

ЗАВИСИМОСТЬ ЭФФЕКТИВНОСТИ КЛЕТОЧНОГО РОСТА НА БИОСИНТЕТИЧЕСКИХ МЕДИЦИНСКИХ МАТЕРИАЛАХ ОТ МИКРОСТРУКТУРЫ ИХ ПОВЕРХНОСТИ

© В. Б. Гаврилюк,¹ В. К. Иванов,² А. В. Куликов,¹ Б. К. Гаврилюк¹

¹ *Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуцзино,*
и ² *Институт общей и неорганической химии им. Н. С. Курнакова РАН, Москва;*
¹ *электронный адрес: gavrilyuk@mail.ru*

Проведено исследование эффективности (стимуляции клеточного роста) нового класса раневых покрытий биосинтетического типа, в которых природные и синтетические полимерные компоненты расположены не послойно, а в единой структуре, т. е. образуют новый композитный материал. Изучено, в частности, изменение взаимодействия поверхности покрытия с клетками поврежденной ткани и (или) культуры, выращенной *in vitro*, в зависимости от микроструктуры поверхности. Микроструктуру поверхности исследовали с помощью метода растровой электронной микроскопии при высоких разрешениях. Показан характер изменений структуры биосинтетических покрытий в зависимости от вариаций состава и соотношения компонентов. Продемонстрирована роль микроструктуры покрытия для эффективности его работы. Выявлены факторы, оказывающие наиболее значительное влияние на регенеративные свойства покрытий.

Ключевые слова: культивирование клеток, раневые покрытия, микроструктура поверхности, регенерация.

Развитие клеточных технологий сопровождается созданием новых материалов, которые включают в себя синтетическую или биологическую матрицу с помещенной и растущей на ней клеточной культурой.

Временные раневые покрытия являются сейчас основным средством лечения ран, вытесняя старые перевязочные средства. Их можно разделить на 2 основные группы — из синтетических материалов и из натуральных продуктов. Они должны отвечать целому ряду следующих требований: иметь механическую прочность, газо- и паропроницаемость, ареактивность, нетоксичность и неаллергенность, а также способствовать заживлению ран и не оказывать отрицательного влияния на рост клеток. В связи с этим важно рассмотреть вопрос о том, какие материалы могут быть оптимальными для решения подобных задач и какие свойства этих материалов особенно важны для клеточного роста и функционирования.

В настоящее время имеется большое количество (несколько сотен) синтетических материалов различных фирм, которые обладают в основном хорошими механическими и защитными свойствами, но слабо выраженным стимулирующим действием на клетки и ткани организма. Покрытия из натуральных материалов обладают хорошо выраженными регенерационными свойствами, но при этом имеют низкую прочность и быстро разрушаются на ране под действием ферментов. Попытка стабилизировать такие препараты путем различных химических обработок и сшивок резко снижает регенераторную способность покрытия. Современные раневые покрытия достаточно далеко ушли от традиционных текстильных

материалов и представлены гелями, гидроколлоидами, пленками, пленкообразующими композициями и др. (Валуев и др., 2003; Юданова, Решетов, 2006). В частности, широкое распространение получили разнообразные коллагенсодержащие покрытия (Lazovic et al., 2005).

Очевидный интерес представляет изучение зависимости эффективности работы покрытий от различных факторов. В существующих работах основное внимание естественным образом уделяется вопросам состава полимерных покрытий — соотношения отдельных компонентов и способам их оптимального соединения, а также сочетания их свойств (Шаповалов, 2005).

В последнее время появляются и работы, в которых внимание исследователей обращено и на анализ структуры покрытий. При изучении структуры раневых покрытий речь обычно идет о решении определенных частных вопросов, например о разработке методов и технологий для создания покрытий с определенным размером пор или определенным распределением по поверхности необходимых биологически активных элементов (Чекмарева и др., 2000; Кильдеева и др., 2006).

Одним из приоритетных направлений тканевой инженерии является восстановление структурной целостности кожных покровов, поврежденных в результате ожогов, трофических язв и воздействий другого рода. Для этой цели применяют комплексный подход, в котором кроме использования эффективных регенераторных покрытий дополнительно применяют еще и наложение культуры клеток, выращенных *in vitro*. Поэтому весьма интересна возможность выращивания клеток непосредственно на

поверхности используемого покрытия и совмещения, таким образом, двух функций. Однако гидрофобный характер поверхности большинства полимерных матриц и отсутствие специфических сайтов связывания с клеточными рецепторами требуют включения в состав матрицы белковых наноструктур, в частности коллагена, или других белков внеклеточного матрикса (Швед и др., 2007).

Такие материалы создаются либо химической модификацией биологического материала, либо послойным нанесением («сендвичевым»), например, коллагена на синтетическую полимерную пленку. Соответственно основным вопросом в структурных исследованиях в этой области является устойчивость комплексных структур при создании устойчивых коллагеновых слоев в зависимости от способа их нанесения на полимерную основу, от источника коллагена и характера его предварительной обработки (Бушуев и др., 2006; Швед и др., 2007). Наиболее интересными с практической точки зрения являются раневые покрытия биосинтетического типа, в которых природные и синтетические полимерные компоненты расположены не послойно, а в единой структуре, т. е. образуют новый композитный материал.

Нами создан композиционный материал, совмещающий положительные свойства синтетических и природных полимеров. Разработан совершенно новый подход к формированию структуры биосинтетических материалов из коллоидных систем водных дисперсий синтетических латексов и растворов биополимеров, который позволил вводить в синтетический материал природные макромолекулы и низкомолекулярные регуляторы без потери их свойств (Гаврилюк, Гаврилюк, 2002). При этом не только сохраняются свойства исходных материалов, но и возникают новые синергетические эффекты, позволяющие активировать регенеративные процессы.

Особое значение имеет структура поверхности раневых покрытий, так как именно она в наибольшей степени определяет возможность выращивания на ней культуры клеток, переносимой впоследствии на рану, а также оказывает влияние на функционирование и развитие клеток в ране. Поэтому весьма важным представляется изучение свойств, проявляемых такими композитами в зависимости от сформированной поверхностной структуры материала.

Целью настоящей работы явилось исследование коллагенсодержащих раневых покрытий и зависимости их свойств от условий получения и строения поверхности.

Материал и методика

Изучение микроструктуры образцов материалов проводили методом растровой электронной микроскопии (РЭМ) на рабочей станции Carl Zeiss NVision 40 при ускоряющем напряжении 0.5 и 1 кВ с использованием детекторов вторичных и обратнорассеянных электронов. Съемку осуществляли без предварительного напыления проводящих материалов на поверхность образцов. Покрытие изготавливали из синтетического фторлатекса марки СКФ производства Кирово-Чепецкого химкомбината (Россия), смеси растительных полисахаридов на основе производных целлюлозы и очищенного животного диазоколлагена (Гаврилюк и др., 1988).

Использовали метод, позволяющий создавать материал на основе сочетания природных и синтетических полимеров (Гаврилюк, Гаврилюк, 2002). Использовали ку-

льтуры фибробластов, выделенные из абортивного материала, свободного от микробов и вирусов, от здоровых доноров. Использовали клетки 3—4-го пассажа. Клетки сеяли на покрытие при концентрации 20 тыс. кл./см² и культивировали в среде ДМЕМ/F12, содержащей 10 % коровьей эмбриональной сыворотки, в течение 72 ч при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Использовали среды и сыворотки от фирмы Sigma (США) и инкубатор от фирмы Binder (Германия). Контроль за ростом клеток на поверхности покрытия осуществляли с помощью инвертированного микроскопа AXIOVERT-200 фирмы Zeiss (Германия).

Результаты и обсуждение

Были изготовлены образцы покрытий с вариациями по составу и технологии соединения компонентов. Различия заключались в технологии подготовки исходного фторлатекса и в процентном содержании природных полимеров в смеси (от 20 до 80 %). Синтетический латекс СКФ характеризуется гидрофобностью, стойкостью к химическим и физическим воздействиям и инертностью при контакте с жидкостями организма. Созданные на его основе раневые покрытия, содержащие биологические компоненты растительного и животного происхождения, приобретают новые, крайне важные свойства. Сначала, когда эти покрытия накладывают на рану, они прочно прикрепляются к ране благодаря гидрофильности биологических компонентов. По окончании выхода биокомпонентов, они становятся полностью гидрофобными и легко отходят от поверхности, не травмируя вновь образовавшиеся ткани.

Нам необходимо было отобрать образцы, способные служить еще и подложкой для выращивания клеток. Клетки должны как минимум прикрепляться к поверхности, расплываться по ней, а в оптимальном случае — быстро расти и размножаться. Скорость роста и образование монослоя клеток культуры в нашем случае служили критерием эффективности покрытия.

По результатам соответствующих экспериментов были выделены два наиболее интересных образца, на которых прикрепление и функционирование клеток были наиболее успешными (образцы 1 и 2). На образце 1 рост и размножение шли несколько быстрее, чем на образце 2, клетки хорошо расплывались по поверхности, но росли отдельными колониями, причем с течением времени количество и величина пустых промежутков не только не уменьшались, но даже увеличивались (рис. 1). На образце 2 прикрепление и рост клеток по всей поверхности покрытия тоже происходили, но с малой скоростью (рис. 2, а).

Структуру поверхности выбранных образцов исследовали методом РЭМ. Необходимо отметить, что фторлатекс в исходной эмульсии стабилизируется микродобавками веществ, имеющих поверхностно-активные свойства. В зависимости от количества и характера применяемых веществ поверхность получающихся глобул фторлатекса может различаться и влиять на взаимодействие глобул друг с другом, а также с остальными компонентами смеси. Как следует из анализа микрофотографий (рис. 2, а, б), образец 1, отличавшийся высокой степенью стабилизации поверхности глобул фторлатекса в исходной смеси, характеризовался сильным взаимодействием глобул фторлатекса в конечном материале с незначительным проникновением в этот слой активной смеси биопо-

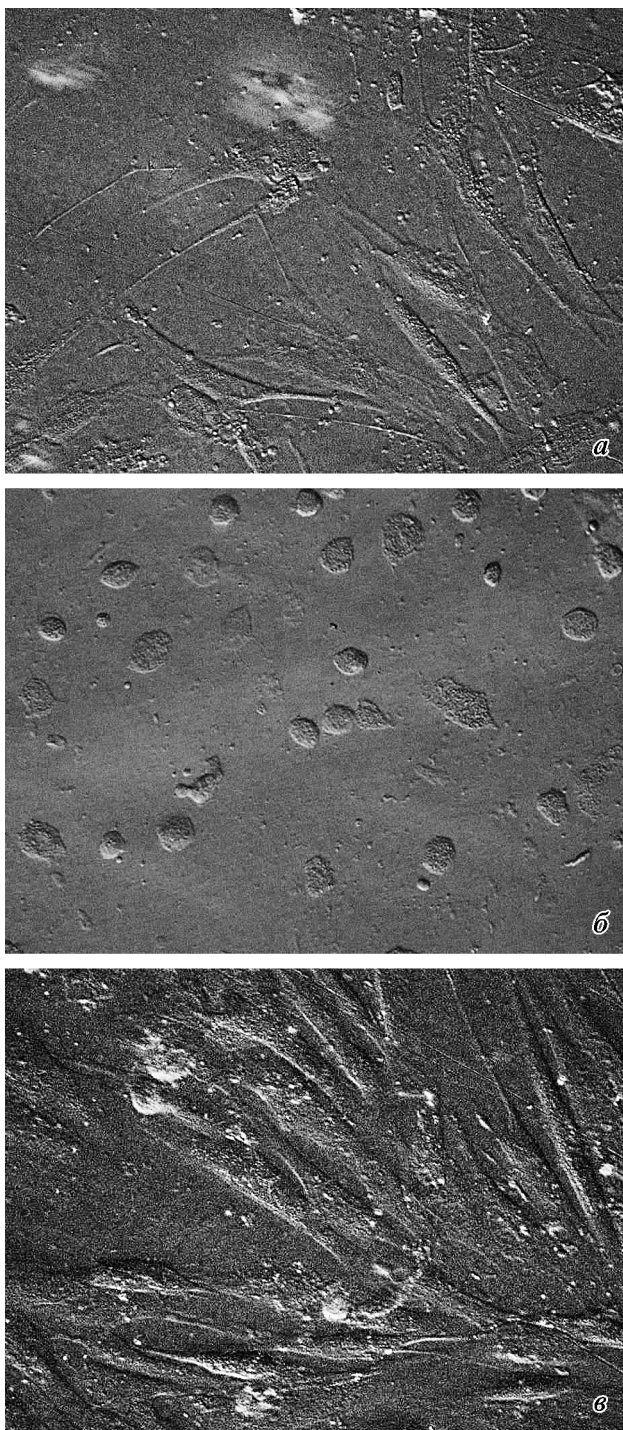


Рис. 1. Прикрепление и рост клеток на образцах покрытия 1 (а), 2 (б) и 3 (в).

Покрытие изготовлено на основе фторлатекса. образцы различаются по составу и технологии соединения компонентов. Об. 40X.

лимеров. Основная масса смеси биополимеров при этом оставалась на поверхности сформировавшегося покрытия. По-видимому, в результате такого распределения компонентов при взаимодействии с жидкостью, находящейся в ране, или с моделирующей рану средой биоактивная природная составляющая материала достаточно быстро вымывается с поверхности, из-за чего рост клеток недостаточно активен. При этом там, где на поверхность

выходил синтетический слой, наблюдали отсутствие роста клеток (на фторлатексе они не растут).

Таким образом, из-за слишком сильного взаимодействия глобул синтетической фазы концентрация биополимеров, распределенных в ней, оказывалась недостаточной для результативного клеточного функционирования. Это предположение объясняет и увеличение площади «бесклеточных» промежутков на покрытии с течением времени: в наиболее тонких местах располагавшиеся на поверхности биополимеры просто растворялись с течением времени, открывая слой с преимущественным содержанием фторполимера. Подтверждает это и картина роста клеток (рис. 1, а), где явно видно отсутствие клеток на месте нарушения биополимерного слоя (левый верхний угол рис. 1, а).

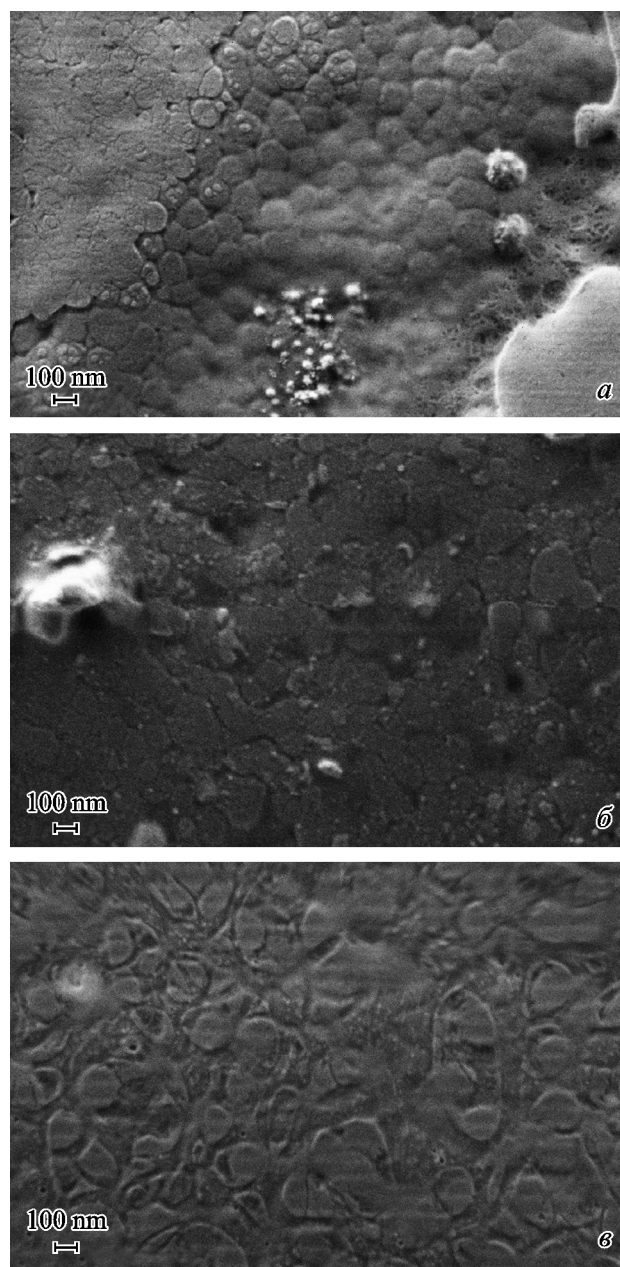


Рис. 2. Микроструктура поверхностей покрытия 1 (а), 2 (б) и 3 (в).

Глобулы фторлатекса и биоматериал в межглобулярном пространстве.

Образец 2 характеризовался несколько меньшей, чем образец 1, степенью стабилизации поверхности глобул синтетического фторполимера и меньшим содержанием биополимеров в исходной смеси. Изучение структуры поверхности этого образца показало, что распределение компонентов смеси здесь более равномерное по сравнению с образцом 1, однако глобулы фторполимера все еще достаточно плотно соединены между собой, незначительно изменяют свою форму при формировании каркаса и оставляют не слишком много свободного места для биополимеров. Таким образом, несмотря на то что поверхность покрытия полностью покрыта биополимерами, свойства синтетических глобул оказывают значительное влияние на характеристики покрытия в целом. С одной стороны, биополимеры прочно держатся на поверхности и проявляют свои свойства в течение длительного срока, с другой стороны, прикрепление клеток к поверхности и скорость их роста хуже, чем на образце 1: большинство клеток осталось круглыми и не распласталось по поверхности.

Поскольку фторлатекс является основой, формирующей требуемые физико-механические свойства покрытий, в ходе изготовления покрытия глобулы фторлатекса не должны разрушаться, т. е. концентрация стабилизирующих агентов не должна снижаться. Иными словами, при разработке композиции на основе фторлатекса речь должна скорее идти о выборе типа агентов (например, низкомолекулярные или высокомолекулярные). Было сделано предположение о том, что применение образцов фторлатекса, стабилизированного агентами, наиболее родственными к применяющимся в покрытии природным полимерам, позволит улучшить регенеративные свойства покрытия без потери его физико-механических свойств. Поэтому предположили, что лучшими качествами смогут обладать фторлатексы, в которых применяется стабилизатор на основе полианионных полисахаридов.

На основе этого предположения и полученных результатов нами было изготовлено покрытие 3. Был выбран состав стабилизирующих фторлатекс агентов, наиболее комплементарный полисахаридной составляющей покрытия, и одновременно подобрана минимальная концентрация, достаточная для стабилизации глобул. Исследование структуры поверхности образца 3 показало, что разработанный вариант изготовления покрытия позволил получить образец с гораздо более равномерным распределением составляющих, причем расстояние между глобулами оказалось существенно большим, чем у образцов 1 и 2, что в свою очередь способствует увеличению содержания биополимеров в составе и на поверхности композитов (рис. 2, в). Физико-механические свойства композита при этом не ухудшились — механическая прочность и паропроницаемость всех трех образцов различались не более чем на 6—7 %, т. е. практически в пределах ошибки определения (5—6 %). Наличие такого покрытия позволило предположить, что оно может быть наиболее эффективным из числа всех исследованных, по-

скольку сочетает в себе оптимальные физико-механические и регенерационностимулирующие свойства.

Эксперименты по культивированию клеток на образцах, полученных по методике образца 3, подтвердили наши предположения. Распластывание и рост клеток на таких покрытиях происходили равномерно (рис. 1, в), образование монослоя достигалось на 3-и сут. На всех остальных покрытиях образования монослоя не происходило.

Итак, мы показали зависимость характера изменений структуры биосинтетических покрытий от вариаций состава и соотношения компонентов и продемонстрировали роль микроструктуры покрытия для эффективного роста клеток. Благодаря анализу структурных данных и оптимизации состава биосинтетического покрытия мы нашли вариант структуры покрытия, который в максимальной степени соответствует задачам комплексного применения покрытий при использовании клеточных технологий.

Список литературы

- Бушуев Ю. И., Денисов В. М., Зимин Ю. В., Пылаева С. И., Анфимов П. Е., Краснова Н. С. 2006. Действие ксеногенного иммобилизованного костного матрикса на течение раневого процесса. Бюлл. эксперим. биол. мед. 141 (4) : 448450.
- Валуев Л. И., Валуева Т. А., Валуев И. Л., Платэ Н. А. 2003. Полимерные системы для контролируемого выделения биологически активных соединений. Успехи химии. 43 (2) : 307—328.
- Гаврилюк Б. К., Гаврилюк В. Б. 2002. Покрытие для ран. Патент № 2193895 от 10.12.2002.
- Гаврилюк Б. К., Рочев Ю. А., Николаева Т. И. 1988. Культура клеток и реконструкция ткани (на примере кожи). Пуццино. 124 с.
- Кильдеева Н. Р., Вихорева Г. А., Гальбрайт Л. С., Мионов А. В., Бонарцева Г. А., Перминов П. А., Ромашова А. Н. 2006. Получение биодеградируемых пористых пленок для использования в качестве раневых покрытий. Прикл. биохим. микробиол. 42 (6) : 716—720.
- Чекмарева И. А., Вторин Б. В., Адамян А. А., Добыш С. В., Захарова О. А., Васильев А. В., Килимчук Л. Е. 2000. Специфическое влияние эпидермального фактора роста, иммобилизованного в раневое покрытие с растворимым коллагеном, на заживление ран в эксперименте. Бюлл. эксперим. биол. мед. 129 (4) : 465—469.
- Шаповалов С. Г. 2005. Современные раневые покрытия в комбустиологии. ФАРМиндекс-Практик. 8 : 38—46.
- Швед Ю. А., Кухарева Л. В., Блинова М. И., Пинаев Г. П., Зорин И. М., Билибин А. Ю. 2007. Взаимодействие культивируемых клеток кожи с разными структурными формами коллагена, нанесенного на полилактидную матрицу. Цитология. 49 (1) : 32—39.
- Юданова Т. Н., Решетов И. В. 2006. Современные раневые покрытия: получение и свойства: обзор. Хим.-фарм. журн. 40 (2) : 24—31.
- Lazovic G., Colic M., Grubor M., Jovanovic M. 2005. The application of collagen sheet in open wound healing. Ann. Burns Fire Disasters. 18 : 151—156.

Поступила 23 VI 2013

DEPENDENCE OF THE EFFICIENCY OF CELL GROWTH ON BIOSYNTHETIC MEDICAL MATERIALS ON THE MICROSTRUCTURE OF THEIR SURFACE

V. B. Gavriilyuk,¹ V. K. Ivanov,² A. V. Kulikov,¹ B. K. Gavriilyuk¹

¹ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, Moscow region,

² N. S. Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry RAS, Moscow;

¹ e-mail: gavriilyuk@mail.ru

The efficiency of a novel class of biosynthetic wound dressings in which natural and synthetic polymeric components are not arranged in layers but are in a unified structure, i. e., form a new composite material, has been studied. In particular, we tried to determine whether the interactions of dressing surface with cells of the injured tissue and/or culture grown *in vitro* depend on the microstructure of the surface. The efficiency of cell growth was considered in terms of the stimulation of cell growth. The microstructure of the surface was examined using the scanning electron microscopy at high resolution. The results of the study have shown that the structure of biosynthetic dressings depends on the variations in the composition and the ratio of the components. The role of the microstructure of the dressing in the effectiveness has been demonstrated. The factors which have the most significant effect on the regenerating properties of the wound dressings have been revealed.

Key words: cell cultivating, wound dressings, microstructure of the dressing, regeneration.
