

КЛЕТОЧНАЯ ТРАНСПЛАНТОЛОГИЯ И ТКАНЕВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

ТОМ V, № 1, 2010

В НОМЕРЕ:

- Беседа с профессором Паоло Маккиарини
- Подавление кальцификации трансплантатов клапанов сердца путем их девитализации
- Новые плазмидные конструкции, предназначенные для терапевтического ангиогенеза и несущие гены ангиогенных факторов роста – VEGF, HGF и ангиопоэтина-1
- Композиционные матрицы на основе хитина и хитозана для культивирования клеток кожи человека
- Опыт комплексного лечения цирроза печени с применением фетальных тканей

Композиционные матрицы на основе хитина и хитозана для культивирования клеток кожи человека

Е.Ф. Панарин¹, Л.А. Нудьга¹, В.А. Петрова¹, А.М. Бочек¹, И.В. Гофман¹,
Ю.Г. Баклагина¹, Н.Н. Сапрыкина¹, М.И. Блинова², Н.М. Юдинцева²,
О.Г. Спичкина², Л.В. Кухарева², И.А. Самусенко³, Г.П. Пинаев²

¹ Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

³ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург

Composite Chitin- and Chitosan-Based Matrices for Culturing Human Dermal Cells

E.F. Panarin¹, L.A. Nud'ga¹, V.A. Petrova¹, A.M. Bochek¹, I.V. Goffman¹, Yu.G. Baklagina¹, N.N. Saprykina¹,
M.I. Blinova², N.M. Yudinseva², O.G. Spichkina², L.V. Kukhareva², I.A. Samusenko³, G.P. Pinaev²

¹ the Institute of Macromolecular Compounds, RAS, Saint-Petersburg

² the Institute of Cytology, RAS, Saint-Petersburg

³ A.M. Nikiforov National Center of Urgent and Radiation Medicine, EMERCOM of Russia, Saint-Petersburg

С целью создания резорбируемых матриц, пригодных для культивирования фибробластов и кератиноцитов, разработаны составы и условия формирования композиционных пленочных материалов на основе хитина и смесей хитозана с коллагеном. Для обеспечения оптимальных условий совместного культивирования обоих типов клеток получены трехмерные пористые матрицы. Полученные и охарактеризованные композиционные материалы в виде пленок и губок на основе хитозана с добавкой коллагена испытаны в качестве матриц при культивировании клеток с целью получения трансплантатов для заживления ран. Проведенные испытания всех материалов *in vitro* и *in vivo* продемонстрировали отсутствие токсического эффекта на культивируемые клетки и на живую ткань организма. Матрицы устойчивы в условиях культивирования и полностью резорбируются в условиях *in vivo* через 10 сут. после трансплантации.

Ключевые слова: Полисахариды, хитин, хитозан, коллаген, пленки, губки, фибробласты, кератиноциты, культивирование.

Интенсивное развитие клеточных технологий, применяемых в новой области медицины — регенеративной медицине, требует разработки новых материалов, которые могут служить субстратами для культивируемых клеток. Обязательным условием для таких материалов является их резорбция при имплантации в организм соответствующих клеточных продуктов.

В предыдущей работе [1] нами было показано, что пленочные материалы, полученные из частично дезацетилированного хитина, и термообработанные хитозановые пленки обладают свойствами, обеспечивающими адгезию, распластывание и пролиферацию фибробластов до образования монослоя. Известно, что в лабораторных условиях кератиноциты выращивают на коллагеновых матриксах. Для трансплантации на рану выращенного *in vitro* на поверхности культурального сосуда многослойного пласта кератиноцитов (аналог эпидермиса кожи) требуется ряд очень сложных процедур, и в какой-то степени повреждающих сам пласт. Выходом из положения может быть способ выращивания такого пласта кератиноцитов на резорбируемой матрице в виде пленки, вместе с которой пласт легко и без повреждения

A set of composite films based on chitosan or chitosan-collagen mixtures are developed to be used as the resorbable matrices for fibroblasts and keratinocytes cultivation, and optimal conditions of their formation are precised. 3D porous matrices are obtained to insure the simultaneous cultivation of both types of cells. The composite materials prepared by this method in forms of films and sponges were characterized and then tested as the matrices for cell cultivation to obtain the transplantats for wound healing. Both *in vitro* and *in vivo* tests of all materials under study have evidenced the absence of any toxic actions on the cultivated cells and on the tissues of organism. The matrices are stable in the conditions of cultivation and resorb completely in *in vivo* conditions in 10 days after the transplantation.

Key words: polysaccharides, chitin, chitosan, collagen, sponge, membranes, fibroblasts, keratinocytes, culturing.

переносится на рану. Так как для функционирования кератиноцитов нужен коллагеновый субстрат, то для создания пригодных матриц необходимо либо получать двухслойные пленки «хитозан-коллаген», либо вводить коллаген в состав пленки. Кроме того, для совместного культивирования обоих типов клеток (фибробластов и кератиноцитов) представляется наиболее оптимальным создание трехмерной пористой матрицы для лучшего обеспечения условий культивирования. Модификация состава матрицы и ее формы может вызвать замедление ее резорбции в организме. Проверить это предположение можно лишь тестированием матриц *in vivo* на экспериментальных ранах лабораторных животных.

Решению поставленных задач посвящена данная работа.

Материал и методы

В работе использован хитин, полученный из панцирей крабов («Сонат», Москва), подвергнутый дополнительной очистке от солей кальция (обработка 0,5 н HCl), липидов (экстракция ацетоном) и протеинов (экстракция 1,5 н NaOH), отмытый водой до нейтральной реакции,

промытый ацетоном и высушенный под вакуумом при 40°C. После дополнительной очистки хитин имел следующие характеристики: зольность — 0%, белок отсутствует, элементный анализ: С 46.40, Н 5.86, N 6.19; $[\eta] = 8.4$ дл/г, $M = 137$ кДа, рассчитано по формуле $[\eta] = 2.4 \cdot 10^{-3} \cdot M^{0.69}$ [2].

Частично дезацетилированный хитин со степенью дезацетилирования 0,19 был получен по методике, описанной в работе [1].

Коллаген был получен в Отделе клеточных культур Института цитологии РАН методом кислотной экстракции сухожилий крысиных хвостов и очищен многократным переосаждением [3, 4].

Модифицированный (анионный) коллаген получен из шкуры годовалого быка щелочно-солевой обработкой в течение 3 сут. в 2,7 M NaOH в 1M Na₂SO₄, затем дважды переосажден из раствора в уксусной кислоте в NaCl. После такой обработки практически все остатки аспарагина и глутамина в коллагене дезамидированы, то есть, заменены на аспарагиновую и глутаминовую кислоты [4]. Формование хитиновых пленок проводили по сухо-мокрому способу, отмывали от хлорида лития и хранили в среде 50% этанола.

Пленки на основе хитозана формовали сухим способом и прогревали при 120°C, хранили в сухом состоянии на воздухе.

Композиционные пленочные матрицы готовили из 3% растворов хитозана в 2% уксусной кислоте и эквивалентных концентрированных растворов коллагена в том же растворителе. Растворы смешивали в соотношении хитозан: коллаген 97.5:2.5, 95:5 и 90:10. Пленки получали сухим формованием. Губчатые материалы получали методом лиофильной сушки из 0,5% растворов хитозана в 2% уксусной кислоте, диализованных против воды до нейтральной реакции.

Механические испытания проводили на универсальной установке для механических испытаний UTS 10 (UTStestsyste, Германия).

Рентгеноструктурный анализ осуществляли на дифрактометре ДРОН-2 с использованием излучения Cu_{Kα}, фильтрованного Ni.

Электронные микрофотографии были получены на приборе DSM-35 (Jeol, Япония).

Тестирование образцов пленок на пригодность в качестве матриц для культивирования клеток проводили по следующей методике. Шаблоны, приготовленные из образцов, дополнительно отмывали водой от полимерных добавок и стерилизовали автоклавированием при атмосферном давлении при 120°C в течение 40 мин. На каждый из образцов пленки высевали нормальные дермальные фибробласты кожи человека с концентрацией 2×10^4 кл./см². Контролем служили фибробласты из той же клеточной популяции, посеянные на стандартные пластиковые чашки Петри. При культивировании клеток использовали питательную среду ДМЕМ (ICN, США) с добавлением 10% фетальной сыворотки коров (HyClone, Новая Зеландия).

Для культивирования кератиноцитов в 24-луночной плате использовали смесь сред ДМЕМ и F12 (3:1) с добавлением 10% фетальной сыворотки коров и рядом специфических добавок. Клетки высевали в концентрации 5×10^5 кл./луночку и культивировали в течение 7 сут. За это время в культуральном сосуде формировался многослойный пласт. После чего проводили стриппинг — удаление стратифицированных верхних клеточных слоев пласта при замене выше указанной питательной среды на среду без ионов Ca и исследовали нижний (базаль-

ный) слой, за счет клеток которого идет обновление всей популяции кератиноцитов.

Контролями к опытным вариантам культивирования на резорбируемых матрицах служило культивирование фибробластов на поверхности пластикового сосуда и культивирование кератиноцитов на поверхности сосуда с нанесенным на него коллагеном.

Визуальную оценку состояния культур проводили с помощью светового микроскопа Биолам П-2 (ЛОМО, Россия) с фотонасадкой Canon Power Shot A95 (Canon, Япония), объектив $\times 20$.

Исследование резорбции и влияния трансплантатов на заживление ран проводили на крысах. На спине крысы формировалась модельная рана площадью 1 см², в которую вставляли силиконовое кольцо такого же размера. Силиконовое кольцо ограничивало приход в рану клеток из тканей животного. Следовательно, заживление могло происходить в основном за счет привнесенных клеток. В экспериментах были представлены 2 варианта контроля: а) «острая рана» — в рану вставлялось силиконовое кольцо, но не вносились никакие трансплантаты, заживление происходило естественным путем; б) «трансплантат без клеток» — в силиконовое кольцо вносили только матричный материал без культивируемых клеток. В опытном варианте в модельную рану вносили фибробласты, культивируемые в течение 5 сут. на исследуемых пленках и губках в качестве субстрата. В модельную рану из опытных материалов (пленки и губки) были трансплантированы образцы, показавшие лучшие результаты в процессе культивирования *in vitro*. Это была композиционная пленка «хитозан + 10% коллагена», и губка «хитозан + 10% коллагена немодифицированного + 2% уксусной кислоты». Состояние регенерирующей ткани оценивали при помощи гистологического анализа биоптата, взятого из раны. Биоптаты брали через 12 сут. после трансплантации материала в рану. Более поздние сроки были исключены, так как за это время у крыс происходит полное заживление раны.

Дальнейшие исследования *in vivo* проводили на крысах линии Wistar. В каждый вариант эксперимента было взято по 2 животных и выполнены следующие варианты:

1 — в экспериментальную рану внесена губка без клеток (контроль 1);

2 — в экспериментальную рану внесена пленка без клеток (контроль 2);

3 — в экспериментальную рану внесена губка с культивируемыми на ней фибробластами в течение 5 сут.;

4 — в экспериментальную рану внесена губка с культивируемыми на ней в течение 5 сут. кератиноцитами;

5 — в экспериментальную рану внесена пленка с культивируемыми на ней в течение 5 сут. фибробластами;

6 — в экспериментальную рану внесена пленка с культивируемыми на ней в течение 5 сут. кератиноцитами.

Через 12 сут. после трансплантации биоптат, взятый из раны, фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина в течение 24 ч, после чего материал проходил стандартную обработку в спиртах нарастающей концентрации (70–95%), ксилоле и парафине для изготовления гистологических и иммуногистохимических препаратов с толщиной серийных парафиновых срезов 3–7 мкм.

Для микроскопического исследования срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое исследование включало в себя определение экспрессии высокомолекулярного цитокератина HMW в кератиноцитах с использованием моноклональных мышиных антител клон 34 вE12 RTU (DakoCytomation,

Дания) реагирующих с цитокератинами 1, 5, 10 и 14. Постановка реакции проводилась непрямым трехступенчатым иммуноферментным LSAB методом визуализации. Выявление пероксидазной активности осуществляли с помощью 3,3-диаминобензидина, препараты докрасивали гематоксилином Майера. Оценку экспрессии цитокератина HMW и виментина с подсчетом иммунопозитивных клеток проводили тотально во всем срезе в областях с проявлением окрашивания от слабого до выраженного.

Морфологическое исследование гистологических препаратов и препаратов, окрашенных иммуногистохимическими методами, проводилось при помощи светоптического микроскопа Leica DM LS при увеличении микроскопа 200 и 400 дптр.

Математическую обработку полученных клинко-морфологических данных проводили методами вариационной статистики при помощи программы Microsoft Exel с определением показателей: среднего значения (M), ошибки среднего (m), достоверности различий между группами сравнения с вычислением критерия Стьюдента (t) и уровня значимости (β), доверительного интервала (p); различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Микрофотографирование проводили при помощи цифровой фотокамеры Leica DC320.

Влияние внесенных в рану культивируемых на губках и пленках кератиноцитов и фибробластов на проявления экссудативно-продуктивных реакций в ране и эффективность их размножения оценивали по:

— толщине струпа и отеку подлежащей грануляционной ткани;

— составу и степени выраженности воспалительной инфильтрации раны лимфоцитами, гистиоцитами, лейкоцитами, гигантскими многоядерными клетками типа инородных тел (выраженная — 3 балла, умеренно выраженная — 2 балла, слабо выраженная — 1 балл);

— количеству кератиноцитов в срезе, характеру их расположения в ране.

Резорбцию указанных матриц дополнительно проверяли в условиях *in vitro* в процессе выдерживания их в питательной среде в условиях CO_2 -инкубатора при температуре $37^\circ C$ в течение 35 сут.

Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано, что небольшие количества модифицирующего полимера существенно изменяют деформационно-прочностные свойства пленок из хитина и хитозана [5]. В качестве модифицирующих полимеров были использованы поливиниловый спирт (ПВС), целлюлоза и ее эфиры. При культивировании фибробластов на таких композиционных пленках выяс-

нилось, что введение ПВС и целлюлозы в хитин приводит к существенному ухудшению условий роста клеток на композиционных пленках — фибробласты частично адгезировались, но не распластывались и погибали.

Для улучшения адгезии и пролиферации дермальных фибробластов на хитозановой матрице в формовочные растворы хитозана вводили раствор коллагена в количестве 2,5, 5 и 10% от массы хитозана. Были изучены деформационно-прочностные свойства пленок, их пористость, надмолекулярная организация методом рентгеноструктурного анализа и морфология методом сканирующей электронной микроскопии.

Результаты механических испытаний (табл. 1) свидетельствуют о возрастании жесткости пленки хитозана при введении в нее уже небольших количеств коллагена. Повышение концентрации последнего приводит к росту модуля упругости, предела пластичности и прочности материала. Это хорошо согласуется с данными электронной микроскопии композиционных пленок. На микрофотографиях пленок наблюдаются микрофибриллы коллагена в объеме хитозана, которые обеспечивают армирование хитозановой матрицы. Характер процесса деформирования пленок при введении коллагена в хитозан изменяется. Деформационные кривые исходной хитозановой пленки содержат участок пластического деформирования. На деформационных кривых композиционной пленки, содержащей 10% коллагена, этот участок практически отсутствует. Уже при деформациях $\sim 10\%$ наблюдается процесс деформационного упрочнения материала (рис. 1).

На двухслойной пленке хитозан-коллаген зарегистрированы пониженные значения модуля упругости по сравнению с пленкой чистого хитозана. Этот результат также хорошо соответствует данным электронной микроскопии, из которых следует, что основная масса слоя коллагена, расположенного на хитозановой подложке, за исключением тонкого ($\sim 0,4$ мкм) поверхностного слоя, представляет собой глобулярные образования, мало способные к самостоятельному восприятию механических нагрузок. Таким образом, при механическом нагружении такой двухслойной пленки вся нагрузка воспринимается слоем хитозана. Как показала электронная микроскопия, толщина слоя коллагена в этой структуре составляет в среднем 3–3,5 мкм при общей толщине пленки 21–23 мкм. Из-за низкой сплошности коллагенового слоя именно в нем при приложении к пленке механической нагрузки начинаются процессы образования трещин, приводящие к разрушению всей пленки. На практике это приводит понижению значений деформации до разрушения при механических испытаниях двухслойной пленки (см. табл. 1).

Таблица 1. Характеристика композиционных пленок на основе хитозана и коллагена

Содержание коллагена, %	Свойства пленок				
	E, ГПа	σ_n , МПа	σ_p , МПа	ε_p , %	Удельная поверхность, м ² /г
0	5,20±0,21	107±4	96±4	13±3	1,261
2,5	6,67±0,25	142±2	131±1	11±1	—
5	7,01±0,23	150±2	140±1	14±1	—
10	7,16±0,29	152±3	148±3	14±2	1,412
Двухслойная пленка ХАН/коллаген	4,72±0,16	108±5	120±4	8±1	2,688

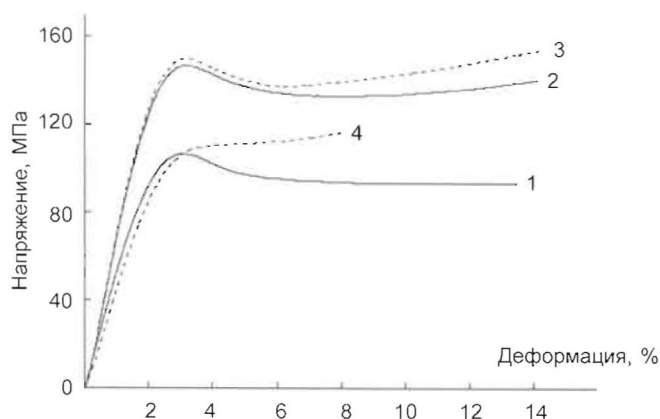


Рис. 1. Диаграмма растяжения композиционных пленок хитозана с коллагеном: 1 – 2,5%, 2 – 5,0%, 3 – 10% коллагена, 4 – двухслойная пленка хитозан-коллаген

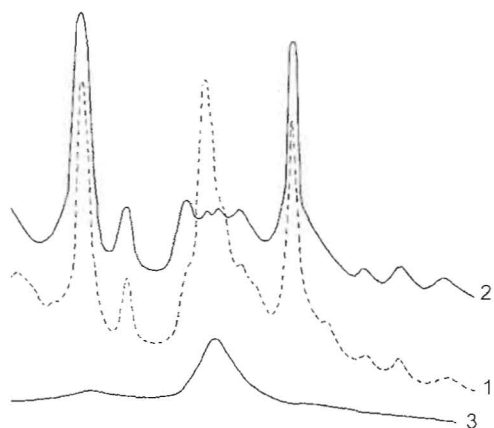


Рис. 2. Рентгенодифрактограммы пленок, полученных из хитина [1], смеси хитина с 5% ПВС [2] и ПВС [3]

Удельная поверхность возрастает при переходе от чисто хитозановой пленки к композиционной (10% коллагена) и двухслойной пленке (1,261; 1,412 и 2,688 м²/г соотв.), что свидетельствует об увеличении пористости. Морфология матриц изменяется от однородной микрокристаллической (пленка из хитозана) к микро неоднородной, с включениями коллагеновых микрофибрилл (композиционные пленки). Двухслойная пленка имеет структурированную поверхность с вытянутыми агрегатами микрофибрилл коллагена. На сколе такой пленки просматриваются четыре слоя: верхний (коллагеновая корка 0,4 мкм); слой, образованный глобулами коллагена; промежуточный, состоящий из неориентированного хитозана и микрофибрилл коллагена, вытянутых вдоль плоскости пленки; нижний – неориентированный хитозан. При прогреве пленки слоистая структура сохраняется. Свойства приготовленных композиционных пленок приведены в табл. 1.

Надмолекулярная организация композиционных пленок хитин + 5% ПВС и пленок на основе хитозана с различным содержанием коллагена была изучена с помощью рентгеноструктурного анализа.

На рентгенодифрактограмме пленок хитин/ПВС (рис. 2) отсутствует рефлекс при $2\Theta = 20^\circ$, характерный для хитина и относящийся к межмолекулярной упаковке ($d=4,5\text{Э}$). Он проявляется при съёмке пленки на отражение. Это означает, что слои хитина лежат

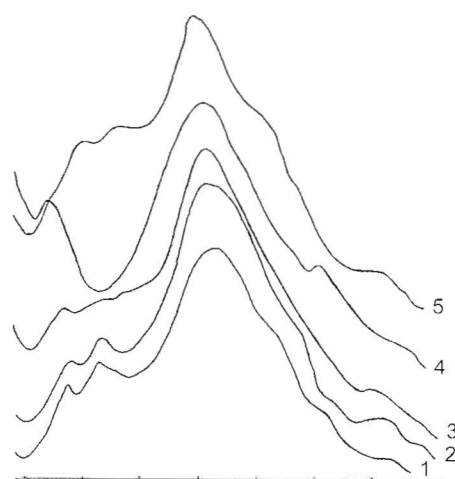


Рис. 3. Рентгенодифрактограммы пленок, полученных из композиций хитозана с коллагеном: 1 – ХАН + 2,5% коллагена; 2 – ХАН + 5% коллагена; 3 – ХАН + 10% коллагена; 4 – коллаген; 5 – хитозан (пленка)

в плоскости пленки. Молекулы ПВС располагаются в толще пленки и вызывают нарушение межмолекулярного порядка хитина.

Рентгенодифрактограммы пленок хитозан/коллаген (рис. 3) показывают мезоморфную надмолекулярную организацию. На всех пленках присутствует один широкий рефлекс в области углов $18\text{--}24^\circ 2\Theta$, характерный как для хитозана (кривая 5), так и для коллагена (кривая 4). Некоторые изменения наблюдаются в области $10\text{--}12^\circ 2\Theta$. Эти два рефлекса присутствуют на дифрактограмме хитозана, интенсивность их уменьшается с увеличением содержания коллагена в композиционных пленках.

При культивировании фибробластов на композиционных пленках установлено, что введение в хитин ПВС приводит к существенному ухудшению условий роста клеток – на композиционных пленках наблюдалась лишь частичная адгезия фибробластов и отсутствие образования монослоя. Введение коллагена в хитозан, напротив, приводит к улучшению адгезии и пролиферации клеток. При этом, чем большее количество коллагена введено в хитозановую матрицу, тем лучше происходит адгезия и пролиферация клеток.

Для обеспечения лучшего питания культивируемых клеток и возможности их прорастания по объему матрицы, то есть формирования трехмерных матриц, были получены губчатые матрицы из растворов хитозана, содержащих 10% коллагена, в 2% уксусной и в 2% глутаминовой кислотах. Характеристика матричных губчатых материалов приведена в табл. 2. На электронной микрофотографии (рис. 4А) видна структура губок, состоящая из сквозных пор и ячеек.

Испытания полученных пленок и губок в Институте цитологии РАН в качестве матриц для культивирования клеток показали, что на обеих формах композитов дермальные фибробласты хорошо закрепляются и образуют монослой за 5 сут. культивирования без разрушения матрицы. В контрольном опыте матрицы выдерживали в питательной среде без каких-либо разрушений 35 сут. В экспериментальных ранах не наблюдаются воспалительные процессы. В организме лабораторных животных все пленочные материалы полностью резорбируются за 10 сут., в то время как для полной резорбции губок необходимо более длительное время.

Таблица 2. Характеристика матричных материалов для культивирования клеток

Состав и вид матрицы	Характеристика матриц			
	Пористость, %	Кажущаяся плотность, кг/м ³	Удельная поверхность, м ² /г	Влагопоглощение, %
Хитозан + 10% коллагена губка из 2% уксусной кислоты	34,5	27,2	7,22	50,0
Хитозан + 10% коллагена губка из 2% глутаминовой кислоты	36,1	28,4	—	91,6

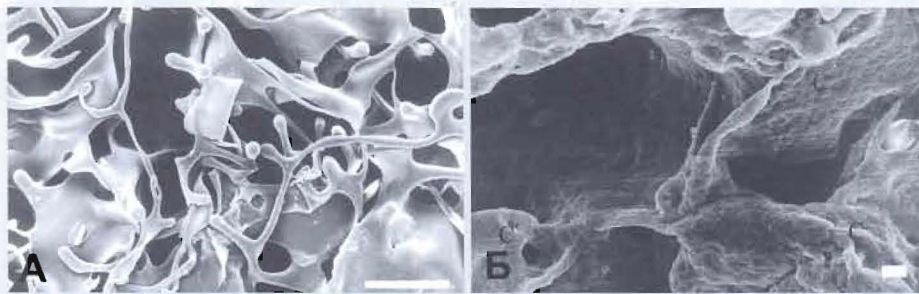


Рис. 4. Электронные микрофотографии губок, полученных из смеси растворов хитозана и 10% коллагена в 2% уксусной кислоте: А – контроль – структура губки без клеток; Б – губка с культивируемыми клетками. Маркер: А – 100 мкм; Б – 10 мкм

При посеве нормальных дермальных фибробластов кожи человека на образцы композиционных пленок хитозана с коллагеном (5 и 10%) через сутки наблюдалась адгезия на поверхности пленок и нормальная морфология клеток, сопоставимая с контролем. Через 6 сут. клетки сформировали монослой. На пленке с 2,5% коллагена закрепилось меньшее количество клеток, чем в предыдущих вариантах и контроле, но они сохранили нормальную морфологию и жизнеспособность.

При культивировании клеток на губках лучшие результаты показала губка, полученная из диализованного раствора хитозана с 10% коллагена в глутаминовой кислоте, на которой клетки формируют многослойный пласт не только на поверхности, но и в глубине губки (см. рис. 4).

При испытании двухслойных хитозан-коллагеновых пленок выяснилось, что, несмотря на достаточно хорошее состояние клеток, в процессе культивирования пленка скручивается по краям, что затрудняет равномерное распределение на ней клеток и формирование монослоя.

Полуколичественная оценка их распределения представлена на рис. 5.

При гистологическом, морфометрическом и иммуногистохимическом исследовании в различных вариантах экспериментов были получены следующие результаты.

В контрольных вариантах 1 и 2 (пленки и губки без клеток) происходило формирование в ране неспецифической грануляционной ткани. Толщина струпа с лейкоцитарно-некротическими массами и фибрином составляла $575 \pm 125,38$ мкм, грануляционная ткань со слабо выраженной (губка) или с умеренно выраженной (пленка) гигантоклеточной реакцией и прерывистым, очаговым умеренно выраженным размножением кератиноцитов (губка) или прерывистым, очаговым слабо выраженным размножением кератиноцитов (пленка) (рис. 5, 6, 7). В грануляционной ткани с внесением губки без клеток наблюдалось ее неполное рассасывание. При иммуногистохимическом исследовании с применением антител

к цитокератину HMW было обнаружено до 160 и 24 кератиноцитов в срезе с внесением губки и пленки, соответственно (рис. 7, 8).

Вариант 3 «губка с фибробластами». В этой группе крыс имело место формирование в ране неспецифической грануляционной ткани с выраженной гигантоклеточной реакцией и прерывистым, очаговым слабо выраженным размножением кератиноцитов. Толщина струпа с лейкоцитарно-некротическими массами и фибрином составляла $490 \pm 110,33$ мкм, что не имело статистически значимых различий ($p > 0,05$) по сравнению с контролем. В дерме имелось разрастание грануляционной ткани, которая была представлена фибробластами, тонкостенными капиллярами, имела слабо и умеренно выраженный отек, а также умеренно выраженную лимфо-гистиоцитарную инфильтрацию, слабо и умеренно выраженную лейкоцитарную инфильтрацию. Степень выраженности инфильтрации гигантскими многоядерными клетками, которые располагались вокруг эозинфильно окрашенных нитевидных структур губки, была умеренно выраженной и выраженной (рис. 6, 9)

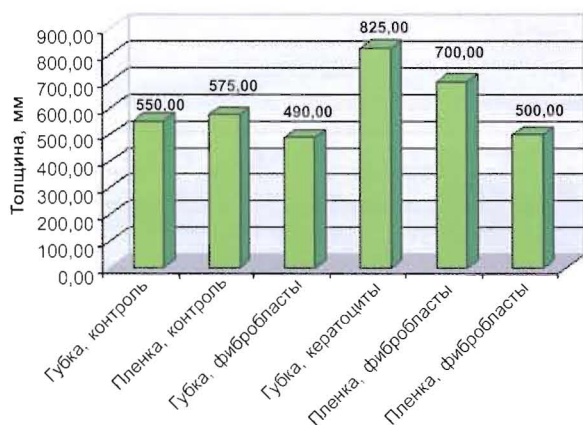
При иммуногистохимическом исследовании с применением антител к цитокератину HMW были обнаружены единичные кератиноциты, которые располагались очагово вблизи поверхностных отделов грануляционной ткани (см. рис. 8).

Вариант 4 «губка с кератиноцитами». В этой группе крыс имело место формирование в ране неспецифической грануляционной ткани с выраженной гигантоклеточной реакцией и прерывистым, выраженным размножением кератиноцитов. Толщина струпа с лейкоцитарно-некротическими массами и фибрином увеличивалась и составляла $825 \pm 75,23$ мкм, что имело достоверные различия ($p < 0,05$) по сравнению с группой контрольных крыс. В дерме наблюдалось разрастание грануляционной ткани, которая не имела отличий по строению от ткани крыс сравниваемых групп. Она имела слабо и умеренно выраженный отек, лимфо-гистиоцитарную инфильтрацию

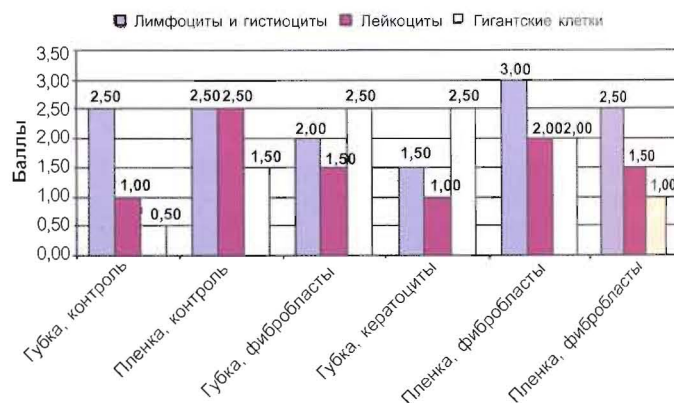
трацию, слабо выраженную лейкоцитарную инфильтрацию. Степень выраженности инфильтрацией гигантскими многоядерными клетками, которые располагались вокруг материала губки, была умеренно выраженной и выраженной (рис. 6, 9). При иммуногистохимическом

исследовании было обнаружено большое количество кератиноцитов — до 386 в срезе, которые располагались скоплениями вблизи поверхностных отделов и проникали вглубь грануляционной ткани, формировали своеобразные лакуны (см. рис. 9).

А Толщина струпа в ране у крыс различных групп, мкм



Б Полуколичественное распределение клеток воспалительного инфильтрата в ране



В Количественное распределение кератиноцитов в ране крыс различных групп

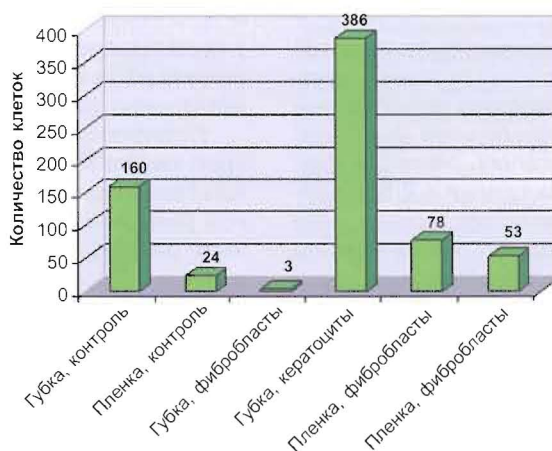


Рис. 5. Диаграммы распределения в ране:

А — толщину струпа; Б — клеток воспалительного инфильтрата; В — кератиноцитов

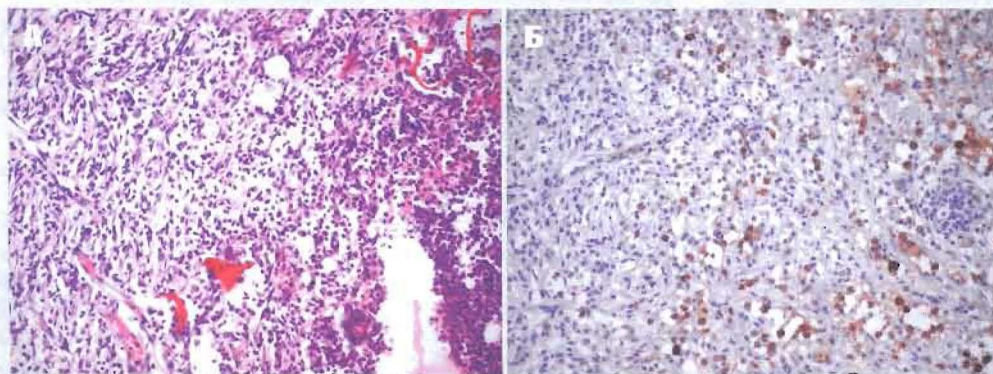


Рис. 6.

Ткань из раны у животных первой группы (губка без клеток):
А — грануляционная ткань;
Б — кератиноциты, компрессирующие высокомолекулярный цитокератин HMW в составе грануляционной ткани.
Окраска: А — гематоксилин и эозин;
Б — продукт реакции окрашен в коричневый цвет, докраска гематоксилином Майера.
Ув.: А — $\times 200$, Б — $\times 400$

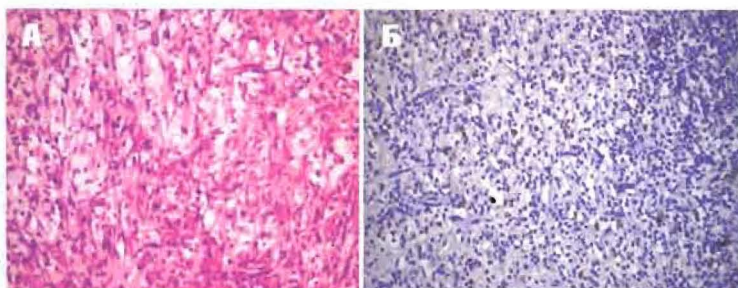


Рис. 7.
Ткань из раны у животных первой группы (пленка без клеток):
А – грануляционная ткань; Б – кератиноциты, экспрессирующие высокомолекулярный цитокератин HMW в составе грануляционной ткани.
Окраска: А – гематоксилин и эозин; Б – продукт реакции окрашен в коричневый цвет, докраска гематоксилином Майера. Ув.: А – $\times 200$; Б – $\times 400$

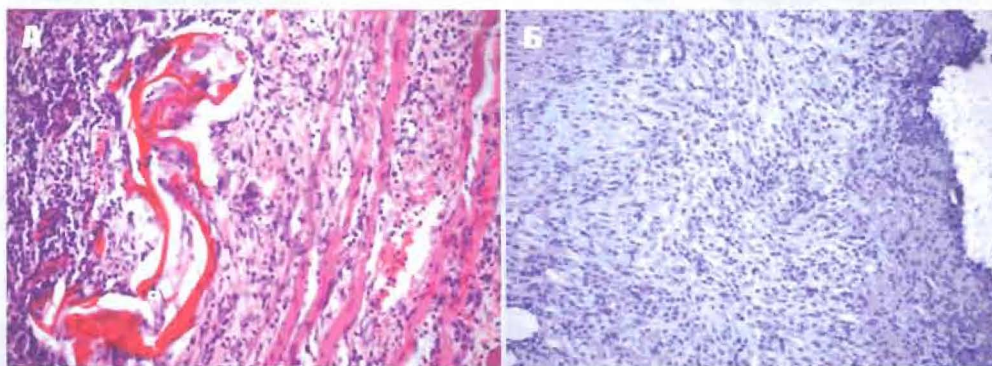


Рис. 8.
Ткань из раны у животных первой группы (губка с фибробластами):
А – грануляционная ткань; Б – кератиноциты, экспрессирующие высокомолекулярный цитокератин HMW в составе грануляционной ткани.
Окраска: А – гематоксилин и эозин; Б – продукт реакции окрашен в коричневый цвет, докраска гематоксилином Майера. Ув.: А – $\times 200$; Б – $\times 400$

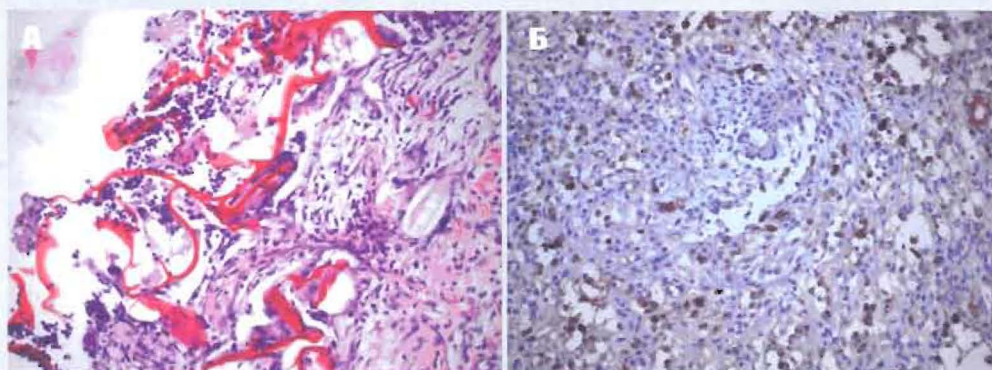


Рис. 9.
Ткань из раны у животных первой группы (губка с кератиноцитами):
А – грануляционная ткань; Б – кератиноциты, экспрессирующие высокомолекулярный цитокератин HMW в составе грануляционной ткани.
Окраска: А – гематоксилин и эозин; Б – продукт реакции окрашен в коричневый цвет, докраска гематоксилином Майера. Ув.: А – $\times 200$; Б – $\times 400$

Вариант 5, «пленка с фибробластами». Толщина струпа с лейкоцитарно-некротическими массами и фибрином составляла $700 \pm 50,15$ мкм, что не имело статистически значимых различий ($p > 0,05$) по сравнению с контролем. Грануляционная ткань была представлена фибробластами, тонкостенными капиллярами, имела слабо и умеренно выраженный отек. В ней имелась выраженная лимфо-гистиоцитарная, слабо либо выраженная лейкоцитарная инфильтрация, степень выраженности инфильтрацией гигантскими многоядерными клетками была от слабо выраженной до выраженной. Остатков пленки в грануляционной ткани обнаружено не было (рис. 6, 10).

При иммуногистохимическом исследовании было обнаружено небольшое количество кератиноцитов – до 78 в срезе, которые располагались скоплениями вблизи поверхностных отделов и проникали на незначительную глубину (см. рис. 10).

Таким образом, в этой группе крыс имело место формирования в ране неспецифической грануляционной ткани с умеренно выраженной гигантоклеточной реакцией и прерывистым, слабо выраженным размножением кератиноцитов.

Вариант 6 «пленка с кератиноцитами». Толщина струпа с лейкоцитарно-некротическими массами и фибрином

составляла $500 \pm 50,15$ мкм, что не имело значимых различий ($p > 0,05$) по сравнению с группой контрольных крыс. В дерме имелось разрастание грануляционной ткани, которая не имела отличий по строению от ткани крыс сравниваемых групп. В ней развивался слабо и умеренно выраженный отек, умеренно выраженная и выраженная лимфо-гистиоцитарная, слабо либо умеренно выраженная лейкоцитарная инфильтрация, степень выраженности инфильтрацией гигантскими многоядерными клетками была слабо выраженной. Остатков пленки в грануляционной ткани обнаружено не было (рис. 6, 11).

При иммуногистохимическом исследовании было обнаружено небольшое количество кератиноцитов – до 53 в срезе, которые располагались скоплениями вблизи поверхностных отделов и проникали на незначительную глубину (см. рис. 11). В этом варианте имело место формирование в ране неспецифической грануляционной ткани со слабо выраженной гигантоклеточной реакцией и прерывистым, слабо выраженным размножением кератиноцитов.

Таким образом, исследование эффективности заживления раны у крыс с внесением кератиноцитов и фибробластов, культивируемых как на пленках, так и на губках, имела место различная степень экссудативной реакции при воспалении, которая характеризовалась

толщиной струпа, степенью выраженности воспалительной инфильтрации и отека. Степень выраженности лимфо-гистиоцитарной и лейкоцитарной инфильтрации и отека у крыс во всех вариантах опыта не имела статистически достоверных различий, поэтому можно говорить о том, что ни пленки, ни губки не влияли на процессы формирования и созревания грануляционной ткани.

Степень продуктивной реакции при воспалении в процессе заживления раны после внесения в нее культивируемых на пленке и на губке кератиноцитов и фибробластов была различной. Эта реакция характеризовалась степенью выраженности инфильтрации гигантскими многоядерными клетками инородных тел в грануляционной ткани. Наиболее выраженная гигантоклеточная реакция была в вариантах с внесением кератиноцитов и фибробластов на губке. В этой связи можно констатировать, что материал губки является более длительно- и труднорезорбируемым для клеток макрофагально-гистиоцитарного ряда, к которым относятся гигантские многоядерные клетки.

Через 12 сут. после трансплантации на раны клеток, культивируемых на пленках, в грануляционной ткани была достигнута полная резорбция пленок, тогда как при внесении культивируемых клеток на губках, структуры губки еще обнаруживались в ранах. Вероятно, для резорбции губки требуются более длительные сроки.

Иммуногистохимическое исследование показало, что на 12-е сутки течения раневого процесса наибольшее количество кератиноцитов выявлялось в варианте с внесением кератиноцитов на губке. Очевидно, в этом случае могут быть достигнуты более выраженная миграция, пролиферация и размножение кератиноцитов, и, соответственно, более короткие сроки эпителизации раны. Кроме того, несмотря на то, что в таком варианте наблюдался незавершенный процесс резорбции и развитие гигантоклеточной реакции при трансплантации в рану культивируемых на губке клеток, это не имело неблагоприятного воздействия на формирование грануляционной ткани, а, наоборот, способствовало выраженному размножению кератиноцитов и усилению процессов репарации в ране.

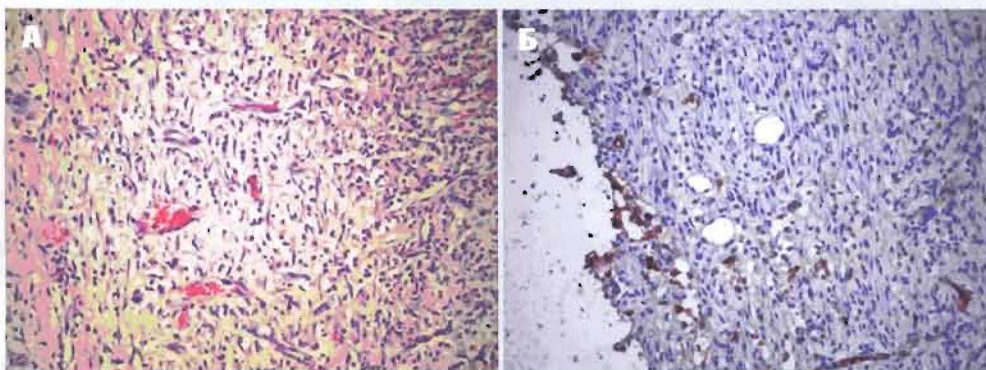


Рис. 10.

Ткань из раны у животных первой группы (пленка с фибробластами): А – грануляционная ткань; Б – кератиноциты, экспрессирующие высокомолекулярный цитокератин НМВ в составе грануляционной ткани.

Окраска: А – гематоксилин и эозин; Б – продукт реакции окрашен в коричневый цвет, докраска гематоксилином Майера. Ув.: А – $\times 200$; Б – $\times 400$

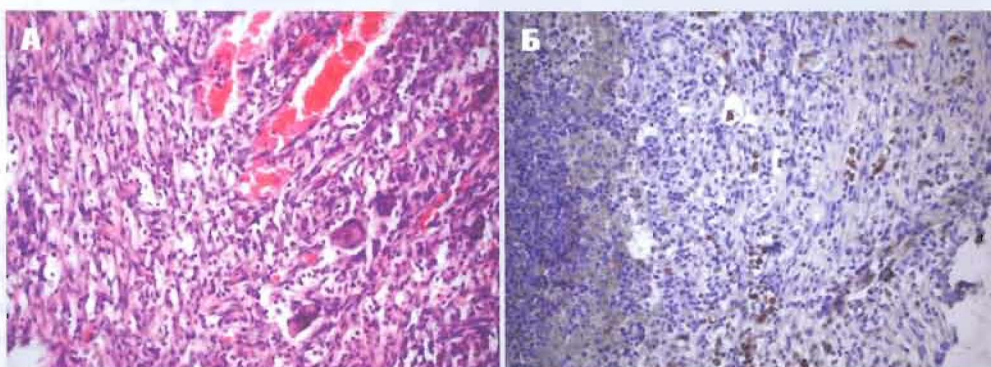


Рис. 11.

Ткань из раны у животных первой группы (пленка с кератиноцитами): А – грануляционная ткань; Б – кератиноциты, экспрессирующие высокомолекулярный цитокератин НМВ в составе грануляционной ткани.

Окраска: А – гематоксилин и эозин; Б – продукт реакции окрашен в коричневый цвет, докраска гематоксилином Майера. Ув.: А – $\times 200$; Б – $\times 400$

Заключение

Полученные и охарактеризованные композиционные материалы на основе хитозана с добавкой коллагена в виде пленок и губок испытаны в качестве матриц при культивировании клеток с целью получения трансплантатов для заживления ран. Проведенные испытания всех материалов *in vitro* и *in vivo* продемонстрировали отсутствие токсического эффекта на культивируемые клетки и на живую ткань организма. Культивирование фибробластов кожи человека *in vitro* на всех образцах в течение 35 сут. не выявило биodeградации ни одного из образцов. Тогда как в условиях *in vivo* при заживлении ран уже на ранних сроках, через 12 сут. после транс-

плантации клеток, культивируемых на пленочных материалах, обнаружена полная резорбция матриц. Значительных отличий по состоянию регенерирующей ткани в биоптатах и процессу заживления между разными вариантами материалов не обнаружено.

Использование для заживления ран разработанных матриц на основе хитозана и коллагена представляется перспективным. Использование матриц в виде губок может быть оптимальным для приготовления клеточных продуктов в трехмерных конструкциях.

Работа выполнена при поддержке Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине».

проект «Создание новых рассасывающихся матричных материалов на основе природных полисахаридов для культивирования клеток кожи человека и трансплантации при заживлении ран».

Авторы статьи выражают благодарность А.Р. Гребневу за выполнение хирургических операций на лабораторных животных.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Панарин Е.Ф., Нудьга Л.А., Петрова В.А. и соавт. Матрицы для культивирования клеток кожи человека на основе природных полисахаридов — хитина и хитозана. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2009; IV(3): 42–6.
2. Terbojevich M., Corrado C., Cosani A., Marsano E. Solution studies the chitin — lithium chloride — N,N-dimethylacetamide system. Carbohydr. Res. 1988; 180:73–86.

3. Chandrakasan G., Torchia D.A., Piez K.H.. Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the helical ends in solution. J. Biol. Chem. 1976; 251(19): 6062–7.

4. Хилькин А.М., Шехтер А.Б., Истратов Л.П., Леменев В.Л. Коллаген и его применение в медицине. М.: Медицина 1976: 228.

5. Михайлов Г.М., Лебедева М.Ф., Нудьга Л.А. и др. Структура и механические свойства волокон из хитина, модифицированных эфирами целлюлозы. Материалы Пятой конф. «Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана». Москва-Щелково 1999: 51.

Поступила 01.10.2009