

РАЗРАБОТКА ИННОВАЦИОННОГО НАНОСТРУКТУРИРОВАННОГО БИОМАТЕРИАЛА ДЛЯ ОФТАЛЬМОМИКРОХИРУРГИИ

Использование нанотехнологий с целью создания биопластических материалов позволяют создавать принципиально новые высокоэффективные матрицы, отвечающие требованиям офтальмомикрохирургии. Высокая эффективность созданного биопластического материала подтверждается тестированием клеток в условиях «in vitro».

Ключевые слова: гиалуроновая кислота, офтальмомикрохирургия, биопластический материал.

Актуальность

Ключевым требованием для разработки нового наноструктурированного биоматериала для офтальмомикрохирургии является способность биоматериалов обеспечивать комфортные условия для миграции клеток лимба в область дефекта роговицы и оптимальное состояние оптических сред глаза. Кроме того, матрица должна быть доступна для эндогенных энзимных систем, обеспечивающих ее биометаболизацию и прозрачное восстановление роговицы. Таким образом, идеальным материалом для офтальмомикрохирургии будет являться тот материал, на поверхности которого клетки лимба способны к миграции и пролиферации, и который в процессе регенерации рассасывается.

Поскольку основным внеклеточным веществом тканей глаза является гиалуроновая кислота, обеспечивающая оптимальные оптические свойства сред глаза, то становится логичным использовать именно этот субстрат для разработки новых специфических биоматериалов для офтальмомикрохирургии. Перспективным технологическим решением разработки биоматериалов на основе гиалуроновой кислоты является применение нанотехнологических стратегий, поскольку все остальные методы физико-химического кросслинкинга (сшивки макромолекул) приводят к потере ключевых оптических свойств.

Как известно, фотохимическое формирование межмолекулярных сшивок в гидрогеле гиалуроновой кислоты не применялось и даже не рассматривалось как возможное, главным образом, из-за низкой фотохимической активности большинства полисахаридов, которые, в отличие от гиалуроновой кислоты, не имеют фотохимически активных боковых групп. Из-

вестны методы радиационно-химической модификации целлюлозы под действием γ -излучения [4, 5].

Материалы и методы

Гиалуроновая кислота (ГК) была выбрана в качестве основного компонента биопластического материала «Гиаматрикса». Она представляет собой линейный несulfатированный гликозаминогликан, неразветвленный полисахарид, содержащий от 2000 до 25000 дисахаридных единиц D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина, соединенных между собой в-1,3 и в-1,4-гликозидными связями [1, 2, 3]. Являясь полианионом, ГК гигроскопична, эффективно связывает молекулы воды и образует вязкий гидрогель. В гидрогель ГК добавлялось рецептурное количество пептидной фракции (обозначенной как матричные пептиды). Полученный вязкий раствор подвергали воздействию ультрафиолетового облучения (λ_{\max} = 230 нм), в результате чего происходила фотохимическая сшивка макромолекул.

Мультимикроскоп СММ-2000, выпускаемый ЗАО «КПД» (г. Зеленоград). Мультимикроскоп работал в атомно-силовом режиме контактным способом в воздушной среде. Использовались треугольные кантилеверы с жесткостью 0,01 н/м с пирамидальной иглой с радиусом кривизны $r \sim 15 - 25$ нм. Конечный радиус закругления ограничивает возможности определения «истинных» размеров нанообъектов. Наблюдаемые размеры оказываются увеличенными на величину порядка $2r \sim 30 - 50$ нм.

Изображения микроструктуры биоматериала визуализировались с помощью программы ScanMaster (версия 6.7.02), разработанной специально для мультимикроскопа СММ-2000

(ЗАО «КПД»), установленной на персональном компьютере Pentium IV (3,22 ГГц, 1 ГБ ОЗУ).

Исследование «in vitro» проводили в культуре мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, полученных из костного мозга взрослого человека (донора) после подписания информированного согласия на получение биологического материала. Выделение клеток осуществлялось на градиенте плотности, Фиколл 1.033. Иммунофенотип клеток был представлен стромальными маркерами: CD73, 44, 90, 105 (позитивны), гемопоэтические маркеры: CD14, 34, 45, HLA-DR, 106 (негативны). Исследование таксиса проводилось методом сравнения траекторий движения клеток между сериями «контроль» и «биоматериал». Видео записывали на аппаратном комплексе AxioObserverA1 с системой инкубации, длительностью 4 часа для каждой серии, при увеличении 50х.

Результаты и обсуждение

Суть метода фотохимического наноструктурирования заключается в формировании трехмерного упругого каркаса биоматериала редкими химическими сшивками между макромолекулами. Эти сшивки образуются в результате фотохимического разрыва внутримолекулярных химических связей под действием УФ-облучения и образования межмолекулярных связей. Система ковалентных связей дополняется переплетениями макромолекул и лабильными водородными связями между ними. Характерные размеры структуры каркаса определяются подготовкой полупродуктов и режимом фотохимического наноструктурирования. Полупродуктом является вязко-тягучий гидрогель гиалуроновой кислоты с пептидными добавками. Поскольку одна молекула ГК способна связывать 200-500 молекул воды, то насыщение полупродукта водой разрушает систему внутримолекулярных водородных связей ГК, а также систему подобных связей между макромолекулами ГК, и заменяет их водородными связями с молекулами воды. Во-первых, это придает макромолекулам ГК развернутые и растянутые конформации и, во-вторых, разводит эти макромолекулы на достаточно большие расстояния друг от друга. Перевод ГК в состояние гидрогеля изменяет оптические характеристики. Отсутствие круп-

ных ассоциатов макромолекул устраняет светорассеяние и делает гидрогель прозрачным в широком диапазоне длин волн. Таким образом, производится первичная подготовка полупродукта к фотохимическому наноструктурированию.

На втором этапе гидрогель поливом или выдавливанием наносится на сферические гидрофобные поверхности тонким слоем (порядка 1 мм) для последующего УФ-облучения. При этом основная масса макромолекул ориентируется вдоль плоскости поверхности подложки, образуя квазидвухмерную сетку макромолекул. Эмпирически доказано, что изменяя исходную концентрацию ГК и других компонентов в растворе, можно управлять характерными размерами нанокаркаса биопластического материала, образующегося при последующем фотохимическом структурировании.

Облучение широкополосным УФ-светом пленок гидрогеля сопровождается одновременным удалением излишков воды. Именно на этой стадии происходит формирование фотохимических сшивок, для образования которых необходима определенная подвижность макромолекул, обеспечивающая пространственное сближение реакционноспособных групп. Система ковалентных и лабильных связей и переплетений формирует наноструктурированный каркас биопластического материала.

Микроструктуру биопластического материала исследовали с помощью сканирующего мультимикроскопа СММ-2000. Мультимикроскоп СММ-2000 и программа ScanMaster позволяет получать изображения профиля нанообъектов и определять их линейные размеры. Для печатного варианта все изображения переведены в формат jpg с сохранением сопроводительной информации. По своей природе атомно-силовой мультимикроскоп способен «чувствовать» только очень тонкий поверхностный слой изучаемых объектов. Поэтому для получения АСМ-изображений использовались образцы наноструктурированного биопластического материала, полученные по стандартной технологии на атомарно-ровной поверхности сколов слюды. Перед облучением ультрафиолетовым светом поверхность образцов была выровнена с помощью другого атомарно-ровного фрагмента слюды. Все иссле-

Таблица 1. Результаты проведенного культивирования мезенхимальных стромональных клеток

Группа	Клеток на анализ	Медиана дистанция (мкм)	Минимум (мкм)	Максимум (мкм)	Ст. отклонение (мкм)
«Контроль»	41	280,50	23,0	584,0	15,01
«Биоматериал»	35	389,50	43,0	822,0	15,78

дованные образцы имели макроскопические размеры, толщина которых лежала в пределах 0,05 – 0,1 мм, то есть существенно превышала размеры макромолекул.

На всех исследованных образцах вместе с четко наноструктурированными областями наблюдались участки с плотно переплетенными полимерными нитями. Темные области на АСМ-изображениях соответствовали нанополостям, имеющим «боковые» проходы и закрытые снизу макромолекулами, лежащими вне зоны чувствительности иглы кантилевера (рис.1).

Таким образом, проведенный анализ АСМ изображений показал четкий нанокаркас, места сшивок и пересечений макромолекул, а также свободное пространство между ними.

Оценка способности миграции клеток на биоматериале была изучена в культуре мезенхимальных стромональных клеток *in vitro* [6].

В результате исследования было установлено, что в серии экспериментов с биоматериалом клетки преодолевали большее расстояние, что видно из таблицы 1.

Таким образом, на поверхности биоматериала клетки показали большую способность к таксису, чем в контрольном опыте: дистанция движения клеток составила – 389,50мкм (Min

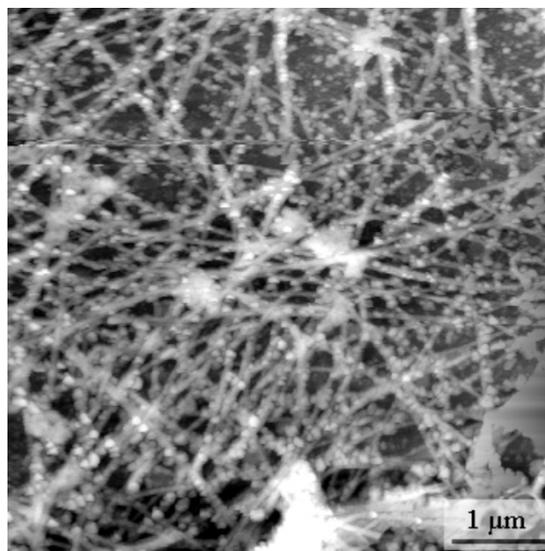


Рисунок 1. АСМ изображения микроструктуры биопластического материала 19x19 мкм

23,0; Max 584,0; ±15,78) в исследуемой группе, против 280,50мкм (Min 23,0;Max 584,0; ±15,01).

Выводы

Исходя из вышеуказанных результатов, можно заключить, что созданный наноструктурированный биопластический материал может стать перспективным для использования в современной офтальмомикрохирургии.

2.10.2012

Работа выполнена при поддержке гранта РГНФ №11-16-56001/12 и правительства Оренбургской области

Список литературы:

1. Конки Д., Эрба Э., Фрешни Р. и др. Культура животных клеток. Методы. – М.: Мир, 1989. – 220 с.
2. Кучеренко М.Г., Кецле Г.А., Мельник М.П., Летута С.Н. Известия АН СССР. Серия: Физика – 1993. – №57 (12) – С. 175–180.
3. Кучеренко М.Г., Кецле Г.А., Мельник М.П., Летута С.Н. Опт. И спектр. – 1995. – №78 (4) – 649 с.
4. Рахматуллин Р.Р., Бурлуцкая О.И., Адельшина Л.Р., Бурцева Т.И. Наноструктурированный материал «Гиаматрикс». // Врач. -2011. -№5. – С. 22-24.
5. Рахматуллин Р.Р. Биопластический материал на основе гиалуроновой кислоты: биофизические аспекты фармакологических свойств. // Фармация. -2011.– №4. – С. 37 – 39.
6. Рахматуллин Р., Бурлуцкая О., Гильмутдинова И., и др. Исследование биологической совместимости нового биоматериала «Гиаматрикс». // Врач. -2011. -№6. – С.32-34.

Сведения об авторах:

Рахматуллин Р.Р., заведующий лаборатории клеточных технологий ОГУ, кандидат медицинских наук

Бурлуцкая О.И., ведущий технолог лаборатории клеточных технологий ОГУ,
кандидат биологических наук

Адельшин А.И., инженер лаборатории клеточных технологий ОГУ

Бурцева Т.И., старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ОГУ,
кандидат биологических наук, доцент

Адельшина Л.Р., младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ОГУ

UDC 573.6.086.83+577.21

Rakhmatullin R. R., Burlutskaya O. I., Adelshin A. I., Burtseva T. I., Adelshina L. R.

DEVELOPMENT OF THE INNOVATIVE NANOSTRUCTURED BIOMATERIAL FOR AN OPHTHALMOSURGERY

Use of nanotechnologies for the purpose of creation of bioplastic materials, essentially new highly effective biomaterials allow to create meeting the requirements ophthalmosurgery. High-efficiency of the created bioplastic material proves to be true by cells testing in vitro conditions.

Keywords: hyaluronic acid, ophthalmosurgery, bioplastic material.

Bibliography:

1. Konki D., Erba E., Freshni R., etc. Culture of animal cells. Methods. – M: World, 1989. – 220 p.
2. Kucherenko M.G., Ketsl G.A., Miller of L.S., Letuta S.N. News of Academy of Sciences of the USSR. Series: Physics – 1993. – No. 57 (12) – P. 175-180.
3. Kucherenko M.G., Ketsl G.A., Miller of L.S., Letuta S.N. Wholesale. And range. – 1995. – No. 78 (4) – 649 p.
4. Rakhmatullin R.R., Burlutsky O.I., Adelshina L.R., Burtsev T.I. The nanostructured material «Hyamatrix»././Doctor.-2011.- №5. – P. 22-24.
5. Rakhmatullin R.R. A Bioplastic material on the basis of hyaluronic acid: biophysical aspects of pharmacological properties./ /Pharmacy.-2011. – No. 4. – P. 37-39.
6. Rakhmatullin R., Burlutskaya O., Gilmutdinova I., etal Research of biological compatibility of the new biomaterial «Hyamatrix»././ Doctor.-2011.-№6. – P. 32-34.