

6. Zamora J. C., Guimaraes V., Rogachev G. V., et al. Direct fusion measurement of the 8B proton-halo nucleus at near-barrier energies. *Physics Letters B*. 2021;816. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.physletb.2021.136256>
7. Шперлинг И. А., Шулепов А. В., Одицова И. А. и др. Саногенетические механизмы ранней коррекции гиалуроновой кислотой местных повреждений мягких тканей при компрессионной травме (экспериментальное исследование) // *Medline.ru*. Российский биомедицинский журнал. 2022. Т. 23. С. 573–595.
8. Шперлинг И. А., Виноградов М. В., Семакин Р. В. и др. Микроциркуляторные и метаболические изменения в мягких тканях в динамике раневого процесса при взрывной травме в эксперименте // *Сибирский научный медицинский журнал*. 2021. Т. 41(5). С. 16–24. DOI: <https://doi.org/10.18699/SSMJ20210502>
9. Wang W., Wang Y., Yang J. Protective effects of ischemic postconditioning on skeletal muscle following crush syndrome in the rat. *Acta Cir. Bras*. 2021; 36(7):e360701. DOI: 10.1590/ACB360701

УДК:[599.323.4:616-018]:612.81

<sup>1</sup>Юкина Г. Ю., <sup>1</sup>Сухорукова Е. Г., <sup>2</sup>Тагандурдыева Н. А., <sup>1</sup>Половников И. В.

## **СРАВНИТЕЛЬНЫЙ МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЛИЛАКТИДНЫХ КОНДУИТОВ С ХИТОЗАНОВЫМИ НАПРАВЛЯЮЩИМИ ВОЛОКНАМИ С РАЗЛИЧНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

<sup>1</sup>*Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Российская Федерация*

<sup>2</sup>*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Российская Федерация*

---

*Аннотация.* Целью работы является проведение сравнительного морфологического анализа полилактидных кондуитов с направляющими хитозановыми волокнами с углеродными нанотрубками, используемых для регенерации периферических нервов в эксперименте на крысах.

Методика работы заключается в моделировании дефекта седалищного нерва крыс, замещении полилактидными кондуитами, наполненными хитозановыми моноволокнами, содержащими одностенные углеродные нанотрубки, анализе срезов нерва и кондуита.

Основные результаты работы показали, что волокна с высокой концентрацией (2,5 мас.%) углеродных нанотрубок вызывают выраженное хроническое асептическое воспаление. Хитозановые моноволокна с содержанием углеродных нанотрубок 0,05 мас.% деформируются под действием компрессионных сил со стороны окружающих тканей, в то время как композиционное волокно с содержанием 0,5 мас.% углеродных нанотрубок оказалось наиболее удачным вариантом направляющих волокон в кондуите, так как не вызывает значительного воспаления и не подвергается деформации.

*Ключевые слова:* периферический нерв, регенерация, макрофаги, хитозан, одностенные углеродные нанотрубки.

<sup>1</sup>*Yukina G. Yu.,* <sup>1</sup>*Sukhorukova E. G.,* <sup>2</sup>*Tagandurdyeva N. A.,* <sup>1</sup>*Polovnikov I. V.*

## COMPARATIVE MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF POLYLACTIDE CONDUITS WITH CHITOSAN GUIDE FIBERS COMBINED WITH DIFFERENT QUANTITY OF CARBON NANOTUBE USED FOR PERIPHERAL NERVES REGENERATION IN EXPERIMENT

<sup>1</sup>*Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation*

<sup>2</sup>*Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russian Federation*

---

*Abstract.* The aim of the work is to conduct a comparative morphological analysis of polylactide conduits with chitosan guide fibers combined with carbon nanotube used for peripheral nerves regeneration in rats experiment.

The methodology of the work consists in modeling the defect of the sciatic nerve of rats, replacement with polylactide conduits, filled with chitosan monofibers containing single-walled carbon nanotubes, analysis of slices of nerve and conduit.

The main results of the work showed that fibers with high concentration of carbon nanotube (2.5 mas.%) causes a significant chronic aseptic inflammation. Chitosan monofibers with a carbon nanotube concentration 0.05 mas.% are deformed by the compressive power of surrounding tissues. Whereas a composite fiber that includes 0.5 mas.% of carbon nanotubes is the most relevant option of compound of conduits with guide fibers because they do not cause a significant inflammation and they are not deformed.

*Keywords:* peripheral nerve, regeneration, macrophages, chitosan, single-wall carbon nanotubes.

### ВВЕДЕНИЕ

Одной из основных задач тканевой инженерии является разработка матриц на основе биосовместимых, биорезорбируемых полимеров, которые после имплантации стимулируют пролиферативную активность клеток, способствующую регенерации поврежденной ткани [1, 2]. Способность к пролиферации, росту и дифференцировке стволовых клеток стимулируется электрическими сигналами, участвующими в межклеточной коммуникации, что определяет способность тканей к регенерации [3]. Наиболее ярко это проявляется в процессах регенерации периферических нервов, костной, хрящевой и мышечной тканей [4, 5]. Важным направлением применения биорезорбируемых электропроводящих материалов является их использование в качестве основных элементов кондуитов — конструкций для стимуляции регенеративных процессов в периферических нервах [6]. При травмировании небольшого отрезка нерва поврежденный участок восстанавливают с помощью хирургического вмешательства без применения имплантатов или трансплантатов, однако при повреждении участка нерва, при котором прямое наложение швов без натяжения, отрицательно влияющего на регенерацию нерва, невозможно, применяются трансплантаты или имплантаты в виде направляющих трубчатых кондуитов, поддерживающих процесс реге-

нерации. Подобные трубчатые имплантаты способствуют ускорению регенерации нервов, направляя рост аксонов [7, 8]. В настоящее время активно ведется поиск модификаторов — наполнителей, направляющих регенерируемые аксоны и ускоряющих процесс регенерации. Несмотря на большое количество опубликованных в последние годы работ по получению и исследованию структуры и свойств биосовместимых электропроводящих полимеров и композиционных материалов, относительно мало морфологических работ, посвященных изучению *in vivo* реакции тканей периферических нервов и анализу степени их регенерации при использовании таких кондуитов.

Целью работы является сравнительный морфологический анализ полилактидных кондуитов с направляющими хитозановыми волокнами с различным содержанием углеродных нанотрубок, используемых для регенерации периферических нервов.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для экспериментов *in vivo* использовали 12 самцов белых крыс Wistar весом 200–250 г. Животных оперировали под общей анестезией (с помощью растворов Zoletil 100 (0,1 мл) и Rometar (20 мг/мл) — 0,0125 мл на 0,1 кг массы животного интраперитонеально). Дефект седалищного нерва крыс, вызванный вырезанием фрагмента длиной 0,5 см, был замещен полилактидными кондуитами длиной 1 см. Конduit наполняли хитозановыми моноволокнами (ХМВ), содержащими одностенные углеродные нанотрубки (ОСУНТ). Для получения пористых трубчатых матриц с внутренним диаметром 1,5 мм использовали полилактид PLLA Purasorb PL-10 (Corbion Purac, Нидерланды) (ПЛА). Трубчатую матрицу получали методом электроформования из раствора, концентрация которого составляла 16 мас.%. Полученную после электроформования нановолоконную матрицу из ПЛА термообработывали в фиксированном состоянии при  $t = 90\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 1 часа. Толщина стенки матрицы после термообработки составляла 350 мкм. Композиционные волокна (направляющие в трубчатой матрице) получали методом мокрого формования из смеси водной суспензии ОСУНТ с 4%-ным раствором хитозана в 2%-ном растворе уксусной кислоты [9]. Были приготовлены волокна, содержащие 0,05; 0,5; 2,5 % ОСУНТ от массы хитозана. Введение направляющих волокон в трубчатую матрицу осуществляли непосредственно перед хирургическим вмешательством. Животных разделили на 3 группы по 4 особи в каждой группе. В I группе использовали кондуиты с ХМВ с 0,05% ОСУНТ (ЭГ I), во II группе — кондуиты с ХМВ с 0,5% ОСУНТ (ЭГ II) и в III группе — кондуиты с ХМВ с 2,5% ОСУНТ (ЭГ III). При исследовании руководствовались приказом Минздрава России от 01.04.2016 №199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» и рекомендациями этического комитета ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова. Материал забирали через 3 месяца после оперативного вмешательства, при этом животных подвергали эвтаназии с использованием углекислого газа.

Для гистологического анализа фрагменты седалищного нерва с полилактидными кондуитами и ХМВ с различным содержанием ОСУНТ разрезали на проксимальную и дистальную части, которые фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине, обезвоживали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заливали в парафиновые блоки по стандартной гистологической методике. Да-

лее получали продольный срез проксимального участка нерва и кондуита и поперечный срез дистального участка кондуита и вросших нервных волокон. Срезы толщиной 5 мкм готовили с помощью микротомы Accu-Cut SRT 200 (Sakura, Япония), окрашивали гематоксилином и эозином и по методу Пикро Маллори (Биовитрум, Россия). Микроскопический анализ проводили с помощью светового микроскопа Nikon Eclipse E200 (Nikon, Япония) с использованием окуляра 10×, объективов 4, 10, 20, 40×. Запись цифровых изображений выполняли с помощью фотокамеры Nikon DS-Fi3 (Nikon, Япония).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первой экспериментальной группе (ЭГ I) ХМВ располагаются преимущественно вдоль одного края матрицы, нервные волокна прорастают вдоль другого края матрицы. Соединительная ткань в полости матрицы пронизана полнокровными сосудами, ее клеточный состав представлен фибробластами, немногочисленными макрофагами и лимфоцитами. Вокруг ХМВ сформирована выраженная соединительнотканная капсула (рис. 1). Вдоль внутренней стенки матрицы располагается плотное кольцо из гигантских многоядерных клеток инородных тел (ГМКИТ). Стенка матрицы пронизана немногочисленными коллагеновыми волокнами, фибробластами и макрофагами. Снаружи матрицы формируется соединительнотканная капсула с клетками воспалительного ряда и свободно лежащими эритроцитами.

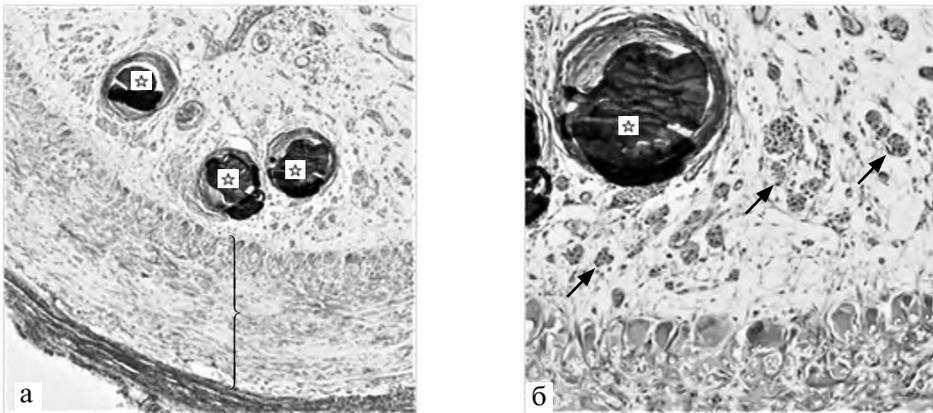
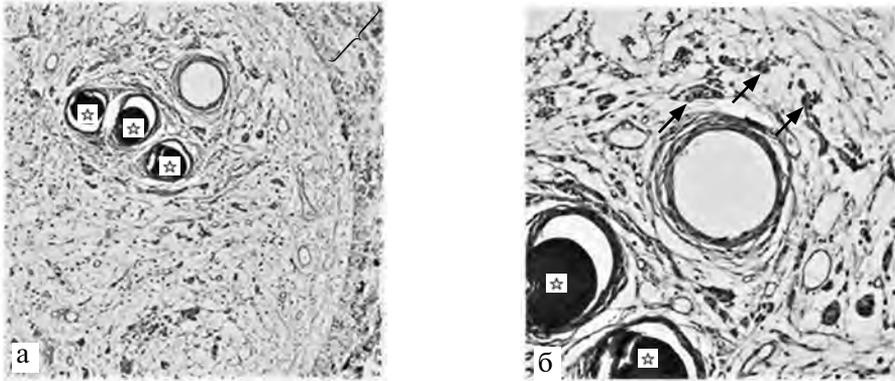


Рис. 1. Поперечные срезы дистального участка ПЛА матрицы с ХМВ с 0,05% ОСУНТ. Фигурная скобка — ПЛА-матрица. Звездочка — хитозановое монофиламентное волокно. Стрелка — прорастающие нервные волокна. Окраска по методу Пикро Маллори (а, б). Об. ×4 (а) и ×10 (б), ок. ×10

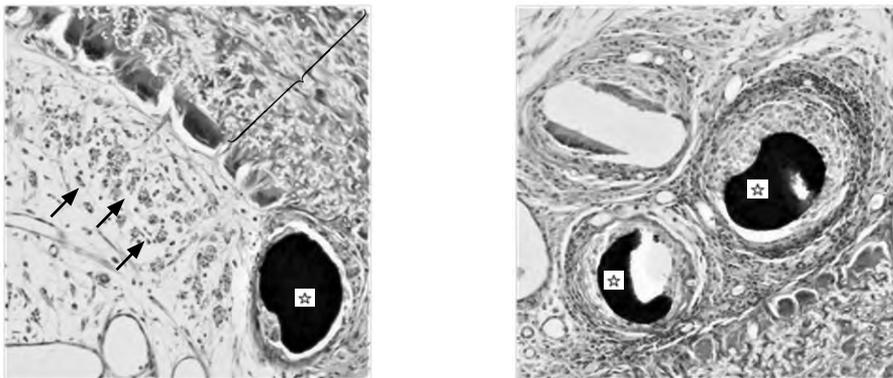
Во второй экспериментальной группе (ЭГ II) в полости матрицы располагаются единичные тонкие пучки нервных волокон, прорастающие сквозь слабо выраженную соединительную ткань, пронизанную многочисленными тонкостенными сосудами. ХМВ располагаются ближе к краю матрицы и окружены соединительнотканной капсулой, менее выраженной, чем вокруг ХМВ в ЭГ I (рис. 2). Прорастающие нервные волокна располагаются дискретно по всей полости матрицы. Вдоль внутренней стенки матрицы плотным кольцом располага-

ются ГМКИТ. Толща матрицы умеренно пронизана коллагеновыми волокнами, фибробластами и макрофагами. Снаружи матрица покрыта тонкой соединительнотканной капсулой.



*Рис. 2.* Поперечные срезы дистального участка ПЛА матрицы с ХМВ с 0,5% ОСУНТ. Фигурная скобка — ПЛА-матрица. Звездочка — монофиламентное волокно. Стрелка — прорастающие нервные волокна. Окраска гематоксилином и эозином (а, б). Об.  $\times 4$  (а) и  $\times 10$  (б), ок.  $\times 10$

В третьей экспериментальной группе (ЭГ III) в полости матрицы располагаются единичные тонкие пучки нервных волокон, прорастающие сквозь слабо выраженную соединительную ткань, пронизанную многочисленными запустевшими сосудами. ХМВ располагаются у самого края матрицы и окружены телами ГМКИТ и выраженной рыхло лежащей соединительнотканной капсулой с многочисленными макрофагами и лейкоцитами (*рис. 3*). Прорастающие нервные волокна располагаются дискретно по всей полости матрицы. На внутренней стороне стенки матрицы плотным кольцом располагаются ГМКИТ. Между волокнами матрицы визуализируется умеренное число коллагеновых волокон. Снаружи матрица покрыта соединительнотканной капсулой.



*Рис. 3.* Поперечные срезы дистального участка ПЛА матрицы с ХМВ с 2,5% ОСУНТ. Фигурная скобка — ПЛА-матрица. Звездочка — монофиламентное волокно. Стрелка — прорастающие нервные волокна. Окраска по методу Пикро Маллори (а, б). Об.  $\times 4$  (а) и  $\times 10$  (б), ок.  $\times 10$

Морфологический анализ показал, что ХМВ локализируются у края матрицы и вокруг них формируется соединительнотканная капсула. Вдоль внутренней стенки полилактидной матрицы плотным кольцом располагаются ГМКТ, а в толще стенки между полилактидными моноволокнами определяются фибробласты, макрофаги и умеренное количество коллагеновых волокон, что свидетельствует о процессах биорезорбции матрицы [10]. Полость полилактидной матрицы заполнена соединительной тканью, между волокнами которой визуализируются прорастающие нервные волокна. Снаружи матрица покрыта соединительнотканной капсулой без признаков выраженной воспалительной реакции.

Соединительная ткань, заполняющая просвет матрицы, пронизана многочисленными тонкостенными сосудами. При этом активного процесса биорезорбции ХМВ не наблюдается. Следует отметить, что ХМВ с содержанием ОСУНТ 0,05 мас.% при невыраженной воспалительной реакции деформируются под действием компрессионных сил со стороны окружающих тканей. При имплантации ХМВ с 0,5 мас.% ОСУНТ наблюдается отсутствие признаков острой воспалительной реакции на моноволокна и незначительно выраженная соединительнотканная капсула вокруг них. В то время как при имплантации ХМВ с содержанием ОСУНТ 2,5 мас.% наблюдается значительно большее число лейкоцитов, макрофагов и ГМКИТ вокруг них, что свидетельствует о выраженном хроническом асептическом воспалении.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что присутствие в композиционном волокне высокой концентрации (2,5 мас.%) углеродных нанотрубок вызывает выраженное хроническое асептическое воспаление и при этом не приводит к значительному увеличению прорастающих нервных волокон.

Показано, что при имплантации ХМВ с содержанием ОСУНТ 0,05 мас.% они деформируются под действием компрессионных сил со стороны окружающих тканей, что приводит к образованию плотной соединительнотканной капсулы вокруг волокна.

Эксперимент показал, что наиболее удачным вариантом направляющих волокон в кондуите является композиционное волокно с содержанием 0,5 мас.% ОСУНТ, вызывающее незначительное асептическое воспаление, способное противостоять компрессионным силам со стороны окружающих тканей.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Schmidt C. E., Leach J. B. Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2003; 5:293–347. DOI: 10.1146/annurev.biomed.5.011303.120731
2. Gunatillake P. A., Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur. Cell. Mater.* 2003; 5:1–16. DOI: 10.22203/ecm.v005a01
3. Stewart E. M., Kobayashi N. R., Higgins M. J., et al. Electrical stimulation using conductive polymer polypyrrole promotes differentiation of human neural stem cells: a biocompatible platform for translational neural tissue engineering. *Tissue Eng. Part. C. Methods.* 2015; 21(4):385–393. DOI: 10.1089/ten.TEC.2014.0338

4. *Dash T. K., Konkimalla V. B.* Poly-L-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A Review. *J. Control. Release.* 2012; 158(1):15–33. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.09.064
5. *Balint R., Cassidy N. J., Cartmell S. H.* Conductive polymers: towards a smart biomaterial for tissue engineering. *Acta Biomater.* 2014; 10(6):2341–2353. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.02.015
6. *Walker J. L., Santoro M.* Processing and production of bioresorbable polymer scaffolds for tissue engineering. In: *Bioresorbable Polymers for Biomedical Applications.* Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017. P. 181–203.
7. *Jing W., Ao Q., Wang, L., et al.* Constructing conductive conduit with conductive fibrous infilling for peripheral nerve regeneration. *Chem. Eng. J.* 2018; 345:566–577.
8. *Pooshidani Y., Zoghi N., Rajabi M., et al.* Fabrication and evaluation of porous and conductive nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2021; 32(4):46. DOI: 10.1007/s10856-021-06519-5
9. *Маевская Е. Н., Дресвянина Е. Н., Юденко А. Н., Юдин В. Е.* Механические свойства хитозановых нитей, полученных при различных условиях их формирования по коагуляционному методу // *Журнал технической физики.* 2018. Т. 88. № 9. С. 1366–1370.
10. *Popryadukhin P. V., Popov G. I., Yukina G. Yu., et al.* Tissue-engineered vascular graft of small diameter based on electrospun polylactide microfibers. *International Journal of Biomaterials.* 2017. Article ID 9034186. DOI: org/10.1155/2017/9034186