

ОЦЕНКА СКОРОСТИ ДЕГРАДАЦИИ КАРКАСНЫХ ГУБОК НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА *IN SITU* ПО ДАННЫМ АКУСТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ

Храмцова Е.А.¹, Куликова О.Р.¹, Ушмаров Д.И.², Антипова К.Г.³, Луканина К.И.³,
Гуменюк С.Е.², Левин В.М.¹, Григорьев Т.Е.³

¹ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: alyonushk@gmail.com

² Кубанский государственный медицинский университет
ул. Митрофана Седина, 4, г. Краснодар, 350063, РФ

³ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»
пл. Академика Курчатова, 1, г. Москва, 123182, РФ

Поступила в редакцию: 15.07.2021

Аннотация. Гистологические исследования в регенеративной медицине – один из самых достоверных методов изучения вариативной реактивности и адаптивной изменчивости клеток и тканей при воздействии каких-либо факторов. Однако, обработка химическими фиксаторами, дегидратация, изготовление срезов и окрашивание образцов, являясь неотъемлемой частью гистологической пробоподготовки для последующей оптической микроскопии, приводят к невозможности получения максимально точной информации о витальном состоянии тканей исследуемого образца. В данной работе предложен метод акустической микроскопии как безопасный, неинвазивный и витальный способ исследования микроструктуры губчатого материала на основе хитозана после имплантации в организм крысы. Хитозан – природный биосовместимый полимер, обладает гемостатической активностью, а также антибактериальным и антисептическим действием, благодаря чему широко применяется в тканевой инженерии, терапии инфекционных заболеваний, медицине катастроф [1]. Эксплантаты исследовались методами акустической и оптической микроскопии с применением гистологических методик. Оценена скорость деградации каркасных губок на основе хитозана в условиях асептических и гнойных ран. В результате настоящего исследования показана эффективность акустической микроскопии в качестве неинвазивного, неразрушающего инструмента для визуализации результатов процесса биодеградации губчатых матриц на основе хитозана.

Ключевые слова: матрикс, хитозан, губки, акустическая микроскопия.

Регенеративная медицина – непрерывно развивающаяся область медицины, основным интерес которой заключается в изучении механизмов взаимодействия биосовместимых материалов с живым организмом. Особую ценность представляют материалы, обладающие определенной прочностью, микроструктурой, проницаемостью и способностью регулирования роста и адгезии клеток [2,3].

Наравне с активным развитием самой области регенеративной медицины, растет потребность в количественных методах визуализации и анализа упругих свойств матрикса неинвазивными и неразрушающими методами в результате естественной деградации внутри организма. Имеющиеся в настоящее время в распоряжении исследователей методы визуализации и оценки объемной микроструктуры – это электронная и оптическая микроскопия с различными видами гистологической подготовки объектов, требуют нарушения целостности матриц. Основной проблемой этих методик является их непосредственное воздействие на объект (обработка с помощью химических фиксаторов, изготовление срезов, окрашивание и т.д.), в результате чего невозможно получение адекватной информации о реальном состоянии исследуемого образца. С учетом этого для анализа микроструктуры матриц *in situ* был предложен метод акустической микроскопии [4-6].

Для адекватного запуска процесса регенерации, функциональное раневое покрытие должно изолировать место повреждения, обладать антибактериальными свойствами, с одной стороны обладать механической прочностью, но с другой – не травмировать окружающие ткани, по возможности сорбировать накапливающийся экссудат, нести на себе лекарственные препараты и т.д. [7, 8].

В рамках данной работы были исследованы губчатые материалы на основе хитозана. Матрицы на основе хитозана способствуют быстрой регенерации тканей, т.к. хитозан вызывает миграцию клеток иммунной системы (макрофагов) в район повреждения, а также обладает ангиогенной активностью (т.е. способен вызывать васкуляризацию тканей). Исходя из этого можно сделать вывод, что матрицы, содержащие большую концентрацию хитозана, эффективнее в плане обеззараживания и заживления ран [9].

С целью стандартизации условий имплантации, хитозановые импланты устанавливались в предварительно подготовленные соединительнотканые капсулы [10]. В дальнейшем эксплантаты исследовались с применением оптической и акустической микроскопии, гистологических методик.

Образцы изготавливали из 1 и 3 вес.% растворов хитозана (Primex ChiroClear HQG 800, Исландия, Mw = 600 кДа) в 2% уксусной кислоте/H₂O. В качестве сшивающего агента использовали 2,5 вес.% глутарового альдегида (ГА) (Sigma Aldrich, США). Бидистиллированную воду получали на установке Millipore Milli-Q Synthesis. Растворы полимера гомогенизировали на магнитной мешалке Heidolph MR Hei-Тес при комнатной температуре 48 часов. В готовые растворы хитозана добавляли ГА (из расчета 0,5% ГА от массы полимера) и

размешивали в течение 15 минут. Часть смеси замораживали изотропно. Для этого ее распределяли в ячейки 12-луночного планшета и помещали в морозильную камеру рефрижератора 24 часа. Другую часть смеси замораживали в условиях направленного роста кристаллов растворителя в емкостях с латунным дном и фторопластовыми стенками на медном стержне, охлаждаемом жидким азотом. Такая система обеспечивает температурный градиент в выделенном направлении. Замороженные образцы высушивали методом сублимационной сушки на установке Martin Christ Alpha 2-4LSC в течение 48 часов.

Исследование проведено на 8 белых лабораторных нелинейных крысах-самцах с массой тела 286–310 г., с разделением на группы по 4 крысы в каждой. Формирование соединительнотканной капсулы проводилось под общей анестезией, путем в/м введения 0,2 мл «Телазола», с последующей фиксацией крысы на столе в положении на животе и бритьем операционного поля размерами 4x4 см, а также его трехкратной обработкой йодопиреном 5% и однократной - раствором хлоргексидина биглюконата 3%. Скальпелем произвели линейный разрез по паравертебральной линии на расстоянии 1,5 см. от средней линии. Рассечена кожа, подкожная жировая клетчатка и поверхностная фасция, мышца разведена на глубину до 1,5 см. В рану введен имплант. Первой группе крыс для моделирования асептической раны ввели стерильные гидрофильные полимерные импланты шаровидной формы диаметром 1,5–1,6 см. и массой 1,73–1,75 гр. Второй группе крыс для моделирования гнойной раны ввели полимерные пористые импланты с бактериальной суспензией, содержащей 4 мл. *Ps. aeruginosa* 109 КОЕ/мл, шаровидной формы диаметром 1,5–1,6 см. и массой 1,73–1,75 гр. Раны ушиты 3-мя узловыми швами, с прошиванием фасции и 2-мя кожными швами. На 7-е сутки хирургическим путем под общей анестезией (в/м 0,1 мл. «Телазола») производилась замена имплантов на направленные и ненаправленные каркасные губки на основе хитозана.

На 6-е сутки после имплантации каркасных губок соединительнотканная капсула, содержащая матрикс, была извлечена хирургическим путем и исследована методами акустической и оптической микроскопии. Также проведено гистологическое исследование тканей капсулы и матрикса.

Хирургические вмешательства проводились с соблюдением требований гуманного обращения с животными и правил этики экспериментальных исследований на животных. Весь послеоперационный период крысы находились под наблюдением в стандартных общепринятых условиях содержания и свободным доступом к пище и воде.

Визуализация соединительнотканной капсулы с матриксом из каркасных губок на основе хитозана производилась на сканирующем импульсном акустическом микроскопе SIAM-2011. Данный микроскоп разработан сотрудниками лаборатории акустической микроскопии ИБХФ РАН. Для исследования эксплантата применялась длиннофокусная линза с рабочей частотой 50 МГц. Иммерсионной жидкостью была бидистиллированная вода комнатной температуры 25 ± 2 °С. Полученное изображение, обработанное при помощи программного обеспечения микроскопа, представляет собой градации серого и отражает вариации локальных упругих свойств матрикса и степень его сохранности.

Определение расположения биоискусственного матрикса в области его имплантации зачастую представляет самостоятельную сложную задачу. В данном случае, предварительно сформированная соединительнотканная капсула эффективно локализует область имплантации и обладает высоким акустическим контрастом относительно импланта и окружающих тканей за счет высоко содержания коллагеновых волокон (рис. 1).

Губчатый имплант перед установкой представлял собой цилиндр и площадь сечения была вычислена по формуле (1) для круга:

$$S_I = \pi r^2 \quad (1)$$

где r – радиус круга.

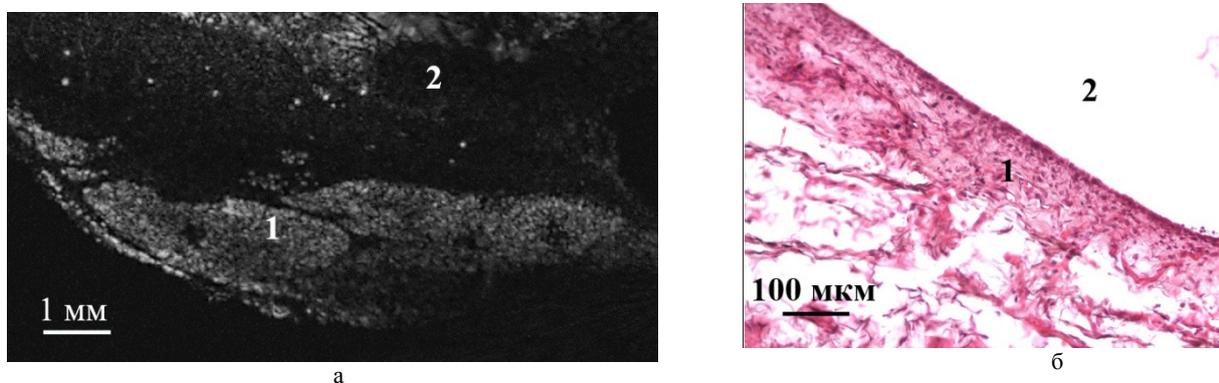


Рисунок 1. Сравнение ультразвукового (а) и гистологического (б) изображений соединительнотканной капсулы в месте имплантации матрикса. 1 – соединительнотканная капсула, 2 – внутренняя полость. Толщина акустического среза 47 мкм

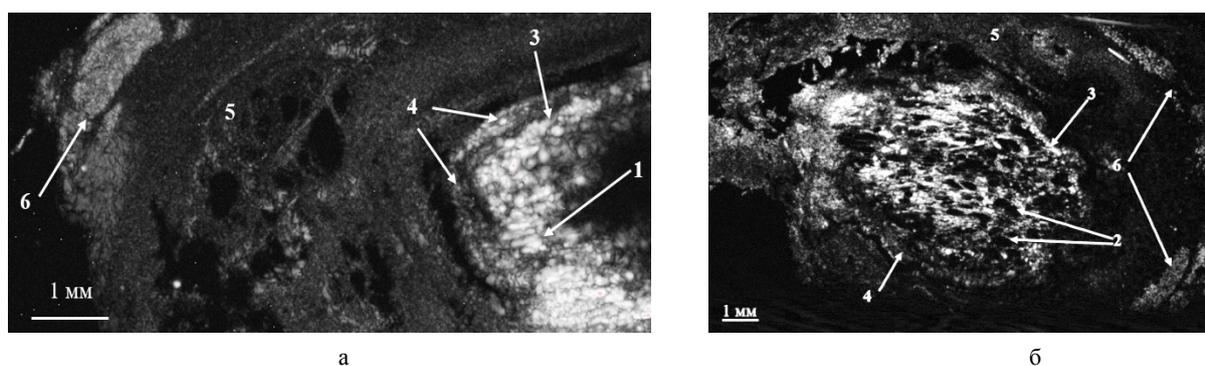


Рисунок 2. Сравнение ультразвуковых изображений направленного (а) и ненаправленного (б) губчатого матрикса на основе хитозана: 1 – направление пор, 2 – срез через пору; 3 – граница интактного матрикса, 4 – матрикс с клетками, 5 – внутренний объем соединительно тканной капсулы, 5 – соединительнотканная капсула. Толщина акустических срезов мкм и мкм соответственно

После имплантации геометрия матрикса претерпела изменения и его сечение было рассчитано по формуле (2) для эллипса:

$$S_2 = \pi r R \quad (2)$$

где r – меньший радиус эллипса, R – больший радиус эллипса.

С помощью ультразвуковых методик были получены изображения и проведены измерения площади матрикса. Ввиду существенных различий в упруго-механических свойствах между сохраненной частью матрикса и той, в которую мигрировали клетки, эта граница хорошо видна на акустических изображениях.

Отличие в методиках изготовления губчатых матриксов с одноосно ориентированными (направленными) и изотропно разориентированными (ненаправленными) порами приводит к формированию пор различного диаметра. У ненаправленных матриксов этот диаметр составляет около 100 мкм, у направленных – 30 мкм, что вызывает затруднения в миграции макрофагов в объем направленного матрикса (рис. 2).

В результате данного исследования установлено, что на сроке до 1 недели после имплантации наибольшее влияние на скорость набухания стенки матрикса и миграцию клеток в его объем влияет морфология исходно матрикса, и в меньшей степени тип раны и концентрация хитозана в исходном растворе. Отличие в данных по образцу №5 после имплантации по всей видимости связано со сдвигом плоскости поперечного сечения образца матрикса относительно оси сканирования.

Таблица 1. Изменение интактной площади сечения губчатых матриксов на основе хитозана до и после имплантации по данным акустической микроскопии

№ образца	концентрация исходного раствора хитозана, %	тип раны	тип матрикса	S_1 , см ²	S_2 , см ²	интактный матрикс, %
1	3	асептическая	направленный	1,88	0,18	9,6
2	3	асептическая	ненаправленный	1,83	0,098	5,3
3	1	асептическая	направленный	1,79	0,41	22,9
4	1	асептическая	ненаправленный	1,81	0,24	13,4
5	3	гнойная	направленный	1,81	0,28	15,5
6	3	гнойная	ненаправленный	1,77	0,4	22,6
7	1	гнойная	направленный	1,81	0,52	28,7
8	1	гнойная	ненаправленный	1,77	0,233	12,9

Показана эффективность акустической микроскопии в качестве неинвазивного, неразрушающего инструмента для визуализации результатов взаимодействия разных типов губчатых матриц на основе хитозана с тканями организма.

Список литературы / References:

1. El-banna F., Mahfouz M., Loporatti S., El-Kemary M., and Hanafy N. Chitosan as a Natural Copolymer with Unique Properties for the Development of Hydrogels: *Appl. Sci.*, 2019, vol. 9, no. 11, p. 2193. doi: 10.3390/app9112193
2. Meng Q., Sun Y., Cong H., Hu H. & Xu F. (2021) An overview of chitosan and its application in infectious diseases: *Drug Delivery and Translational Research*, vol. 11, pp. 1340-1351. doi: 10.1007/s13346-021-00913-w
3. Gumenyuk A., Ushmarov D., Gumenyuk S., Gayvoronskaya T., Sotnichenko A., Melkonyan K., Manuylov A., Antipova K., Lukanina K., Grigoriev T., Domenyuk D. Potential Use of Chitozan-Based Multilayer Wound Covering in Dental Practice: *Archiv Euromedica*, 2019, vol. 9, no. 3, pp. 76-80. doi: 10.35630/2199-885X/2019/9/3.24
4. Nwe N., Furuike T. and Tamura H. The Mechanical and Biological Properties of Chitosan Scaffolds for Tissue Regeneration Templates Are Significantly Enhanced by Chitosan from *Gongronella butleri*: *Materials*, 2009, vol. 2, pp. 374-398. doi: 10.3390/ma2020374
5. Kim K., Wagner W.R. Non-invasive and Non-destructive Characterization of Tissue Engineered Constructs Using Ultrasound Imaging Technologies: A Review. *Annals of biomedical engineering*, 2016, vol. 44, no. 3, pp. 621-635. doi: 10.1007/s10439-015-1495-0
6. Mansour J.M., Gu Di-Win M., Chung C., Heebner J., Althans J., Abdalian S., Schluchter M., Liu Y., Welter J. Towards the feasibility of using ultrasound to determine mechanical properties of tissues in a bioreactor: *Annals of Biomedical Engineering*, 2014, vol. 40, no. 10, pp. 2190-2202. doi: 10.1007/s10439-014-1079-4
7. Ruland A., Chen X., Khansari A., D Fay C., Gambhir S., Yue Z., Wallace G. A contactless approach for monitoring the mechanical properties of swollen hydrogels: *Soft Matter*, 2018, vol. 14, no. 35, pp. 7228-7236. doi: 10.1039/c8sm01227j
8. Nguyen C., Nguyen B., Hsieh M. Curcumin-Loaded Chitosan/Gelatin Composite Sponge for Wound Healing Application: *International Journal of Polymer Science*, 2013, vol. 2. doi: 10.1155/2013/106570
9. Jayakumar R., Prabakaran M., Sudheesh Kumar P.T., Nair S.V., Tamura, H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*, 2011, vol. 29, no. 3, pp. 322-337. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.01.005
10. Гуменюк С.Е., Гайворонская Т.В., Гуменюк А.С., Ушмаров Д.И., Исянова Д.Р. Моделирование раневого процесса в экспериментальной хирургии. *Кубанский научный медицинский вестник*, 2019, т. 26, № 2. [Gumenyuk S.E., Gaivoronskaya T.V., Gumenyuk A.S., Ushmarov D.I., Isyanova D.R. Modeling the wound process in experimental surgery. *Kuban Scientific Medical Bulletin*, 2019, vol. 26, no. 2. (In Russ.)] doi: 10.25207/1608-6228-2019-26-2-18-25

EVALUATION OF THE DEGRADATION RATE FOR CHITOSAN SPONGEOUS SCAFFOLDS *IN SITU* BY MEAN OF ACOUSTIC MICROSCOPY

Khramtsova E.A.¹, Kulikova O.R.¹, Ushmarov D.I.², Antipova K.G.³, Lukanina K.I.³, Gumenyuk S.E.², Levin V.M.¹, Grigoriev T.E.³

¹ Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences
Kosygina st., 4 Moscow, 119334, Russia; e-mail: alyonushk@gmail.com

² Kuban State Medical University

Sedina st., 4 Krasnodar, 350063, Russia

³ National Research Center "Kurchatov Institute"

Akademika Kurchatova pl., 1 Moscow, 123098, Russia

Abstract. Histological studies in regenerative medicine are one of the most reliable methods for studying the variable reactivity and adaptive variability of cells and tissues under the influence of outer factors. However, processing with chemical fixatives, dehydration, making sections and staining of samples, being an integral part of histological sample preparation for subsequent optical microscopy, lead to the impossibility of obtaining the most accurate information about the vital state of the tissues of the sample under study. In this work, the method of acoustic microscopy is proposed as a safe, non-invasive and vital method for studying the microstructure of a spongy scaffolds based on chitosan after implantation into a rat's body. Chitosan is a natural biocompatible polymer, has hemostatic activity, as well as antibacterial and antiseptic, due to which it is widely used in tissue engineering, therapy of infectious diseases, and disaster medicine [1]. The explants were examined by acoustic and optical microscopy using histological techniques. The rate of degradation of spongy scaffolds based on chitosan under conditions of aseptic and purulent wounds was estimated. As a result of this study, the effectiveness of acoustic microscopy as a non-invasive, non-destructive tool for visualizing the results of the biodegradation of scaffolds based on chitosan has been demonstrated.

Key words: spongy scaffold, chitosan, acoustic microscopy.