы (1 г),

которые помещали в чашки Петри $d=94$ (Corning, США), заливали 5 мл ростовой среды (DMEM с содержанием глюкозы 4500 мг/л (StemCell Technology, США), с добавлением 10% FBS (Biological Industries, Израиль) и 2 ммоль/л L-глутамина (StemCell Technology) и визуализировали под микроскопом. Далее материалы помещали на орбитальный шейкер (Elmi Ltd, Латвия) со скоростью вращения 50 об/мин и переносили в CO₂ инкубатор (Sanyo, Япония) при стандартных условиях – 37 °С, 5% CO₂. Через каждые 24 ч материал взвешивали и отбирали 10 мкл супернатанта для исследования изменения оптической плотности на сканирующем спектрофотометре NanoDrop 2000C (Thermo Fisher Scientific, США).

Оценка цитотоксичности и биосовместимости биопластического материала. Исследования цитотоксичности биопластического материала выполняли на коммерческой культуре клеток фибробластов кожи человека HDF (Cell Applications, США, кат. № 106K-05a). Культуру клеток пассировали на чашки Петри, с плотностью $25 \cdot 10^3$ клеток/см² и культивировали по методике, рекомендованной производителем, до образования монослоя [8]. После чего отбирали супернатант, добавляли новую порцию ростовой среды, помещали образец биоматериала и оставляли на 72 ч в CO₂ инкубаторе. По истечении этого времени отбирали супернатант и переносили в новую чашку Петри для подсчета погибших клеток. Клетки в исследуемых чашках Петри снимали с поверхности чашек при помощи трипсина-ЭДТА (StemCell Technology) и производили подсчет с оценкой жизнеспособности на автоматизированном счетчике Countess (Invitrogen, Korea) по методике производителя.

Для исследования биосовместимости биопластического материала, образцы размером 0,5 см² помещали в чашку Петри и вносили 1 мл суспензии клеток фибробластов кожи человека HDF в количестве $12,5 \cdot 10^3$, формируя «каплю». Выдерживали 30 мин в CO₂-инкубаторе, после чего доливали ростовую среду и культивировали в течение 10 сут. Для определения жизнеспособности клеток использовали дифференциальный метод визуализации клеток с помощью красителей SYTO 9 (Invitrogen, США) и пропидиум йодида (Sigma-Aldrich, США). Количество живых и мертвых клеток определяли по числу ядер, выявленных SYTO 9 и пропидиум йодидом соответственно.

Визуализация и исследование структуры образцов

Исследование цитотоксичности и биосовместимости биоматериала проводили с использованием исследовательского инвертированного

микроскопа Leica DMI4000 (Leica Microsystems, Германия) и лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 510 META на базе инвертированного микроскопа Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия), Анализ изображений и подсчет количества клеток на мм^3 матрицы проводили с использованием программного обеспечения Zeiss 3D for LSM Version 1.4.2 (Carl Zeiss).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика раневого покрытия и физические свойства

Полученный биоматериал характеризуется эластичностью и упругостью, что позволяет использовать его на поврежденных участках кожи с неровным рельефом или на подвижных участках. Материал так же обладает высокой пористостью (рис.1), что позволяет осуществлять газообмен раневой поверхности и вывод экссудата. Учитывая физические свойства полученного биоматериала, можно сделать предположение, что он также может использоваться как скаффолд для культивирования клеточных культур. Благодаря структуре биоматериала создаются оптимальные условия для межклеточного взаимодействия и миграции клеток, за счет которых обеспечивается однородность условий культивирования клеточной культуры.

Исследование стабильности матрикса в культуральной среде показало, что данный материал способен сохранять свои физические свойства на протяжении более чем 10 сут (рис.2). По истечении 5 сут находившийся в CO_2 инкубаторе биоматериал деградировал на 10–15%. Полная деструкция биоматериала происходила на 3–4 неделе инкубации.

Оценка цитотоксичности и биосовместимости. Совместное культивирование биопластического материала с культурой клеток фибро-

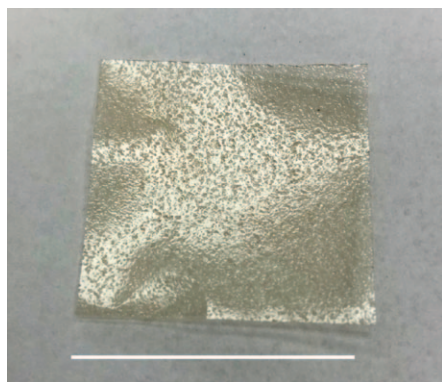


Рис. 1. Внешний вид биоматериала. Деление шкалы соответствует 1 см.

Fig. 1. The appearance of the created bioplastic material. Scale bar = 1 cm.

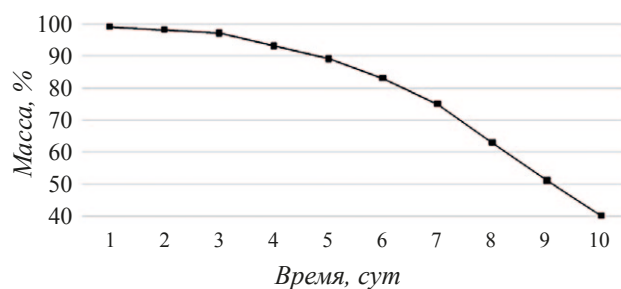


Рис. 2. Динамика изменения массы образца биоматериала при выдерживании в культуральной среде.

Fig. 2. The dynamics of the biomaterial mass change in a culture medium.

бластов человека показало отсутствие какого-либо цитотоксического действия на культуру клеток. После 72 ч инкубации, в культуральной жидкости отсутствовали слущенные клетки, морфологические параметры фибробластов на поверхности пластика не изменялись. Кроме того, отмечалось, что в присутствии образцов материала, пролиферативная активность клеток была выше, чем в группе контроля. При культивировании культуры клеток фибробластов на биоматрице было отмечено, что все клетки прикреплялись к поверхности в течение 4–6 ч инкубации. Для изучения динамики роста клеток в матриксе фибробласты культивировали в течение 2 недель. Подсчет количества клеток осуществляли на изображении горизонтальной проекции серии оптических срезов матрикса известной толщины. Наличие делящихся клеток было обнаружено уже через 24 ч после прикрепления. Общее количество клеток составило 420 ± 84 клеток на мм^3 . Через 5 дней количество клеток увеличилось до 751 ± 138 на мм^3 (рис.3). Максимальное количество клеток наблюдалось на 10 сутки после прикрепления, и составило

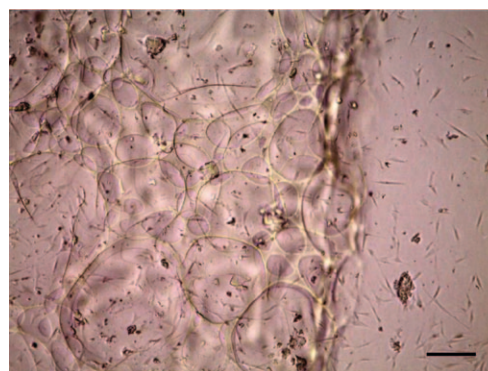


Рис. 3. Определение методом световой микроскопии растущих на матрице клеток через 5 сут. культивирования. Увеличение $\times 200$. Деление шкалы соответствует 100 мкм.

Fig. 3. Visualization of cells growing on the matrix after five days of cultivation using light microscopy. Magnification $\times 200$. Scale bar = 100 μm .

2122±315 на мм³. При культивировании на плоской поверхности клеточная культура фибробластов достигала монослоя на 6 сутки.

Выводы. Разработанный биоматериал, благодаря своему составу, структуре и физическим свойствам, обеспечивает эффективные условия для хорошей пролиферации клеток, что позволяет рассматривать его в качестве перспективного раневого покрытия для использования в клинической практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. K.V. Kotenko, I.I. Eremin, B.B. Moroz et al. Cellular technologies in the treatment of radiation burns: the experience of the FMBC them. A.I. Burnazyan. *Cell transplantation and tissue engineering*. 2012, 7(2), 97–102.
2. L.I. Kalyuzhnaya, D.A. Zemlyanoy, D.V. Tovpeko, S.V. Chebotarev. Analysis of the world experience of using the umbilical cord biomaterials in tissue engineering and 3d bioprinting. *Medicine and Health Organization*, 2019, 4, 440–55
3. A.V. Martyukova, M.O. Kurtukova, D.V. Popryga, E.I. Cherevko, A.N. Ivanov. Current issues of matrix development for tissue engineering. *Fundamental scientific research: theoretical and practical aspects*. 2017, 2, 158–160
4. M.I. Shtilman, Ya.O. Mezhuiev. Implanted and unimplanted medical and biological polymers, *Fibre Chemistry*, 2016, 48, 249–252.
5. J.J. Guan, M.S. Sacks, E.J. Beckman, W.R. Wagner. Synthesis, characterization, and cytocompatibility of elastomeric, biodegradable poly(ester-urethane)ureas based on poly(caprolactone) and putrescine. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002, 61493–503. doi: 10.1002/jbm.10204
6. M.I. Shtilman Chapters “Biodegradation” and “Bioactive Systems” In: *Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials*. Taylor & Francis, 2016, pp. 469–474, 804–816
7. Christopher A. Carruthers, Christopher L. Dearth et al. Histologic Characterization of Acellular Dermal Matrices in a Porcine Model of Tissue Expander Breast Reconstruction. *Tissue Eng Part A*, 2015, 21, 35–44. doi: 10.1089/ten.TEA.2014.0095
8. <https://cellapplications.com/sites/default/files/documents/instructions/Instructions%20HDF.pdf>

Creation of a Novel Nanostructured Bioplastic Material for Combustiology

I.R. GILMUTDINOVA^{1*}, E.Yu. KOSTROMINA¹, R.D. YAKUPOVA², and P.S. EREMIN¹

¹National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 121099, Russia

²I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 119146, Russia

*e-mail: gilm.ilmira@mail.ru

Received March 3, 2020

Revised March 20, 2020

Accepted July 8, 2020

Abstract—The technique of obtainment of a new bioplastic material based on collagen, elastin and hyaluronic acid is described. The results of a study of the biomaterial structure and properties to assess the prospects for its further use in clinical practice are also presented. To prepare the material samples, collagen, elastin and hyaluronic acid were mixed in predetermined proportions with distilled water, and the resulting biofilm was crosslinked by UV irradiation. A commercial human skin fibroblast cell culture (HDF) was used to assess the biomaterial cytotoxicity and biocompatibility; as a result, it was shown that cytotoxicity is absent in it. The visualization and studies of the biomaterial structure were carried out using light microscopy. The new material was shown to be highly elastic and resilient; it also had a high porosity with a pore diameter of 100–200 μm. It was shown that the biomaterial samples were able to maintain physical properties in the culture medium for more than 10 days, while the complete destruction of the matrix was observed 3–4 weeks after the beginning of incubation. Due to its physical properties and structure, and also the capacity of providing effective conditions for good cell proliferation, the created biomaterial can be used as a wound cover in the damaged skin areas. This allows us to consider the new biomaterial promising for clinical practice.

Key words: cell technologies, tissue-engineered constructs, bioplastic material, collagen, human fibroblasts.

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-65-68