

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА БИОСОВМЕСТИМОСТИ НАТИВНЫХ МЕМБРАН БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ ПОДХОДОВ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ (ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

**MORPHOLOGICAL ASSESSMENT OF THE BIOCOMPATIBILITY OF NATIVE BACTERIAL CELLULOSE
MEMBRANES USING TISSUE ENGINEERING APPROACHES TO DECELLULARIZATION (PILOT STUDY)**

Ларионов П.М. Larionov P.M.
Погорелова Н.А. Pogorelova N.A.
Харченко А.В., Kharchenko A.V.
Терещенко В.П. Tereshchenko V.P.
Ступак Е.В. Stupak E.V.
Ступак В.В. Stupak V.V.
Самохин А.Г. Samokhin A.G.
Корель А.В. Korel A.V.,
Кирилова И.А. Kirilova I.A.

ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна»
Минздрава России,
г. Новосибирск, Россия,

Novosibirsk Research Institute of Traumatology
and Orthopaedics n.a. Ya.L. Tsivyan,
Novosibirsk, Russia,

ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный
университет имени П.А. Столыпина»,
г. Омск, Россия,

Omsk State Agrarian University named
after P.A. Stolypin,
Omsk, Russia,

АНО ОВО «Университет «Сириус»,
пгт. Сириус, Россия

Sirius University,
Sirius, Russia

Цель исследования – изучить влияние методов децеллюляризации бактериальной целлюлозы на биосовместимость в модели подкожной имплантации у крыс в сроки 7, 14 и 30 суток.

Материалы и методы. Использовалась бактериальная целлюлоза (БЦ) на 8-е сутки синтеза консорциумом *Medusomyces gisevii* в статических условиях. При 3 вариантах подготовки БЦ применяли ферментно-детергентные подходы децеллюляризации, перед обработкой растворами NaOH и в качестве контроля использовали БЦ с обработкой NaOH. Для оценки биосовместимости после стерилизации варианты БЦ имплантировались 18 крысам линии Wistar, которые выводились из эксперимента в сроки 7, 14, 30 суток после имплантации БЦ. Проводилось секционное исследование животных, материал фиксировался в формалине, следовала проводка через спирты и ксилол, парафинизация тканей, полученные срезы окрашивались гематоксилином-эозином и реактивом Шиффа (ПАС). Проводилась обзорная микроскопия гистологических препаратов, морфометрия перимплантных тканей на основе национального стандарта ГОСТ ISO 10993-6-2021. Статистический анализ полученных данных осу-

Objective – to study the effect of bacterial cellulose decellularization methods on biocompatibility in a model of subcutaneous implantation in rats at 7, 14 and 30 days.

Materials and methods. Bacterial cellulose (BC) was used on the 8th day of synthesis by the *Medusomycesgisevii* consortium under static conditions. In 3 variants of BC preparation, enzyme-detergent decellularization approaches were used, before treatment with NaOH solutions, and BC with NaOH treatment was used as a control. To assess biocompatibility, after sterilization, BC variants were implanted in Wistar rats with a total number of 18, which were withdrawn from the experiment at 7, 14, 30 days after BC implantation. A sectional study of animals was carried out. The material was fixed in formalin, followed by wiring through alcohols and xylene, and tissue paraffinization. The resulting sections were stained with hematoxylin-eosin and PAS. Survey microscopy of histological preparations was carried out. Morphometry of peri-implant tissues was performed based on the national standard GOST ISO 10993-6-2021. Statistical analysis of the obtained data was carried out using the Kruskal-Wallis test with Dunn's criterion.

Для цитирования: Ларионов П.М., Погорелова Н.А., Харченко А.В., Терещенко В.П., Ступак Е.В., Ступак В.В., Самохин А.Г., Корель А.В., Кирилова И.А. МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА БИОСОВМЕСТИМОСТИ НАТИВНЫХ МЕМБРАН БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ ПОДХОДОВ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ (ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ) // ПОЛИТРАВМА / POLYTRAUMA. 2023. № 3, С. 14-23. **Режим доступа:** <http://poly-trauma.ru/index.php/pt/article/view/478>

DOI: 10.24412/1819-1495-2023-3-14-23

ществлялся с использованием теста Краскела–Уоллиса с критерием Данна.

Результаты. В срок 7 суток при всех вариантах обработки БЦ наблюдалось острое экссудативное воспаление, статистический анализ результатов морфометрии клеточных реакций периимплантной области показал значимое снижение плотности полинуклеарных лейкоцитов и гистиоцитов при включении методов децеллюляризации против контроля ($p < 0,001$). Эта закономерность найдена в сроки 14 и 30 суток, где определено снижение плотности гистиоцитов против контроля ($p < 0,001$), а также уменьшение плотности многоядерных клеток в срок 30 суток (месяц) при вариантах подготовки с децеллюляризацией ($p < 0,001$) против контроля.

Заключение. Использование детергентно-ферментных методов децеллюляризации БЦ эффективно снижало уровень воспалительных реакций в каждом периоде времени – 7, 14, 30 суток. Гистохимический метод с реактивом Шиффа (ПАС) отлично визуализирует БЦ.

Ключевые слова: бактериальная целлюлоза; децеллюляризация; биосовместимость

Бактериальная целлюлоза (БЦ) – природный полисахарид, состоящий из мономеров (1,4)- β -D-глюкопиранозы (циклической формы глюкозы), две молекулы которых, соединенные β -глюкозидной связью, образуют первичное звено целлюлозы – целлобиозу (дисахарид), из которой и собираются нанオフィбриллярные волокна, продуцируемые аэробными, грамотрицательными микроорганизмами, в основном принадлежащими к роду бактерий семейства *Acetobacteraceae*, а именно вида *Komagataeibacter xylinus*, представители которого наиболее способны к продуктивному синтезу целлюлозы [1]. В химическом плане БЦ отличается исключительной чистотой, так как не содержит в сравнении с растительной целлюлозой таких примесей, как лигнин, гемицеллюлоза и пектин [2]. Кроме того, благодаря наличию трех свободных гидроксильных групп, расположенных в положениях C2-, C3- и C6-целлобиозы, БЦ относительно легко подвергается различным химическим реакциям и структурным изменениям, например, этерификации и ацилированию, что позволяет рассчитывать на широкий спектр модификаций при получении функционализированных материалов [3].

К выдающимся свойствам БЦ с позиции тканевой инженерии, позволяющим использовать ее в качестве альтернативы синтетическим материалам, относят эффективную клеточную адгезию, ускоренную миграцию и пролиферацию, и, в

конечном итоге, их дифференцировку, что обеспечивает эффективную регенерацию тканей и является основной стратегией регенеративной медицины. Биомедицинские устройства, изготовленные из БЦ, обладают такими ключевыми характеристиками, как низкая токсичность, способность удерживать влагу, возможность адекватного газообмена [4, 5] и нанометровые размеры [6]. Мембраны БЦ также имеют превосходные механические свойства: модуль упругости в диапазоне – от 15 до 35 ГПа, предел прочности при растяжении – от 200 до 300 МПа и относительное удлинение – от 1,5 до 2,0 %, что соответствует особенностям соединительных тканей человека [7]. Усиление механических свойств бактериальной целлюлозы возможно за счет введения в нее дополнительных композитов [8].

Более того, на сегодняшний день мембраны БЦ являются коммерческим продуктом с доказанной клинической эффективностью. При использовании в качестве перевязочных материалов они демонстрируют быструю эпителизацию и регенерацию тканей при лечении ран, хирургии диабетической стопы, хронических ранах и ожогах [9]. Имплантаты из БЦ применяются для пластики твердой мозговой оболочки головного и спинного мозга при черепно-мозговой травме и нейроонкологии [10].

В настоящее время для использования БЦ в биомедицинских и исследовательских целях применяют

Results. In a period of 7 days with all variants of BC treatment, acute exudative inflammation was observed. Statistical analysis of the results of morphometry of cellular reactions of the peri-implant area showed a significant decrease in the density of polynuclear leukocytes and histiocytes when decellularization methods were used as compared to controls ($p < 0.001$). This pattern was found after 14 and 30 days, where a decrease in the density of histiocytes was determined against control ($p < 0.001$), as well as a decrease in the density of multinucleated cells at a period of 30 days (month) with preparation options with decellularization ($p < 0.001$) against control.

Conclusion. The use of detergent-enzyme methods of BC decellularization effectively reduced the level of inflammatory reactions in each time period of 7, 14, 30 days. The histochemical method with Schiff's reagent (PAS) perfectly visualizes BC.

Key words: bacterial cellulose; decellularization; biocompatibility

химический метод очистки с различными концентрациями гидроксида натрия (NaOH) с различной экспозицией, температурными режимами и этапами отмывок [11-13].

Считается, что процесс очистки БЦ с помощью NaOH происходит за счет лизиса клеток всех бактерий-продуцентов, вызывая увеличение вязкости, кристалличности и повышение чистоты целлюлозных мембран [14].

В то же время БЦ может проявлять иммуногенность, связанную с контаминацией эндотоксином грамотрицательных бактерий-продуцентов и компонентом их бактериальной стенки (1,3)- β -D-гликаном [15]. В связи с этим актуальна разработка методов очищения нативных мембран БЦ с включением этапов ее децеллюляризации для использования в тканевой инженерии [16].

Цель исследования – изучить влияние методов децеллюляризации нативных мембран БЦ на биосовместимость в модели подкожной имплантации у крыс в сроки 7, 14 и 30 суток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

БЦ – мембраны (пленки), которые получали на 8-е сутки синтеза симбиотическим консорциумом *Medusomyces gisevii*, состоящим из *Gluconacetobacter sp.*, *Acetobacter sp.* и *Zygosaccharomyces sp.*, в статических условиях в колбах Эрленмейера на 250 мл с 7,5%-ной (w/w) глюкозой (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany), раство-

ренной в 0,5%-ном экстракте зеленого чая (Woodbury Sugar Shed Co., Woodbury, CT, USA) при температуре 25 ± 2 °C [Pogorelova N, Rogachev E, Digel I, Chernigova S, Nardin D. Bacterial Cellulose Nanocomposites: Morphology and Mechanical Properties. *Materials* (Basel). 2020 Jun 25; 13(12): 2849. doi: 10.3390/ma13122849]. После синтеза БЦ для всех вариантов следовала отмывка образцов дистиллированной водой 24 часа с двукратной сменой воды на орбитальном шейкере S-3LA2 ELM1 (Латвия) 120 об/мин температурой 37 °C; шейкер использовался также на каждом технологическом этапе подготовки БЦ. Были подготовлены следующие варианты БЦ:

- БЦ1 (контроль): БЦ обрабатывалась 0,1M NaOH 72 часа с трехкратной сменой раствора, следовала отмывка дистиллированной водой 48 часов, нейтрализация в 0,1M HCl, с контролем pH, четырехкратная отмывка дистиллированной водой;
- БЦ2: обработка лизоцимом (Solarbio, Китай) 0,5%-ным 24 часа, отмывка дистиллированной водой 2 часа, обработка 1%-ным раствором додецилсульфата натрия SDS (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, США) 48 часов, двукратная смена раствора, обработка 0,1M NaOH 24 часа, двукратная смена раствора, нейтрализация в 0,1M HCl с контролем pH 6,5, четырехкратная отмывка дистиллированной водой;
- БЦ3: обработка СВЧ 50 сек 600 Вт, Тритон X100 (MP Biomedicals, Германия) (2 %) 48 часов, трехкратная смена раствора, отмывка дистиллированной водой 2 часа, обработка 0,1M NaOH 24 часа, двукратная смена раствора, нейтрализация в 0,1M HCl с контролем pH 6,5, четырехкратная отмывка дистиллированной водой;
- БЦ4: обработка Тритон X100 (2 %) 48 часов, трехкратная смена раствора, отмывка дистиллированной водой 2 часа, 0,1M NaOH 2 часа при температуре 100 °C, отмывка дистиллированной водой 72 часа, трехкратная смена воды, нейтрализация в 0,1M HCl с контролем pH 6,5, четырех-

кратная отмывка дистиллированной водой.

После подготовки все образцы БЦ помещались в изотонический раствор NaCl 0,9%-ный, вальцевались в отдельных флаконах, стерилизовались 20 минут при температуре 121 °C и давлении две атмосферы.

Схема организации эксперимента. В эксперименте были использованы 18 особей крыс линии Wistar обоего пола, массой 240-310 г, которым проводилась подкожная имплантация 4 анализируемых имплантов БЦ (весь спектр). По достижении 7, 14 и 30 суток после операции крысы выводились из эксперимента — по 6 животных для каждой из временных групп.

Хирургическая процедура. Для наркотизации крыс использовали Золетил («Virbac», Франция) и Ксилазин ((Interchemie Werken «De Adelaar» BV, Нидерланды) в дозировке 30 и 5 мг/кг соответственно, парентерально вводили в хвостовую вену. После начала наркоза крысам выбривали шерсть в области холки и спины, проводили антисептическую обработку, в стерильных условиях выполняли косо-продольный разрез кожи относительно позвоночника, затем тупым путем формировали подкожные карманы, в которые имплантировали исследуемый вариант БЦ размером $2 \times 2 \times 15$ мм. Расстояние между карманами около 15 мм, проекции мест имплантаций не пересекались, кожу ушивали отдельными узловыми швами. Для выведения животных из эксперимента (эвтаназии) использовался хлороформ.

Биоэтика. Эксперимент соответствовал рекомендациям локального биоэтического комитета, при его постановке руководствовались приказом Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. № 199н «Правила надлежащей лабораторной практики».

Морфология. Импланты БЦ препарировались, фиксировались в 10%-ном нейтральном формалине 72 часа Histo Safe (Биовитрум, Россия). После фиксации материал отмывался проточной водой, вырезался, тканевые фрагменты ориентировались для получения попереч-

ных срезов имплантов БЦ, следовала стандартная проводка через батарею восходящих спиртов с замещением воды спиртом, а спирта — органическим растворителем (ксилолом) и финальной парафинизацией с использованием аппарата Автогистолог (Ат-4-М, Россия). Изготавливались парафинизированные срезы на санном микротоме MC-400 крат (Спектролаб, Россия) толщиной 6 мкм, проводилось окрашивание гематоксилин-эозином, выполнялась гистохимическая реакция на полисахариды с использованием набора с реактивом Шиффа и докрашиванием гематоксилином (ПАС-реакция, Биовитрум, Россия), препараты заключались покровными стеклами с использованием монтирующей среды Витрогель (Биовитрум, Россия). Для микроскопии использовали микроскоп Olympus CX43 (Япония) с программным пакетом Olympuscell Sens Standard.

Кроме обзорной микроскопии проводился полуколичественный анализ с использованием оценочных критериев действующего Национального Стандарта ГОСТ ISO 10993-6-2021 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследования местного действия после имплантации (с Поправкой). При этом анализе для каждого импланта с вариантом подготовки БЦ использовалось по 15 полей зрения (п/з), что у 6 имплантов составляло 90 п/з в каждом анализируемом временном периоде. Применялась полуколичественная оценка с использованием рекомендуемой шкалы рангов периимплантного инфильтрата для каждого типа анализируемых клеток: отсутствие инфильтрации клеток в п/з — 0 баллов; минимальная инфильтрация, 1-5 клеток в п/з — 1 балл; незначительная, 5-10 клеток в п/з — 2 балла; умеренная (обильная), более 10 клеток в п/з — 3 балла, и 4 балла присваивались плотно упакованному инфильтрату при использовании объектива с увеличением $\times 40$ и окуляра с увеличением $\times 10$, что у микроскопов с прямой оптикой дает суммарное увеличение $\times 400$, рекомендованное оценочны-

ми критериями действующего Национального Стандарта ГОСТ ISO 10993-6-2021. Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 10993-6:2016 ISO 10993-6 standard «Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследования местного действия после имплантации» («Biological evaluation of medical devices – Part 6: Tests for local effects after implantation»). Анализ проводил сертифицированный патологоанатом.

Статистическая обработка. На начальном этапе ранжированные в баллах показатели морфометрии анализировались на нормальность распределения с использованием теста Шапиро–Уилка, было определено отличие от нормального (Гауссового) распределения с уровнем значимости ($p < 0,05$), в связи с чем использовался непараметрический тест Краскела–Уоллиса с применением критерия Данна. Графическое выражение результатов, представленное медианой и процентилями, отражено в графиках (для 7, 14 и 30 суток эксперимента). Статистически значимыми считали различия $p < 0,05$. Анализ проводили с использованием программного пакета Graph Pad Prism

9.5.1.733 (Graph Pad Software, Inc., LaJolla, CA, USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

При обзорной микроскопии периимплантной области особенностью всех изучаемых вариантов подготовки БЦ в срок 7 суток после ее имплантации являлась воспалительная реакция экссудативного типа различной степени выраженности с преобладанием полинуклеарных лейкоцитов. В инфильтрате можно было выделить два слоя: непосредственно примыкающий к целлюлозе с клеточным детритом и полинуклеарными лейкоцитами, часто плотной компоновкой, и дистальный – от импланта, где преимущественно определялись гистиоциты и могли наблюдаться редкие многоядерные клетки, единичные лимфоциты (рис. 1). Из морфологических деталей непостоянным признаком было выявление новообразованных капилляров, что было характерным для имплантов контроля (БЦ1) (рис. 2). Некротических изменений, тромбозов микроциркуляторного русла не наблюдалось.

В срок 14 суток после имплантации БЦ гистологическая картина

характеризовалась умеренной или минимальной, преимущественно гистиоцитарной (макрофагальной) инфильтрацией с отсутствием или минимальной инфильтрацией полинуклеарными лейкоцитами и умеренной или незначительной инфильтрацией многоядерными клетками, которые прилегали к имплантам или распределялись в составе рыхлой формирующейся соединительнотканной капсулы вокруг имплантов БЦ (рис. 3). В цитоплазме многоядерных гистиоцитов определялась ПАС-позитивная реакция (рис. 4).

В срок 30 суток (месяц) периимплантная область для всех вариантов обработки характеризовалась отсутствием, незначительной или минимальной инфильтрацией гистиоцитами, соединительнотканная капсула была тонкой и слабо дифференцировалась от окружающих тканей, особенно при окрашивании гематоксилин-эозином (рис. 5). На контрасте с этим использование ПАС-реакции позволяло дифференцировать имплант от окружающих тканей (рис. 6). Кроме того, можно было наблюдать ПАС-позитивные многоядерные клетки и периимплантный отек с отслоением импланта от капсулы БЦ2.

Рисунок 1

Экссудативный двуслойный инфильтрат. Бактериальная целлюлоза окрашена в розовый цвет в правой части изображения БЦ1 (контроль), 7 суток. ПАС-реакция. Объектив $\times 10$

Figure 1

Exudative bilayer infiltrate. Bacterial cellulose is colored pink on the right side of the image BC1 (control), 7 days. PAS-reaction. Lens $\times 10$

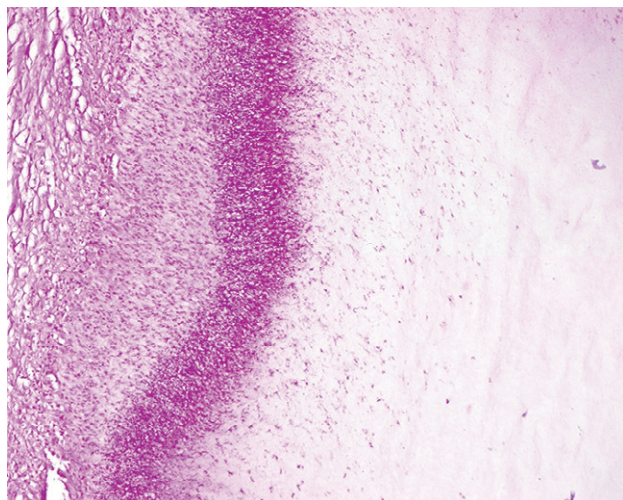


Рисунок 2

Дистальный слой инфильтрата, новообразование капилляров БЦ1 (контроль), 7 суток. ПАС-реакция. Объектив $\times 40$

Figure 2

Distal layer of infiltrate, neoplasm of capillaries BC1 (control), 7 days. PAS-reaction. Lens $\times 40$

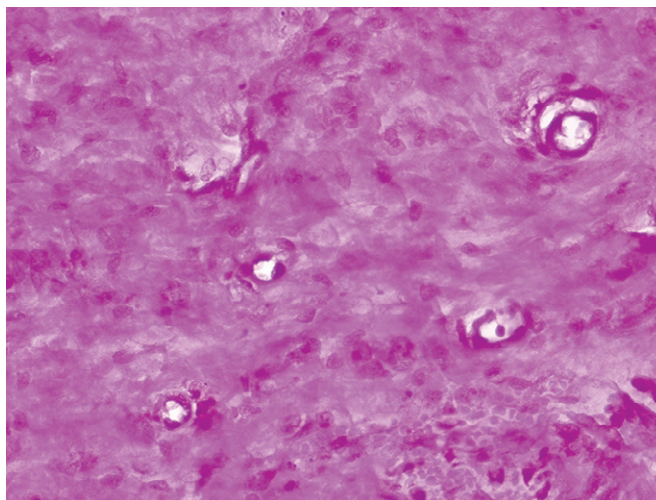


Рисунок 3

Формирование рыхлой соединительнотканной капсулы вокруг импланта, бактериальная целлюлоза с розовым окрашиванием. Незначительная гистиоцитарная инфильтрация и минимальная лимфоцитарная. Вариант обработки БЦ2, 14 суток. ПАС-реакция.

Объектив $\times 5$

Figure 3

Formation of a loose connective tissue capsule around the implant, bacterial cellulose with pink staining. Slight histiocytic infiltration and minimal lymphocytic. BC2 treatment option, 14 days. PAS-reaction. Lens $\times 5$

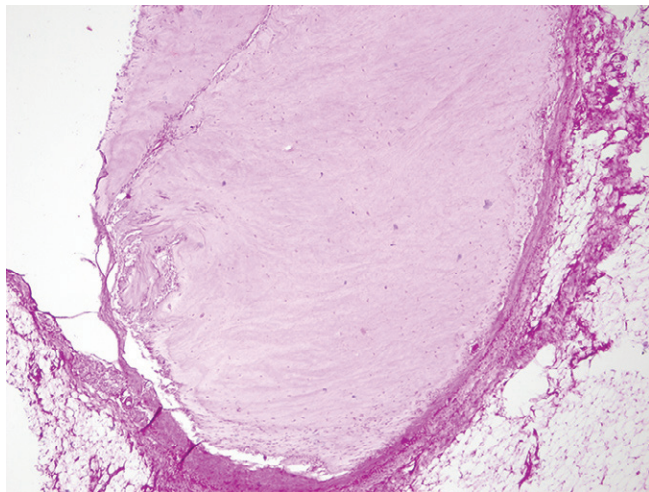


Рисунок 4

Формирование рыхлой соединительнотканной прослойки вокруг импланта, ПАС-положительное окрашивание цитоплазмы многоядерной клетки, примыкающей к бактериальной целлюлозе. Незначительная гистиоцитарная инфильтрация и минимальная лимфоцитарная БЦ2, 14 суток. ПАС-реакция. Объектив $\times 40$

Figure 4

Formation of a loose connective tissue layer around the implant, PAS-positive staining of the cytoplasm of a multinuclear cell adjacent to bacterial cellulose. Slight histiocytic infiltration and minimal lymphocytic. BC2, 14 days. PAS reaction. Lens $\times 40$

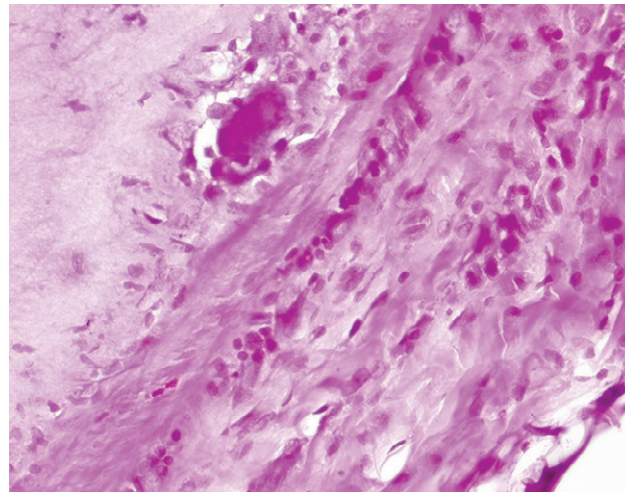


Рисунок 5

Отслоение импланта от рыхлой соединительной ткани на фоне периимплантного отека, минимальная гистиоцитарная инфильтрация, бактериальная целлюлоза справа. Фиброциты на поверхности варианта БЦ2, 30 суток. Гематоксилин-эозин.

Объектив $\times 10$

Figure 5

Detachment of the implant from loose connective tissue against the background of peri-implant edema, minimal histiocytic infiltration, bacterial cellulose on the right. Fibrocytes on the surface of the BC2 variant, 30 days. Hematoxylin-eosin. Lens $\times 10$

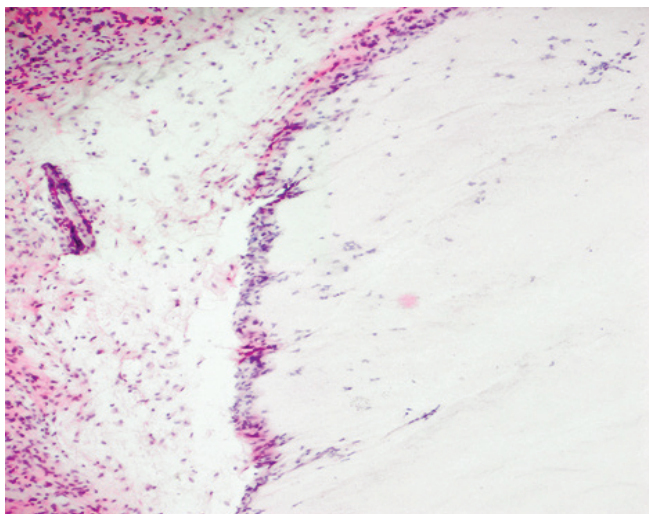


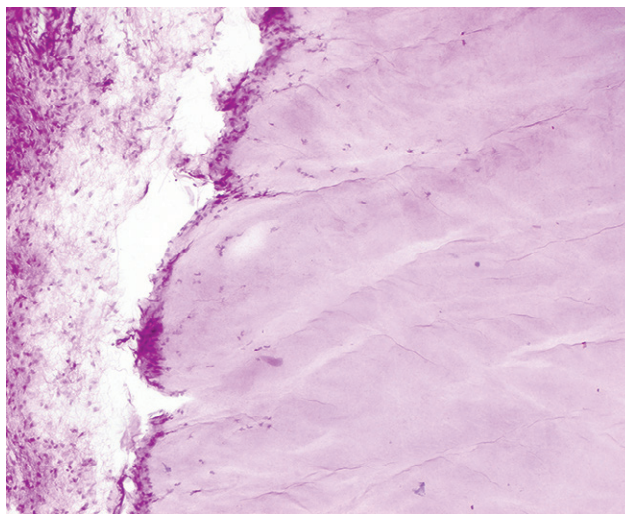
Рисунок 6

Отслоение импланта от рыхлой соединительной ткани на фоне отека, минимальная гистиоцитарная инфильтрация. Фиброциты на поверхности варианта БЦ2, 30 суток. ПАС-реакция.

Объектив $\times 10$

Figure 6

Detachment of the implant from the loose connective tissue against the background of edema, minimal histiocytic infiltration. Fibrocytes on the surface of BC2 variant, 30 days. PAS-reaction. Lens $\times 10$



Графическое выражение результатов статистического анализа и клеточных реакций в периимплантных тканях на 7, 14 и 30-е сутки представлено на рисунках 7, 8, 9 соответственно. В качестве сравнения использовались показатели БЦ1.

Статистический анализ результатов морфометрии клеточных реакций периимплантной области для всех изучаемых типов клеток в срок 7 суток показал значимое снижение плотности полинуклеарных лейкоцитов и гистиоцитов во всех изучаемых методах подготовки БЦ2, БЦ3 и БЦ4 против контроля ($p < 0,001$). Выраженность лимфоцитарной инфильтрации была сопоставимой с контролем при вариантах подготовки БЦ3 и БЦ4 и достоверно выше при варианте подготовки БЦ2 против контроля ($p < 0,001$); также при этом варианте БЦ2 наблюдалось значимое увеличение плазматических клеток ($p < 0,05$). Плотность многоядерных клеток была зна-

чимо ниже при вариантах БЦ3 и БЦ4 ($p < 0,001$) против контроля и сопоставимой с вариантом обработки БЦ2 с контролем (рис. 7).

Аналогичный анализ в срок 14 суток показал статистически значимое снижение плотности полинуклеарных лейкоцитов и гистиоцитов во всех изучаемых вариантах подготовки БЦ2, БЦ3 и БЦ4 по сравнению с контролем ($p < 0,001$). Выраженность лимфоцитарной инфильтрации была сопоставимой при вариантах БЦ3 и БЦ4 и достоверно выше при варианте БЦ2 по сравнению с контролем БЦ1 ($p < 0,001$); также при этом варианте БЦ2 наблюдалось значимое увеличение плазматических клеток ($p < 0,05$). Плотность многоядерных клеток была значимо ниже при вариантах БЦ3 и БЦ4 ($p < 0,001$) против контроля и сопоставимой с контролем при варианте обработки БЦ2 (рис. 8).

В срок 30 суток (месяц) полинуклеарные лейкоциты не наблюдались в контроле, вариантах

подготовки БЦ3 и БЦ4 и обнаруживались в минимальном количестве БЦ2; плотность гистиоцитов была значимо снижена во всех изучаемых вариантах подготовки с децеллюляризацией БЦ2, БЦ3 и БЦ4 против контроля ($p < 0,001$); плотность лимфоцитов при варианте подготовки БЦ2 была сопоставимой с контролем и значимо снижена при вариантах БЦ3, и БЦ4 ($p < 0,001$); плотность плазматических клеток значимо снижена при варианте БЦ2 ($p < 0,01$) и при вариантах БЦ3 и БЦ4 также снижена против контроля ($p < 0,001$). Значимое снижение плотности многоядерных клеток определялось при вариантах БЦ2 и БЦ3 ($p < 0,001$), а при варианте БЦ4 была сопоставима с контролем.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проблема очищения нативных мембран БЦ является кардинальным элементом реализации широкого спектра позитивных свойств БЦ для биомедицинского примене-

Рисунок 7

График результатов морфометрии клеточных реакций периимплантной области в сравнении с контролем (БЦ1) против вариантов бактериальной целлюлозы с децеллюляризацией – БЦ2, БЦ3, БЦ4 в срок 7 суток, в которых представлено графическое выражение медиан и квартилей с использованием теста Краскела–Уоллиса и применением критерия Данна с характеристикой значимости: (****) – $p < 0,001$ и (*) – $p < 0,05$

Figure 7

Graph of the results of morphometry of cellular reactions of the peri-implant area in comparison with the control of BC1 against bacterial cellulose variants with decellularization of BC2, BC3, BC4 in a period of 7 days, which presents a graphical expression of medians and quartiles using the Kruskal–Wallis test and using the Dunn criterion with a significance characteristic: (****) – $p < 0.001$ and (*) – $p < 0.05$

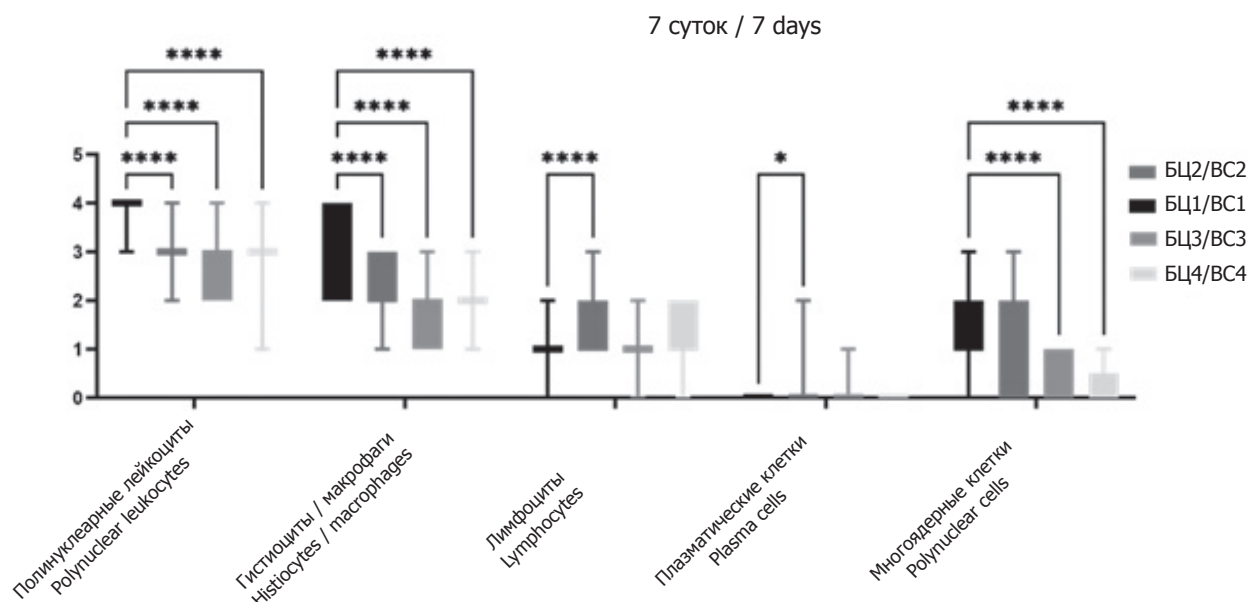


Рисунок 8

График результатов морфометрии клеточных реакций периимплантной области в сравнении с контролем (БЦ1) против вариантов бактериальной целлюлозы с децеллюляризацией – БЦ2, БЦ3, БЦ4 в срок 14 суток, в которых представлено графическое выражение медиан и квартилей с использованием теста Краскела–Уоллиса и применением критерия Данна и характеристикой значимости: (****) – $p < 0,001$ и (***) – $p < 0,005$

Figure 8

Graph of the results of morphometry of cellular reactions of the peri-implant area in comparison with the control of BC1 against bacterial cellulose variants with decellularization of BC2, BC3, BC4 in a period of 14 days, which presents a graphical expression of medians and quartiles using the Kruskal–Wallis test and using the Dunn criterion and significance characteristic: (****) – $p < 0.001$ and (***) – $p < 0.005$

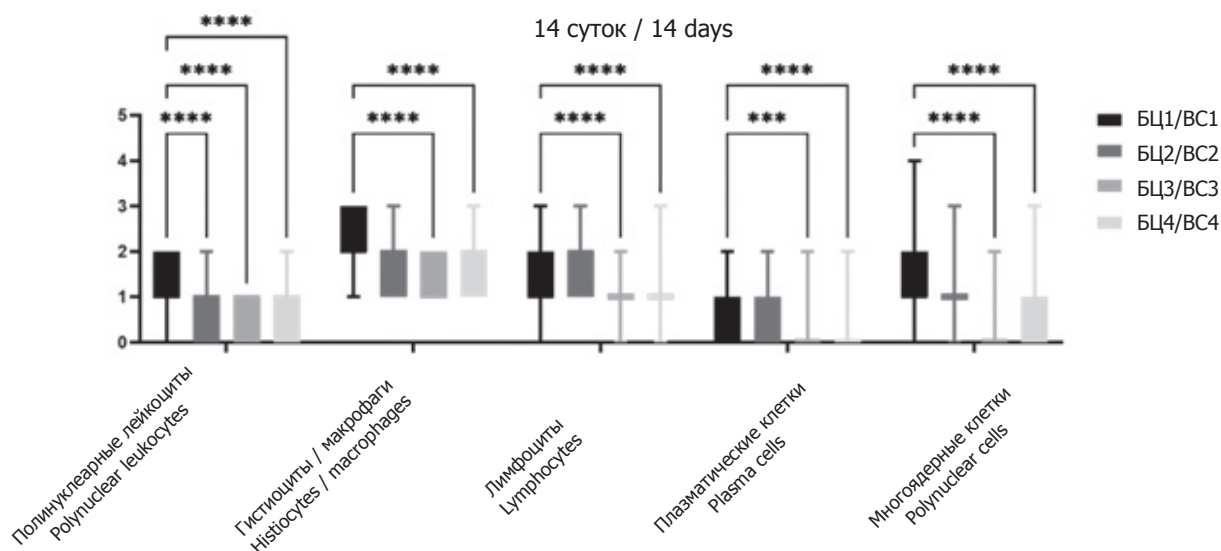
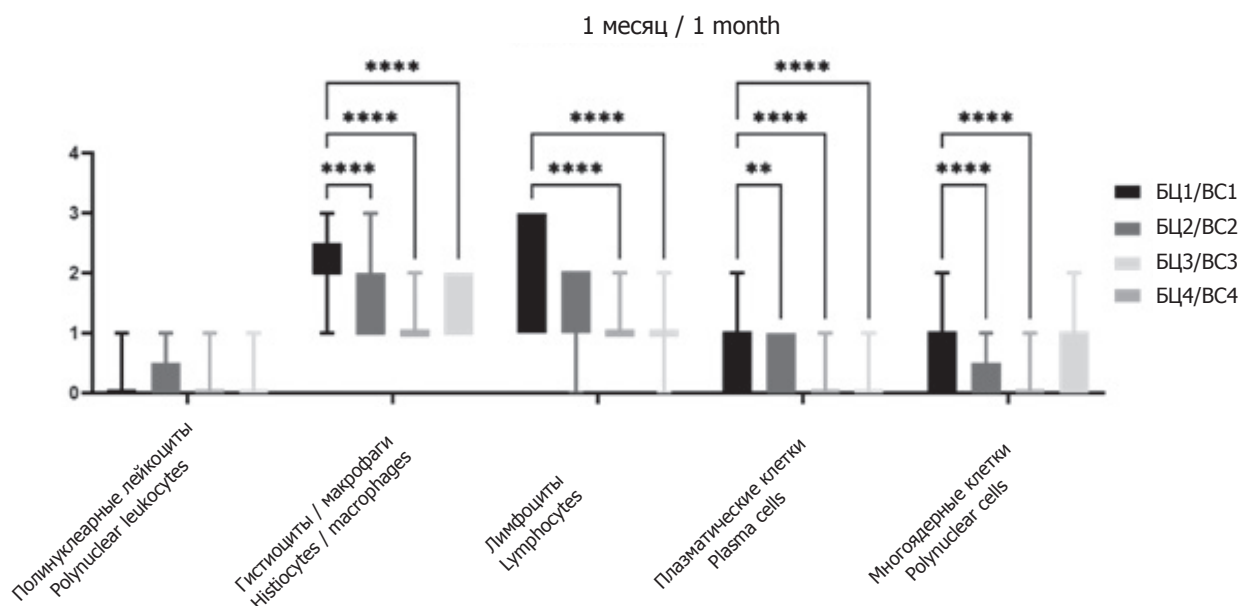


Рисунок 9

График результатов морфометрии клеточных реакций периимплантной области в сравнении с контролем (БЦ1) против вариантов бактериальной целлюлозы с децеллюляризацией – БЦ2, БЦ3, БЦ4 в срок 1 месяц, в которых представлено графическое выражение медиан и квартилей с использованием теста Краскела–Уоллиса и применением критерия Данна с характеристикой значимости: (****) – $p < 0,001$ и (**) – $p < 0,01$

Figure 9

Graph of the results of morphometry of cellular reactions of the peri-implant area in comparison with the control of BC1 against bacterial cellulose variants with decellularization of BC2, BC3, BC4 in a period of 1 month, which presents a graphical expression of medians and quartiles using the Kruskal–Wallis test and using the Dunn criterion with a significance characteristic: (****) – $p < 0.001$ and (**) – $p < 0.01$



ния. Эффективность используемых методов очистки натуральных мембран БЦ с использованием только NaOH находится на этапе критического осмысления и поиска эффективных подходов для улучшения очистки БЦ. Так, рассматриваются альтернативные решения одновременной очисткой и стерилизации путем обработки мембран БЦ сверхкритическим диоксидом углерода, а также с помощью холодной плазмы [17, 18].

В своей работе мы показали, что нативные мембраны БЦ в срок 7 суток после имплантации вызывают местную воспалительную реакцию экссудативного типа, которая проявляется преобладанием в составе перимплантного инфильтрата полинуклеарных лейкоцитов с участием макрофагов, что наблюдалось при всех вариантах подготовки БЦ. В значительной мере это был ожидаемый тканевой ответ на внедрение инородного тела (имплантов БЦ) и хирургическую процедуру. Однако даже в срок 7 суток после имплантации БЦ выраженность этой реакции была значительно снижена при всех вариантах подготовки с использованием ферментно-детергентной децеллюляризации в комбинации с NaOH при сравнении с контролем, где обработка была выполнена только растворами NaOH; найденное значимое снижение плотности полинуклеарных лейкоцитов и гистиоцитов ($p < 0,001$) представлено на рисунке 7. Более того, обнаружение некапиллярогенеза является морфологическим симптомом акцентированной воспалительной реакции, который выявлялся только в контроле (рис. 2) и не наблюдался при изучении перимплантных участков вариантов подготовки БЦ2, БЦ3, БЦ4 с использованием децеллюляризации. Интенсивная экссудативная реакция в срок 7 суток после имплантации нативной БЦ, обработанной растворами NaOH, и скаффолда на основе однотипной БЦ в сочетании с гидроксипатитом также отмечена в исследовании. Эти данные согласуются с работой K.V. Massari и соавт., которые отмечали значительное снижение воспалительного ответа в срок 15 дней после имплантации скаффолда на основе нативной БЦ с гидроксипатитом [19]. M. Osorio и соавт., изучая влияние пористости бактериальной целлюлозы на биосовместимость, также наблюдали острую воспалительную реакцию средней или минимальной выраженности в подкожной модели биосовместимости у мышей, где при подготовке БЦ использовались растворы едкого калия, и воспалительную реакцию от незначительной до умеренной в первую неделю после имплантации [20].

В срок 14 суток экспланации наблюдалось значительное снижение воспалительного ответа при всех вариантах подготовки БЦ относительно 7 дней, в то же время даже на фоне этого снижения, а также смены главных участников воспалительного ответа в составе перимплантных инфильтратов преобладали гистиоциты, определено статистически значимое снижение плотности полинуклеарных лейкоцитов и гистиоцитов во всех изучаемых вариантах подготовки БЦ2, БЦ3 и БЦ4 против контроля ($p < 0,001$). Выявленность лимфоцитарной инфильтрации была сопоставимой при вариантах БЦ3 и БЦ4 и достоверно выше при варианте БЦ2 против контроля ($p < 0,001$); также при этом варианте БЦ2 наблюдалось значимое увеличение плазматических клеток ($p < 0,05$). Плотность многоядерных клеток была значимо ниже при вариантах БЦ3 и БЦ4 ($p < 0,001$) против контроля и сопоставима с контролем при варианте обработки БЦ2 (рис. 8). Близкие результаты, в том числе снижение воспалительного ответа в срок 15 дней, были получены и другими авторами [20].

Тканевая реакция к сроку 30 суток (месяц) характеризуется общим изменением тканевого ответа, главным действующим элементом воспаления становится гистиоцит и его производные многоядерные клетки. В этот срок полинуклеарных лейкоцитов не наблюдалось в контроле и вариантах подготовки БЦ3 и БЦ4, они обнаруживались в минимальном количестве БЦ2, плотность гистиоцитов была значимо снижена во всех изучаемых вариантах подготовки с децеллюляризацией (БЦ2, БЦ3 и БЦ4) против контроля – БЦ1 ($p < 0,001$), плотность лимфоцитов при варианте подготовки БЦ2 была сопоставимой с контролем и значимо снижена при вариантах БЦ3, и БЦ4 ($p < 0,001$), плотность плазматических клеток значимо снижена при варианте БЦ2 ($p < 0,05$), а при вариантах БЦ3 и БЦ4 ($p < 0,001$) – против контроля. Значимое снижение плотности многоядерных клеток определялось при вариантах БЦ2 и БЦ3 ($p < 0,001$), а при варианте БЦ4 была сопоставима с контролем. Другие авторы в срок 4 недели в перимплантной области БЦ средней пористости наблюдали полинуклеарную инфильтрацию умеренной активности при отсутствии гистиоцитов [20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При развитии тканевого ответа на импланты БЦ можно выделить несколько фаз: фаза острого экссудативного тканевого ответа к сроку 7 суток, которая сменяется фазой элиминации в срок 14 суток, когда в составе перимплантного инфильтрата в минимальном количестве могут оставаться полинуклеары и преобладают гистиоциты, и переходит в фазу адаптации импланта БЦ 30 суток, когда полинуклеары не определяются, а гистиоциты присутствуют в минимальном количестве или в форме многоядерных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами доказано, что использование в протоколах подготовки БЦ тканеинженерных подходов с децеллюляризацией эффективно снижает уровень воспалительных реакций каждой из определенных нами фаз. Гистохимический метод с реактивом Шиффа (ПАС) отлично визуализирует бактериальную целлюлозу.

Информация о финансировании и конфликте интересов

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-10052 от 20.04.2023).

Информация о финансировании и конфликте интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES:

1. Betlej I, Zakaria S, Krajewski K, Boruszewski P. Bacterial cellulose – properties and its potential application. *Sains Malaysiana*. 2021; 50(2): 493-505. doi: 10.17576/jsm-2021-5002-20
2. GRAS Notice for Fibrillated Cellulose (GRN). 2020; No. 954. 75 p. <https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/gras-notice-inventory>
3. Ludwicka K, Kaczmarek M, Białkowska A. Bacterial nanocellulose – A biobased polymer for active and intelligent food packaging applications: recent advances and developments. *Polymers (Basel)*. 2020; 12(10): 2209. doi: 10.3390/polym12102209
4. Swingler S, Gupta A, Gibson H, Kowalczyk M, Heaselgrave W, Radeczka I. Recent advances and applications of bacterial cellulose in biomedicine. *Polymers*. 2021; 13: 412. doi: 10.3390/polym13030412
5. Kharchenko AV, Stupak VV. Bacterial nanocellulose as a plastic material for closure of defects of the dura mater: literature review. *Hirurgiâ pozvonočnika*. (Spine Surgery). 2019; 16(3): 62-73. doi: 10.14531/ss2019.3.62-73
6. Larionov PM, Filipenko ML, Stupak VV, Kharchenko AV, Afonyushkin VN, Tereshchenko VP, et al. Strukturanalyse von biosynthetisierter Cellulose (Nanocellulose) basierend auf den ergebnissen der konfokalen mikroskopie. *Siberian Scientific Medical Journal*. 2016; (4): 5-9. Russian (Ларионов П.М., Филипенко М.Л., Ступак В.В., Харченко А.В., Афонюшкин В.Н., Терещенко В.П. и др. Структурный анализ биосинтезированной целлюлозы (наноцеллюлозы) по результатам конфокальной микроскопии // Сибирский научный медицинский журнал. 2016. № 4. С. 5-9.)
7. Suryanto H, Muhajir M, Sutrisno T, Mudjiono A, Zakia N, Yanuhar U. The mechanical strength and morphology of bacterial cellulose films: the effect of NaOH Concentration. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2019; 515: 012053.
8. Lipovka A, Kharchenko A, Dubovoy A, Fillipenko M, Stupak V, Mayorov A, et al. The effect of adding modified chitosan on the strength properties of bacterial cellulose for clinical applications. *Polymers*. 2021; 13(12): 1995. doi: 10.3390/polym13121995
9. Catanzano O, Quaglia F, Boateng JS. Wound dressings as growth factor delivery platforms for chronic wound healing. *Expert Opin. Drug Deliv*. 2021; 18: 737-775.
10. Rosen CL, Steinberg GK, DeMonte F, Delashaw JB Jr, Lewis SB, Shafrey ME, et al. Results of the prospective, randomized, multicenter clinical trial evaluating a biosynthesized cellulose graft for repair of dural defects. *Neurosurgery*. 2011; 69:1093-1104. doi: 10.1227/NEU.0b013e3182284aca
11. Chernigova SV, Zubkova NV, Chernigov YuV, Pogorelova NA. Morphological changes in the tissue structures after thermal burns on the background of using DermaRM wound dressing. *La Prensa Medica Argentina*. 2019; 105(9): 521-525.
12. Pogorelova N, Rogachev E, Digel I, Chernigova S, Nardin D. Bacterial cellulose nanocomposites: morphology and mechanical properties. *Materials (Basel)*. 2020; 13(12): 2849. doi: 10.3390/ma13122849
13. Zakaria HN, Mohamad J, Mohamad SS, Fathiyah S, Mohd H. Effect of different treatment methods on the purification of bacterial cellulose produced from OPF juice by acetobacter xylinum. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2021; 1092(1): 012058. doi: 10.1088/1757-899X/1092/1/012058
14. Cubas ALV, Bianchet RT, de Oliveira D, Leonarski E, Cesca K. Application of non-thermal plasma as an alternative for purification of bacterial cellulose membranes. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2022; 29(1): 100800. doi: 10.1016/j.scp.2022.100800
15. Liu J, Bacher M, Rosenau T, Willför S, Mhryanyan A. Potentially immunogenic contaminants in wood-based and bacterial nanocellulose: assessment of endotoxin and (1,3)-β-d-Glucan Levels. *Biomacromolecules*. 2018; 19(1): 150-157. doi: 10.1021/acs.biomac.7b01334
16. Subbotin DV, Larionov PM, Sergeevichev DS, Subbotina OA, Zaitsev GS, Novruzov RBO, et al. Morphologische bewertung der zytoarchitektonik des aortentransplantats in den stadien der biotechnologie mit der analyse von veränderungen in den spektren der laserinduzierten fluoreszenz. *Zelltechnologien in Biologie und Medizin*. 2009; (4): 191-196. Russian (Субботин Д.В., Ларионов П.М., Сергеевичев Д.С., Субботина О.А., Зайцев Г.С., Новрузов Р.Б.О. и др. Морфологическая оценка цитоархитектоники аортального графта на этапах биотехнологии с анализом изменений спектров лазерно-индуцированной флюоресценции // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2009. № 4. С. 191-196.)
17. Pigaleva MA, Bulat MV, Gromovkykh TI, Gavryushina IA, Lutsenko SV, Gallyamov MO, et al. A new approach to purification of bacterial cellulose membranes: What happens to bacteria in supercritical media? *The Journal of Supercritical Fluids*. 2019; 147: 59-69. doi: 10.1016/j.supflu.2019.02.009
18. Cubas ALV, Bianchet RT, Oliveira D, Leonarski E, Cesca K. Application of non-thermal plasma as an alternative for purification of bacterial cellulose membranes. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2022; 29(1): 100800. doi: 10.1016/j.scp.2022.100800
19. Massari KV, Marinho GO, Silva JL, Holgado LA, Leão AL, de Moraes Chaves MR, et al. Tissue reaction after subcutaneous implantation of a membrane composed of bacterial cellulose embedded with hydroxyapatite. *Dent Oral Craniofac Res*. 2015; 1(2): 25-30. doi: 10.15761/DOCR.1000106
20. Osorio M, Cañas A, Puerta J, Díaz L, Naranjo T, Ortiz I, Castro C. Ex Vivo and In Vivo biocompatibility assessment (blood and tissue) of three-dimensional bacterial nanocellulose biomaterials for soft tissue implants. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 10553 p1-9. doi: 10.1038/s41598-019-46918-x.9:10553

Сведения об авторах:

Ларионов П.М., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник, ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, г. Новосибирск, Россия.

Погорелова Н.А., к.б.н., доцент кафедры продуктов питания и пищевой биотехнологии агротехнологического факультета, ФГБОУ ВО Омский ГАУ, г. Омск, Россия.

Харченко А.В., врач-нейрохирург приемного отделения, ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, г. Новосибирск, Россия.

Information about authors:

Larionov P.M., MD, PhD, professor, chief researcher, Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n.a. Ya.L. Tsivyan, Novosibirsk, Russia.

Pogorelova N.A., candidate of biological sciences, associate professor, department of food products and food biotechnology, faculty of agrotechnology, Omsk State Agrarian University, Omsk, Russia.

Kharchenko A.V., neurosurgeon of admission department, Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n.a. Ya.L. Tsivyan, Novosibirsk, Russia.

Терещенко В.П., научный сотрудник, АНО ОВО «Университет «Сириус», Краснодарский край, пгт. Сириус, Россия.

Ступак Е.В., к.м.н, врач нейрохирург отделения нейрохирургии № 1, ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, г. Новосибирск, Россия.

Ступак В.В., д.м.н., профессор, начальник научно-исследовательского отделения нейрохирургии, ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, г. Новосибирск, Россия.

Самохин А.Г., научный сотрудник, ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, г. Новосибирск, Россия.

Корель А.В., научный сотрудник, ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, г. Новосибирск, Россия.

Кирилова И.А., д.м.н, заместитель директора по научной работе, ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, г. Новосибирск, Россия.

Адрес для переписки:

Харченко Алексей Валерьевич, ул. Фрунзе 17, г. Новосибирск, Россия, 630091

Тел: +7 (913) 892-98-46

E-mail: alexdok2000@gmail.com

Статья поступила в редакцию: 22.08.2023

Рецензирование пройдено: 30.08.2023

Подписано в печать: 01.09.2023

Tereshchenko V.P., researcher, Sirius University, Krasnodar region, Sirius, Russia.

Stupak E.V., candidate of medical sciences, neurosurgeon, department of neurosurgery No. 1, Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics n.a. Ya.L. Tsivyan, Novosibirsk, Russia.

Stupak V.V., MD, PhD, professor, head of research department of neurosurgery, Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics n.a. Ya.L. Tsivyan, Novosibirsk, Russia.

Samokhin A.G., researcher, Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics n.a. Ya.L. Tsivyan, Novosibirsk, Russia.

Korel A.V., researcher, Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics n.a. Ya.L. Tsivyan, Novosibirsk, Russia.

Kirilova I.A., MD, PhD, deputy director for research, Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics n.a. Ya.L. Tsivyan, Novosibirsk, Russia.

Address for correspondence:

Kharchenko Alexey Valerievich, Frunze St., 17, Novosibirsk, Russia, 630091

Tel: +7 (913) 892-98-46

E-mail: alexdok2000@gmail.com

Received: 22.08.2023

Review completed: 30.08.2023

Passed for printing: 01.09.2023