

Е.В. Зиновьев<sup>1</sup>, Р.Р. Рахматуллин<sup>2</sup>, К.Ф. Османов<sup>1</sup>,  
А.А. Жилин<sup>1</sup>, Ю.В. Нестеров<sup>1</sup>, Д.К. Якимов<sup>1</sup>

## Механотопография и биологические свойства гистоэквивалент-биопластического материала на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты

<sup>1</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург  
<sup>2</sup>Оренбургский государственный университет, Оренбург

**Резюме.** Купирование типовых патологических процессов и ранняя активация регенеративных механизмов являются условиями успешного заживления ран. Репаративный потенциал покровных тканей реализуется при сбалансированной миграции и пролиферации их клеточных элементов, синтеза фибриллярных белков и компонентов внеклеточного матрикса, эпителизации. Проведена углубленная оценка структуры разработанного гистоэквивалент-биопластического материала на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты (джи-дерм) и оценка его свойств, позитивных с точки зрения оптимизации репаративных механизмов. Проведена сканирующая зондовая микроскопия и оценка ультраструктуры биопластического материала. Для исследования визуализированных глобулярных структур отобраны однородные образцы материала длиной  $101,5 \pm 11,2$  нм, шириной  $110,3 \pm 10,7$  нм, высотой  $23,4 \pm 3,4$  нм. Пространство между глобулярными образованиями составило  $127,2 \pm 21,3$  нм. Установлено, что коэффициент шероховатости рельефа поверхности составил  $8,7 \pm 0,5$  нм. Методом фиксации контактного угла воды проведена оценка гидрофильных/гидрофобных свойств биоматериала. Значение угла составило  $83^\circ$ , коэффициента адгезии –  $99,88$  мН/м<sup>2</sup>, что характеризует поверхность биоматериала, как умеренно гидрофильную. Проведено культивирование мезенхимальных стромальных стволовых клеток на подложке из гистоэквивалент-биопластического материала на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты. При ультраструктурном исследовании установлена миграция клеток в материал, присутствие между переплетающимися фибриллярными волокнами пластов клеток продолговатой формы шириной  $3,7 \pm 0,5$  мкм, что отражает их кооперацию с поверхностью разработанного полимера, пригодного для использования в качестве ростковой подложки при биотехнологическом замещении дефектов тканей.

**Ключевые слова:** гиалуроновая кислота, биопластический материал, джи-дерм, клеточный носитель, ультраструктура биоматериала, мезенхимальные стромальные стволовые клетки.

**Введение.** Купирование типовых патологических процессов (нарушения микроциркуляции, интерстициальный отек, неконтролируемая воспалительная реакция, респираторный взрыв, ацидоз, гиперцитокинемия) и ранняя активация регенеративных механизмов являются условиями успешного заживления дефектов покровных тканей различной этиологии. Репаративный потенциал покровных тканей реализуется при сбалансированной миграции и пролиферации их клеточных элементов, синтеза фибриллярных белков и компонентов внеклеточного матрикса, эпителизации [4]. С целью пластики дефектов покровных тканей, а также обеспечения самостоятельного заживления ран и ожогов в настоящее время широко используются различные биопластические материалы на основе синтетических и природных (предпочтительно) полимеров [6, 12]. Определения оптимальных физико-химических, механических и биологических свойств природных биопластических материалов, применяемых для замещения дефектов покровных тканей представляется чрезвычайно важным и актуальным [2, 3], в особенности в плане способности этих полимеров обеспечивать оптимальные условия для клеточной

адгезии, миграции и пролиферации клеток кожи. Изучение структурных особенностей биополимерного материала является важным для биоматериалов, предназначенных для пластики дефектов покровных тканей [6]. В литературе имеются сведения об оценке рельефности и гидрофильности/гидрофобности ряда природных полимеров, например, коллагена, целлюлозы, хитозана, а также материалов, полученных из резорбируемых полигидроксиалканоатов (ПГА) [1]. Показано, что рельефность и шероховатость поверхности полимеров в наномасштабном диапазоне может определять адгезию, распластывание и двигательную активность клеток, а также влиять на синтез ими специфических белков внеклеточного матрикса [15]. Наличие поверхностных потенциалов, особенности структуры поверхности, а также ее состав являются необходимой характеристикой, способной влиять на жизнеспособность и пролиферацию клеток при взаимодействии с биопластическими материалами [8, 10, 14].

**Цель исследования.** Экспериментальное изучение ультраструктуры и биологических свойств

гистозэквивалент-биопластического материала на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты.

**Материалы и методы.** Объектом исследования явился гистозэквивалент-биопластический материал на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты (джи-дерм), полученный фотохимическим способом (патенты РФ № 2425694, 2367476, 2458709, 2481127). Образцы биоматериала исследованы методом сканирующей атомно-силовой микроскопии (АСМ) в контактном режиме (мультимикроскоп «SMM-2000», открытое акционерное общество «Протон-миэт», Россия). В процессе сканирования использованы кантилеверы «MSCT-AUNM» фирмы «Veeco Instruments Inc.» (Соединенные Штаты Америки) с жесткостью балки 0,05 Н/м, пирамидальной формой и радиусом кривизны зонда 10 нм. Количественный морфометрический анализ проводили с использованием штатного программного обеспечения микроскопа. Исследование механических свойств биопластического материала проводили с использованием АСМ в режиме силовой спектроскопии, при котором происходит снятие зависимостей прогиба кантилевера от расстояния между концом иглы и поверхностью образца. Для оценки гидрофильных свойств материала в качестве параметра, интегрально характеризующего его взаимодействие с полярным растворителем (водой), использовали работу адгезии ( $W_a$ ), определяемую по результатам оценки равновесных краевых углов смачивания [6, 12]. На поверхность биоматериала наносили по 5 мкл дистиллированной воды (при температуре 20–21°C), спустя 30 с осуществляли фотосъемку и определение значений краевых углов смачивания ( $\theta$ ) на границах раздела жидкой и твердой фаз [6, 12]. Расчет работы адгезии производили по формуле:

$$W_a = \sigma \cdot (1 + \cos\theta),$$

где  $\sigma$  – коэффициент поверхностного натяжения воды при 20°C, принимаемый за 72,86×0,001 мН/м;  $\theta$  – значения статического краевого угла смачивания.

С учетом пористости и развитого рельефа, характеризующегося высокими значениями шероховатости, расчет сил адгезии по краевому углу смачивания проводили с учетом коэффициента шероховатости (отношение истинной площади поверхности к геометрической) [7].

Результаты исследований обрабатывали методами вариационной статистики.

**Результаты и их обсуждение.** Установлено, что гистозэквивалент-биопластический материал на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты, визуализированный посредством сканирующей АСМ, имеет морфологически однородную поверхность, при этом ультраструктура поверхности представлена однотипными глобулярными образованиями (рис. 1).

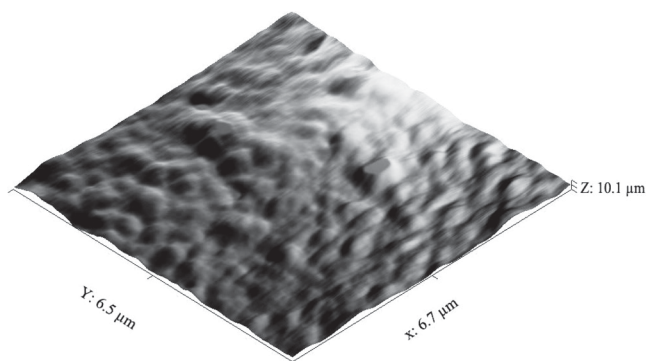


Рис. 1. Структура поверхности неструктурированного биоматериала на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты. Увел. ×16000 раз

Одной из важнейших особенностей изображений, получаемых при проведении сканирующей АСМ, является трехмерная геометрия объектов, что позволяет детально анализировать их морфологию по проведенным профилям и выполнять морфометрию (рис. 2).

При морфометрии установлено, что размерные параметры визуализированных глобулярных структур биопластического материала на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты составили: ширина 110,3±10,7 нм, высота 23,4±3,4 нм. Пространство между глобулярными образованиями достигало 127,2±21,3 нм. При анализе степень развитости рельефа с использованием параметра среднеквадратичной шероховатости ( $R_q$  – отклонение точек профиля от его средней линии) установлено, что поверхность биопластического материала на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты представляет

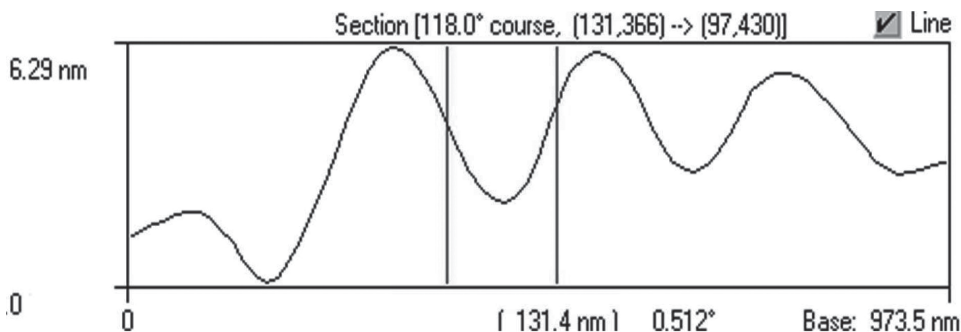


Рис. 2. Структура профиля глобулярной структуры поверхности материала на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты

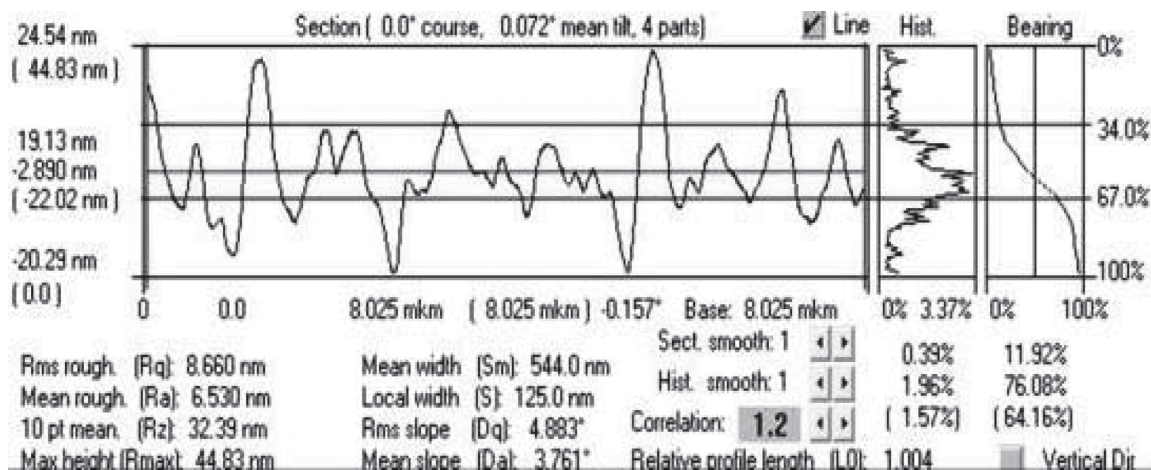


Рис. 3. Результаты оценки среднеквадратичной шероховатости поверхности материала на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты

собой однородную текстуру с значениями Rq – порядка  $8,7 \pm 0,5$  нм (рис. 3).

Возможность адгезии и миграции соматических клеток покровных тканей на поверхности биопластического материала на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты определяется, с одной стороны, ее гидрофильными/гидрофобными свойствами, с другой – микрорельефом. Известно, что закрепление фибробластов и кератиноцитов с большей вероятностью происходит на поверхности материала, обладающего высокой поверхностной энергией, на гидрофильной поверхности. В то же время на основные клеточные процессы (рост, дифференциация, миграция) в большей степени оказывает влияние геометрические и размерные особенности рельефа подложки [9, 13].

При оценке гидрофильных/гидрофобных свойств биоматериала установлена, что величина контактного угла воды составила  $83^\circ$ , а сила  $W_a$  составила  $99,88$  мН/м<sup>2</sup>, что характеризует поверхность гистозэквивалент-биопластического материала как умеренно смачиваемую [13].

Дополнительно проведенная визуализация поверхности биополимера в режиме регистрации сил  $W_a$  (рис. 4) позволила локализовать нанобласти с повышенной адгезией.

Разработанный биопластический материал на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты связывали с возможностью его использования в качестве подложки при культивировании соматических клеток и выявили, что морфологическая структура биоматериала представлена преимущественно глобулярными образованиями, формирующими разветвленную трехмерную структуру с поровыми комплексами диаметром от десятков до нескольких сотен нанометров. Подобная трехмерная организация определяет возможность свободной диффузии тканевой жидкости по всему объему материала. При этом важной особенностью материала является стабильность

его морфологических и механических параметров в реакции на увлажнение, что оказывается благоприятным условием для применения материала в условиях раневого процесса.

Оценивая по краевому углу смачивания термодинамическую работу воды на поверхности гистозэквивалент-биопластического материала на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты, установили, что зафиксированные значения сил сцепления характеризуют его как умеренно гидрофильный материал. Подобный результат может объясняться присутствием воздуха в полостях и порах биоматериала, который препятствует первоначальному проникновению воды. Таким образом, гидрофильные/гидрофобные свойства биополимера оказываются зависимыми не только от физико-химических свойств, но и от его структурных особенностей. Подтверждением этого стала прямая визуализация поверхности биоматериала в режиме адгезионно-контактной АСМ. Полученные резуль-

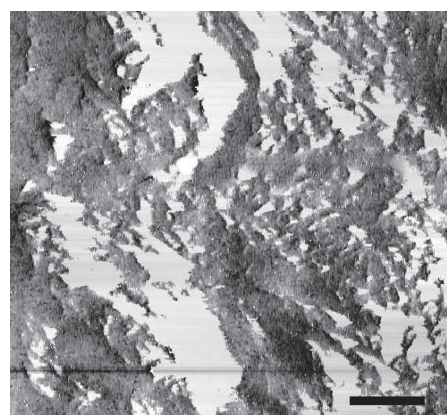


Рис. 4. Структура распределения сил  $W_a$  на поверхности материала на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты. Шкала – 500 нм



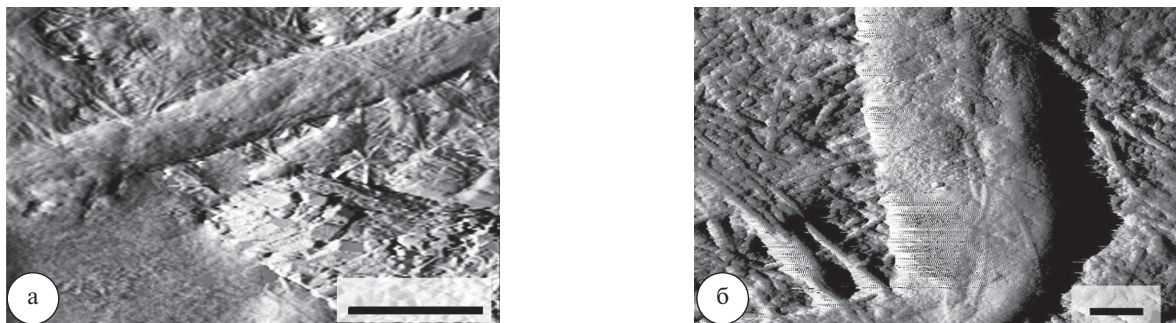


Рис. 5. Мезенхимальная стволовая клетка на поверхности биоматериала: а – шкала 5 мкм; б – шкала 2 мкм

таты свидетельствуют о наличии значительных по отношению к визуализированной площади участков на поверхности биоматериала, демонстрирующих адгезивные свойства.

При оценке культивирования мезенхимальных стромальных стволовых клеток на подложке из гистозэквивалент-биопластического материала на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты методом АСМ установлено, что на его поверхности выявляются клетки продолговатой формы шириной 3,7 мкм (рис. 5 а). При углубленном изучении было выявлено наличие на поверхности клеток переплетающихся фибриллярных волокон, предположительно, вторичной и третичной структуры коллагена (рис. 5 б).

Характер расположения мезенхимальных стволовых клеток на поверхности биоматериала свидетельствует о наличии у них процессов миграции, синтеза фибриллярных белков, активного взаимодействия с поверхностью подложки, а также проникновения в глубокие слои гидроколлоида гиалуроновой кислоты.

### Выводы

Гистозэквивалент-биопластический материал на основе полимера гиалуроновой кислоты (джи-дерм) сохраняет стабильность морфологических и механических параметров в реакции на увлажнение, что оказывается благоприятным для создания оптимальных условий влажной среды при адгезии и миграции мезенхимальных стволовых клеток.

Материал на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты является умеренно гидрофильным материалом, а гидрофильные/гидрофобные свойства биополимера оказываются зависимыми от физико-химических свойств и от структурных особенностей.

В структуре биоматериала после культивирования мезенхимальных стромальных клеток выявляется их присутствие, миграция и белок-синтетическая активность как на поверхности, так и в структуре полимера.

### Литература

1. Николаева, Е.Д. Сравнительное исследование клеточных носителей, полученных из резорбируемых полигидроксисилканоатов различного химического состава / Е.Д. Николаева [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. VI, № 4. – С. 5–15.
2. Перова, Н.В. Биodeградируемый коллагенсодержащий матрикс Сферогель™ для клеточной трансплантации / Н.В. Перова [и др.] // Перспективные материалы. – 2004. – № 2. – С. 52–59.
3. Севастьянов, В.И. Методы исследования биоматериалов и медицинских изделий / В.И. Севастьянов, С.Л. Васин, Н.В. Перова. – М.: ИЦ ВНИИ геосистем, 1999. – 425с.
4. Рахматуллин, Р.Р. Биопластический материал на основе гиалуроновой кислоты: биофизические аспекты фармакологических свойств / Р.Р. Рахматуллин // Фармация. – 2011. – № 4. – С. 37–39.
5. Хабаров, В.Н. Гиалуроновая кислота: получение, свойства, применение в биологии и медицине / В.Н. Хабаров, П.Я. Бойко, М.А. Селянин. – М: Практическая медицина, 2012. – 224 с.
6. Шумаков, В.И. Биополимерные матрицы для искусственных органов и тканей / В.И. Шумаков, В.И. Севастьянов // Здоровоохранение и медицинская техника. – 2003. – № 4. – С. 30–32.
7. Tan, J. Biomaterials with hierarchically defined micro- and nanoscale structure / J. Tan, W. Saltzman // J. biomaterials. – 2003. – М. – P. 3593–3601.
8. Greenspan, L. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions / L. Greenspan // Journal of research of the national bureau of standards. – 1979. – Vol. 81A. – P. 89–96.
9. Hallab, N. Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion / N. Hallab [et al.] // Tissue engineering. – 2001. – Vol. 7. – № 1. – P. 55–71.
10. Hertz, H. Uber die Berührung Fester Elastischer Korper (On the contact of elastic solids) / H. Hertz // J. reine angew. – 1981. – № 92. – P. 156–171.
11. Kennedy, S.B. Combinatorial screen of effect of surface energy on fibronectin mediated osteoblast adhesion, spreading and proliferation / S.B. Kennedy [et al.] // Biomaterials. – 2006. – № 27. – P. 3817–3824.
12. Lipski, A. Nanoscale engineering for biomaterial surfaces / A. Lipski [et al.] // Advanced materials. – 2007. – Vol. 19. – № 4. – P. 553–557.
13. Wilkinson, C.D. The use of materials patterned on a nano- and micrometric scale in cellular engineering / C.D. Wilkinson [et al.] // Mater. sci. Eng. C. – 2002. – Vol. 19. – P. 263–9.
14. Tamada, Y. Effect of preadsorbed proteins on cell adhesion to polymer surfaces / Y. Tamada, Y. Ikada // Journal of colloid and interface science. – 1993. – Vol. 155. – P. 334–339.

15. Van der Valk, P. Interactions of fibroblast and polymer surfaces, relation between surface free energy and fibroblast spreading

/ P. Van der Valk [et al.] // Biomed. mater. res. – 1983. – № 17. – P. 807–817.

---

E.V. Zinovyev, R.R. Rahmatullin, K.F. Osmanov, A.A. Zhilin, Yu.V. Nesterov, D.K. Yakimov

### **Mehanotopography and biological properties of histocovalent-bioplasic material based on hydrocolloids hyaluronic acid**

**Abstract.** Relief of typical pathological processes and the early activation of regenerative mechanisms are conditions of successful wound healing. Covering tissue repair potential is realized with a balanced migration and proliferation of cellular elements, the synthesis of fibrillar proteins and extracellular matrix components, epithelialization. In the study we deeply assess evaluation framework of developed bioplasic material histocovalent – based hydrocolloid hyaluronic acid («G-derm»®) and assessment of its properties, positive from the point of view of optimizing the repair mechanisms. We took scanning probe microscopy and ultrastructural evaluation of bioplasic material. For the study of globular structures we visualized selected homogeneous samples of the material length  $101,5 \pm 11,2$  nm, a width of  $110,3 \pm 10,7$  nm and a height of  $23,4 \pm 3,4$  nm. The space between the globular formations totaled  $127,2 \pm 21,3$  nm. It was found that the roughness of the surface relief was  $8,7 \pm 0,5$  nm. The method of fixing the contact angle of water evaluated hydrophilic/hydrophobic properties of the biomaterial. The value of the angle was 83, the coefficient of adhesion – 99,88  $Mn/m^2$  that characterizes the surface of a biomaterial as moderately hydrophilic. We held cultivation of mesenchymal stromal stem cells on a substrate of histocovalent – based bioplasic material of hydrocolloid hyaluronic acid. When ultrastructural study cell migration was installed into the material, the presence of fibrillar fibers between layers of interwoven cells elongated width  $3,7 \pm 0,5$  nm, reflecting their cooperation with the surface developed polymer suitable for use as a substrate for biotechnology sprout substitution defects tissues.

**Key words:** hyaluronic acid, a bioplasic material, «G-derm»®, cellular carrier, ultrastructure biomaterial, mesenchymal stromal stem cells..

Контактный телефон: (812) 983-6392; e-mail: evz@list.ru