УДК 616.74-001-08

# ВЛИЯНИЕ D-АСПАРАГИНА НА БИОСОВМЕСТИМОСТЬ МОДИФИЦИРОВАННОГО АЛЬГИНАТНОГО ГИДРОГЕЛЯ СО СКЕЛЕТНОЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНЬЮ КРЫСЫ

***Г.М. Шамоян, А.И. Трофименко, А.Х. Каде, Т.В. Читанава, М.А. Джопуа, М.А. Мовсесян, Д.Г. Шанава, А.А. Стрелкова, А.О. Кешабян***

*ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России*

Актуальной задачей тканевой инженерии является поиск модификаторов полисахаридных гелей растительного происхождения, способных контролировать как биосовместимость и интеграцию гидрогелевого матрикса в мышечное волокно, так и скорость биодеструкции матрикса. Цель исследования – изучение влияния D-аспарагина на биосовместимость модифицированного альгинатного гидрогеля со скелетной мышечной тканью крысы. В ходе исследования выделено 2 группы животных: группа № 1 (сравнения) – 14 крыс, которым в мышцы бедра вводили 0,5 мл модифицированного альгинатного гидрогеля без D-аспарагина; группа № 2 (опытная) – 14 крыс, которым в мышцы бедра вводили 0,5 мл модифицированного альгинатного гидрогеля с D-аспарагином. По данным гистологического исследования, в мышце с введенным модифицированным альгинатным гидрогелем на 30-е сутки выявляется сформированный крупноячеистый матрикс, стенки его ячеек заселены клетками. Добавление D-аспарагина в рецептуру гидрогеля предотвращает образование фиброзной капсулы вокруг формирующегося в мышце имплантата, а также увеличивает количество сосудов и клеток, заселяющих его.

*Ключевые слова*: гидрогель, мышца, регенерация, D-аспарагин, альгинат натрия.

DOI 10.19163/1994-9480-2018-1(65)-67-70

# THE INFLUENCE OF D-ASPAPHAGINE ON THE BIOCOMPATIBILITY OF THE MODIFIED ALGINATE HYDROGEL WITH THE RAT'S SKELETAL MUSCLE TISSUE

***G.M. Shamojan, A.I. Trofimenko, A.H. Kade, T.V. Chitanava, M.A. Dzhopua, M.A. Movsesjan, D.G. Shanava, A.A. Strelkova, A.O. Keshabjan***

*FSEI HE «Kuban State Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation*

The important goal of tissue engineering is the search for modifying additives of polysaccharide gels of vegetable origin capable of controlling the biocompatibility and integration of the hydrogel matrix in the muscle fiber and the rate of biodegradation of the matrix. The aim of the study was to study the effect of D-asparagine on the biocompatibility of the modified alginate hydrogel with rat's skeletal muscle tissue. In the during of the study were 2 groups of animals: group № 1 (comparison) – 14 rats, with 0.5 ml of modified alginate hydrogel without D-asparagine injected into the muscle of thigh; group №2 (experimental) – 14 rats, in which 0.5 ml of modified alginate hydrogel with D-asparagine was injected into the muscle of thigh. According to the histological examination, in the muscle with the modified alginate hydrogel introduced on the 30th day, a large-celled matrix is formed, the walls of its cells are populated with cells. The addition of D-asparagine to the hydrogel formulation inhibits the formation of a fibrous capsule around the implant in the muscle, and also increases the number of vessels and cells that populate it.

*Key words:* hydrogel, muscle, regeneration, D-asparagine, sodium alginate.

Несмотря на то, что поперечнополосатая скелетная мышечная ткань, за счет наличия миосателлитов и циркулирующих мезенхимальных стволовых клеток, способна к репарации поврежденных участков, существует проблема регенерации ее значительных травматических повреждений [12]. Ограниченная способность мышечной ткани к регенерации оправдывает необходимость разработки методов экзогенной реконструкции для ее структурного и функционального восстановления при крупных повреждениях [10].

Существующие методы реконструкции мышечных дефектов, в основе которых лежит аутологичная трансплантация мышц и введение клеток миосателлитов, показали умеренную эффективность, преимущественно вследствие плохого приживления и нарушения интеграции используемых клеток в поврежденных мышечных волокнах реципиента, а также крайне малого количества донорской ткани [10].

Принципиально новой стратегией в терапии крупных повреждений мышечной ткани является использование биоинженерных конструкций, пригодных для ее регенерации, так как они потенциально способны обеспечить быстрое заполнение структурного дефекта [8].

Одним из приоритетных подходов является заполнение дефектов мышц гидрогелями, которые обладают высокой биосовместимостью, имитируют механические и структурные свойства тканей, обеспечивают диффузию кислорода и питательных веществ, являются биодеградируемыми и пригодны к инъекционному введению в виде жидкого предшественника для последующей полимеризации и образования скаффолда in situ [1, 11].

Гидрогели, предназначенные для регенерации мышечной ткани, помимо биосовместимости, должны обладать соответствующими культуральными свойствами, а также должны обеспечивать необходимый срок для формирования новой ткани, чрезвычайно важным

параметром является контролируемое время их биодеструкции [4, 6, 9].

Актуальной задачей становится поиск модификаторов природных полисахаридных гелей растительного происхождения способных контролировать, как биосовместимость и интеграцию гидрогелевого матрикса в мышечное волокно, так и скорость биодеструкции матрикса.

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение влияния D-аспарагина на биосовместимость модифицированного альгинатного гидрогеля со скелетной мышечной тканью крысы.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на базе лаборатории кафедры общей и клинической патологической физиологии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России. Эксперименты проведены на 28 белых нелинейных самцах крыс средней массой – (272 ± 15) г. Содержание животных и постановка экспериментов проводились в соответствии с требованиями приказа МЗ РФ от 01.04.2016 года № 199, а также международными правилами «Guide for the Care and Use of the Laboratory Animals».

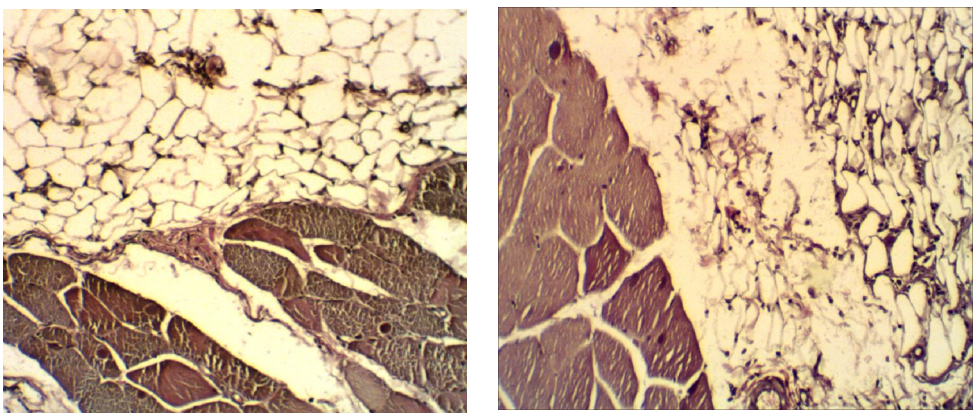
Исследуемый гидрогель приготовлен на основе альгината натрия, поливинилового спирта, метасиликата натрия и высокоочищенной воды, в двух вариантах – без и с добавкой D-аспарагина [3].

Характеристика групп животных: группа № 1 (сравнения) – 14 крыс, которым в мышцы бедра вводили 0,5 мл модифицированного альгинатного гидрогеля без D-аспарагина; группа № 2 (опытная) – 14 крыс, которым в мышцы бедра вводили 0,5 мл модифицированного альгинатного гидрогеля с D-аспарагином.

Все болезненные манипуляции проводились под наркозом – телазол 3 мг/кг и ксиланит 4 мг/кг, препараты вводились внутримышечно. Эвтаназию животных проводили на 30-е сутки от начала эксперимента путем декапитации предварительно наркотизированных крыс. Мышцы бедра с введенным гидрогелем фиксировали в цинк-формалиновом фиксаторе с сульфатом цинка [7]. Выполняли проводку образцов через изопропанол, с последующей заливкой в парафин. Парафиновые блоки нарезали на срезы толщиной 5 мкм на микротоме МПС-2 (СССР). Окрашивание микропрепаратов проводили гематоксилином и эозином, а также по методу Маллори в модификации Слинченко [2]. Для фотографии микропрепаратов использовали микроскоп Микмед-5 (Россия) и окулярную камеру Levenhuk-230 (США). Для обработки фотографий микропрепаратов применялась программа Gimp 2 (США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

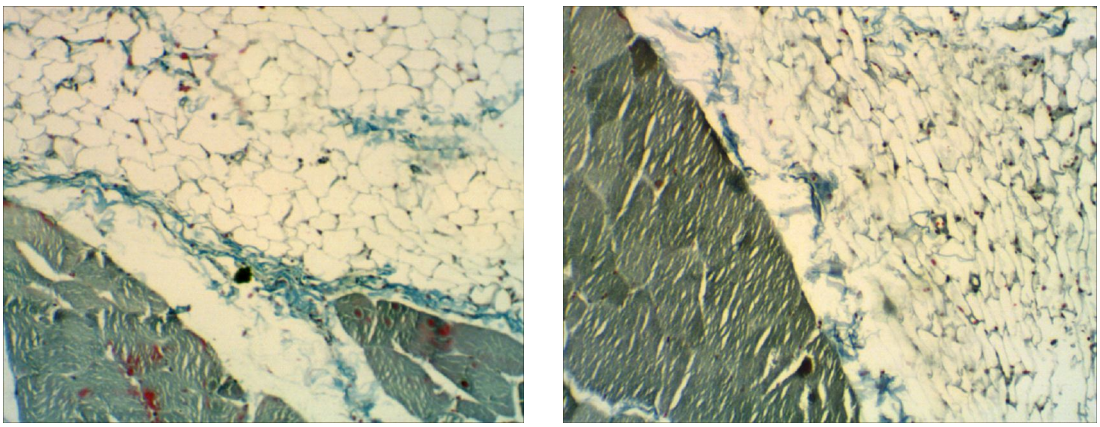
В ходе эксперимента случаев гибели и развития осложнений у животных не зафиксировано. На микропрепаратах, полученных от крыс из группы № 1 (сравнения), на месте введенного гидрогеля обнаружена рыхлая крупноячеистая структура, которая отделена от поперечно-полосатой скелетной мышечной ткани плотной, оформленной, соединительно-тканной капсулой. Формирование ячеистого матрикса, после инъекционного введения раствора альгината натрия с комплексом добавок, обусловлено имеющимися в тканевой жидкости ионами кальция, которые вызывают сшивку полисахаридных цепей альгината. Образование соединительно-тканной капсулы является защитной реакцией организма в ответ на имплантацию, блокирует заселение конструкта клетками и интеграцию имплантата с окружающей тканью. В стенках ячеек, сформировавшегося после in situ полимеризации гидрогеля, видны редкие включения клеток с округлыми ядрами. Следует отметить, несмотря на имеющиеся к 30-м суткам признаки начинающейся биодеструкции имплантата, в целом, его структура сохранена. Таким образом, использование поливинилового спирта и метасиликата натрия (при гидролизе образуются поликремниевые кислоты) улучшает механические и культуральные свойства, а также тормозит биодеструкцию альгинатного геля. Признаков воспалительной инфильтрации окружающей имплантат мышечной ткани не выявлено, что свидетельствует о его биосовместимости с мышечной тканью (рис. 1А, 2А).



А Б

Рис. 1: А – микропрепарат бедренной мышцы крысы из группы № 1 (гидрогель без D-аспарагина); Б – микропрепарат бедренной мышцы крысы из группы № 2 (гидрогель с D-аспарагином), окрашено гематоксилин-эозином, х 100

На микропрепаратах, полученных от крыс из группы № 2 (опытная), на месте введенного гидрогеля выявляется рыхлая крупноячеистая структура со значительным количеством клеточных элементов и единичными сосудами, отделенная от поперечнополосатой скелетной мышечной ткани рыхлой, рваной, неоформленной соединительно-тканной капсулой (рис. 2А, 2Б). Признаков воспалительной клеточной инфильтрации окружающей имплантат мышечной ткани также не выявлено. Выявляются признаки умеренной биодеструкции гидрогелевой конструкции, что объясняется заметно большим, в сравнении с группой № 1 (сравнения), содержанием в ней клеток. Значительное количество клеточных элементов в ячейках каркаса, сформировавшегося из введенного гидрогеля, предположительно обусловлено отсутствием полного закрытия имплантата фиброзной капсулой.



А Б

Рис. 2: А – микропрепарат бедренной мышцы крысы из группы № 1 (гидрогель без D-аспарагина); Б – микропрепарат бедренной мышцы крысы из группы № 2 (гидрогель с D-аспарагином), окрашено по Маллори в модификации Слинченко, х 100

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внутримышечное введение раствора на основе альгината натрия, поливинилового спирта и метасиликата натрия приводит к 30-м суткам к образованию *in situ* ячеистого конструкта, заселенного клетками. Таким образом, добавление D-аспарагина в рецептуру гидрогеля тормозит формирование фиброзной капсулы вокруг формирующегося в мышце имплантата, а также увеличивает количество сосудов и клеток, заселяющих его. Использование D-аспарагина в качестве добавки к полисахаридным гидрогелям может быть перспективно для разработки нового метода лечения грубых дефектов мышечной ткани.

## *ЛИТЕРАТУРА*

1. Волкова И.М., Коровина Д.Г. Трехмерные матриксы природного и синтетического происхождения для клеточной биотехнологии // Биотехнология. – 2015. – № 2. – С. 8–26.

2. Коржевский, Д.Э., Гиляров, А.В. Основы гистологической техники. – СПб.: СпецЛит, 2010. – 95 с.

3. Пат. 2643922 Российская Федерация, МПК A61K 31/198 (2006.01), A61K 31/715 (2006.01), A61K 33/00 (2006.01). Гидрогель для замещения дефектов биологических тканей / Каде А.Х.; Трофименко А.И., Занин С.А. и соавт. заявитель и патентообладатель Каде А.Х.; Трофименко А.И., Занин С.А. и соавт., ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России. – № 2017120133; заявл. 07.06.2017; опубл. 06.02.2018, Бюл. № 4. – 2 с.

4. Bian W., Bursac N. Engineered skeletal muscle tissue networks with controllable architecture // Biomaterials. – 2009. – Vol. 30, № 7. – P. 1401–1412.

5. Chitanava T., Egiev I., Chechelian V. et al. The Influence of D-Asparagine on the Glial Cicatrix Formation in Experimental Spinal Stroke // American Journal of Clinical and Experimental Medicine. – 2017. – Vol. 5, № 3. – P. 93–96. doi: 10.11648/j.ajcem.20170503.15

6. Hinds S., Bian W., Dennis R.G. et al. The role of extracellular matrix composition in structure and function of bioengineered skeletal muscle // Biomaterials. – 2011. – Vol. 32, № 14. – P. 3575–3583.

7. Kierman J.A. Histological and histochemical methods. Theory and practice. – London: Scion Publishing Ltd., 2008. – 606 p.

8. Mertens J.P., Sugg K.B., Lee J.D. et al. Engineering muscle constructs for the creation of functional engineered musculoskeletal tissue // Regenerative medicine. – 2014. – Vol. 9, № 1. – P. 89–100.

9. Nguyen M.K., Lee D.S. Injectable biodegradable hydrogels // Macromolecular bioscience. – 2010. – Vol. 10, № 6. – P. 563–579.

10. Rizzi R., Bearzi C., Mauretti A. et al. Tissue engineering for skeletal muscle regeneration // Muscles, ligaments and tendons journal. – 2012. – Vol. 2, № 3. – P. 230–234.

11. Seliktar D. Designing cell-compatible hydrogels for biomedical applications // Science. – 2012. – Vol. 336, № 6085. – P. 1124–1128.

12. Turner N.J., Badylak S.F. Regeneration of skeletal muscle // Cell and tissue research. – 2012. – Vol. 347, № 3. – P. 759–774.

## *REFERENCES*

1. Volkova I.M., Korovina D.G. Trekhmernye matriksy prirodnogo i sinteticheskogo proiskhozhdeniia dlia

kletochnoi biotekhnologii [Three-dimensional matrices of natural and synthetic origin for cellular biotechnology]. *Biotekhnologiia* [Biotechnology], 2015, no. 2, pp. 8–26. (In Russ.; abstr. in Engl.).

2. Korzhevskii, D.E., Giliarov, A.V. Osnovy gistologicheskoi tekhniki [Basics of histological technique]. Saint Petersburg: SpetcLit, 2010. 95 p.

3. Kade A.Kh.; Trofimenko A.I., Zanin S.A. et al. Gidrogel dlia zameshcheniia defektov biologicheskikh tkanei [Hydrogel for replacement of defects of biological tissues]. Patent RF, no. 2017120133, 2017; publ. 06.02.2018, Bull. no. 4. – 2 p.

4. Bian W., Bursac N. Engineered skeletal muscle tissue networks with controllable architecture. Biomaterials, 2009, Vol. 30, no. 7, pp. 1401–1412.

5. Chitanava T., Egiev I., Chechelian V. et al. The Influence of D-Asparagine on the glial cicatrix formation in experimental spinal stroke. American Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2017, Vol. 5, no. 3, pp. 93–96. doi: 10.11648/j.ajcem.20170503.15

6. Hinds S., Bian W., Dennis R.G. et al. The role of extracellular matrix composition in structure and function of bioengineered skeletal muscle. Biomaterials, 2011, Vol. 32, no. 14, pp. 3575–3583.

7. Kierman J.A. Histological and histochemical methods. Theory and practice. London: Scion Publishing Ltd., 2008. 606 p.

8. Mertens J.P., Sugg K.B., Lee J.D. et al. Engineering muscle constructs for the creation of functional engineered musculoskeletal tissue. Regenerative medicine, 2014, Vol. 9, no. 1, pp. 89–100.

9. Nguyen M.K., Lee D.S. Injectable biodegradable hydrogels. Macromolecular bioscience, 2010, Vol. 10, no. 6, pp. 563–579.

10. Rizzi R., Bearzi C., Mauretti A. et al. Tissue engineering for skeletal muscle regeneration. Muscles, ligaments and tendons journal, 2012, Vol. 2, no. 3, pp. 230–234.

11. Seliktar D. Designing cell-compatible hydrogels for biomedical applications. Science, 2012, Vol. 336, no. 6085, pp. 1124–1128.

12. Turner N.J., Badylak S.F. Regeneration of skeletal muscle. Cell and tissue research, 2012, Vol. 347, no. 3, pp. 759–774.

***Контактная информация***

**Каде Азамат Халидович** – д. м. н., профессор, зав. кафедрой общей и клинической патологической физиологии, Кубанский государственный медицинский университет, e-mail: akh_kade@mail.ru