

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЯДЕРНЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ «МИФИ»

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
«МОСКОВСКИЙ ИНСТИТУТ ЭЛЕКТРОННОЙ ТЕХНИКИ»

*На правах рукописи*

**СОРОКВАША ИЛЬЯ НИКОЛАЕВИЧ**

**Экспериментальное обоснование сочетанного использования  
композиций наночастиц углерода и церия при лазерном воздействии для  
хирургического восстановления целостности мягких тканей**

1.5.2. Биофизика

3.1.9. Хирургия

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор технических наук, доцент

Герасименко Александр Юрьевич

доктор медицинских наук, профессор

Блинова Екатерина Валериевна

Москва – 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1 ПОЛУЧЕНИЕ, БИОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ В КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЦЕРИЯ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР) .....	18
1.1 Физические и химические подходы к синтезу НОЦ.....	18
1.1.1 Способ получения НОЦ шаровым фрезерованием .....	19
1.1.2 Получение наночастиц диоксида церия методом осаждения .....	20
1.1.3 Гидротермальный способ получения НОЦ.....	22
1.1.4 Способ образования золя – геля как источник получения НОЦ.....	23
1.1.5 Метод отжига раствора как эффективный способ получения частиц диоксида церия.....	24
1.1.6 Сонохимический метод получения НОЦ с заданными свойствами	26
1.1.7 Микроэмульсионный метод получения НОЦ.....	27
1.2 Биофизические свойства наночастиц, содержащих диоксид церия: применение в хирургии .....	28
1.2.1 Противовоспалительные и антиоксидантные свойства наночастиц диоксида церия.....	29
1.2.2 Противомикробная активность НОЦ.....	32
1.2.3 Влияние НОЦ на процессы неоангиогенеза.....	35
1.3 Формы применения НОЦ в хирургической практике для лечения кожных ран .....	38
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	43
2.1 Планирование диссертационного исследования .....	45
2.2 Соответствие работы принципам биомедицинской этики. Стандартные операционные процедуры .....	47
2.3 Метод получения наночастиц диоксида церия .....	50

2.4 Метод лазерного соединения живых тканей. Принципиальная схема и состав лазерной установки. Качественная и количественная характеристика биоприпоя .....	50
2.4.1 Качественная и количественная характеристика биологического состава .....	54
2.5 Методы исследования <i>in vitro</i> .....	55
2.5.1 Методы исследования цитотоксических свойств НОЦ и БС в культуре клеток фибробластов .....	55
2.5.2 Методы определения активности супероксиддисмутазы (СОД) в культуре клеток фибробластов .....	56
2.5.3 Методы исследования цитотоксических свойств НОЦ в культуре эндотелиальных клеток .....	56
2.5.4 Метод определения внутриклеточных реактивных форм кислорода в эндотелиоцитах.....	57
2.5.5 Метод определения биомеханических свойств лазерного соединения фрагментов кожи и кровеносного сосуда <i>in vitro</i> .....	58
2.5.6 Метод определения проницаемости мембран фибробластов для наночастиц диоксида церия различного размера .....	59
2.6 Методы экспериментально-хирургического исследования .....	60
2.6.1 Лабораторные животные .....	60
2.6.2 Метод проведения лазерного соединения кожи с помощью биологического состава на фоне обработки области шва НОЦ .....	63
2.6.3 Метод проведения лазерного соединения кровеносного сосуда лабораторного кролика с помощью БС на основе углеродных нанотрубок на фоне обработки области шва НОЦ.....	65
2.7 Морфологические и иммуногистохимические методы исследования..	67
2.8 Изучение скорости кровотока при лазерном соединении сосуда с биологическим составом на основе наноуглеродных трубок и использования НОЦ.....	68

2.9 Статистический анализ полученных результатов .....	68
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	70
ГЛАВА 3 ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ КЛЕТОК.....	70
3.1 Проницаемость мембран фибробластов для наночастиц диоксида церия в зависимости от размера рабочей фракции.....	70
3.2 Токсические эффекты наночастиц диоксида церия в культуре клеток фибробластов.....	73
3.3 Токсические эффекты БС при лазерном воздействии на культуру клеток фибробластов.....	74
3.4 Влияние НОЦ на внутриклеточную активность супероксиддисмутазы фибробластов.....	76
3.5 Токсические эффекты наночастиц диоксида церия в культуре клеток эндотелиоцитов эмбриональной пупочной вены.....	77
3.6 Влияние различных концентраций НОЦ на продукцию внутриклеточных реактивных форм кислорода в эндотелиоцитах человека.....	79
3.7 Влияние различных концентраций НОЦ на продукцию оксида азота эндотелиоцитами человека .....	82
ГЛАВА 4 ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАННОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТАВА И НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЦЕЛОСТНОСТИ КОЖНОГО И СОСУДИСТОГО ДЕФЕКТА ПРИ ЛАЗЕРНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ.....	84
4.1 Эффективность сочетанного использования лазерного излучения с БС и НОЦ в восстановлении целостности кожной раны лабораторной крысы ..	84
4.2 Тканевые и клеточные реакции при использовании лазерного излучения с БС и узлового соединения краев кожной раны на фоне топического применения наночастиц диоксида церия.....	87

4.5 Эффективность сочетанного использования БС и НОЦ в восстановлении целостности сосудистой стенки лабораторного кролика .....	96
ГЛАВА 5 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	102
5.1 Итоги выполнения диссертационного исследования.....	108
5.2 Перспективы дальнейшего развития темы диссертационного исследования.....	110
ВЫВОДЫ.....	111
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	113
СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ.....	114
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	115

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность работы**

Проблема лечения острых и хронических ран мягких тканей с повреждением крупных сосудов сохраняет чрезвычайную актуальность на фоне возрастающего бытового травматизма, в том числе вследствие старения населения и накопления в популяции хронических заболеваний, распространения локальных вооружённых конфликтов с применением вооружения с большой поражающей силой, природных и техногенных катастроф.

Кожные раны представляют собой одну из ведущих медико-социальных и клинических проблем [1, 2]. Они могут быть разделены на две большие группы, объединенные как особенностями клинического течения, так и патофизиологическими, организационными обстоятельствами: острые и хронические. Острые кожные раны, вызванные, как правило, ожоговым или механическим повреждением, хирургическим вмешательством, склонны к более быстрому заживлению. Напротив, хронические раны, если и заживают, то этот процесс растягивается на месяцы, сопровождается высокой частотой инфекционно-воспалительных осложнений и грубым рубцеванием. Часто хронические раны являются следствием некачественного лечения острых, особенно при наличии таких сопутствующих состояний, как сахарный диабет, болезни периферических сосудов, пожилой и старческий возраст и др. [3, 4]. Все это обуславливает высокую социально-экономическую и финансовую нагрузку как на систему здравоохранения, так и на общество в целом [4].

«Золотым стандартом» лечения особенно обширных повреждений все еще остается аутотрансплантация участков кожи [5, 6]. Вместе с тем, достигнутое за последние годы впечатляющее технологическое развитие медицинской отрасли в области биоинженерии и регенеративной медицины предложило целый ряд новых и перспективных подходов закрытию дефектов

кожи [7]. Эти подходы учитывают меж- и внутриклеточные особенности кооперации в процессе формирования и заживления тканевых дефектов, в том числе роль сигнальных молекул и путей метаболической активации [8]. В целом, методы биоинженерии и регенеративной медицины предлагают применение новых биоматериалов, стволовых клеток, факторов роста, и других средств для активации закрытия тканевых дефектов. В последние годы в научной периодике появились многочисленные исследования методов применения тканеинженерных и клеточноинженерных конструктов [9-11]. Одной из наиболее перспективных технологий выступает использование лазера в медицинских целях, в том числе для безопасного и физиологичного соединения тканей, таких как кожа и кровеносные сосуды.

Наряду с достижениями в клеточных технологиях большие перспективы открываются при использовании нанотехнологий в регенеративной медицине, в том числе ранозаживлении. Уникальные биологические свойства наноматериалов, в частности, широкие колебания величины в наноразмерном диапазоне, высокое соотношение площади поверхности к объему частиц, различная задаваемая геометрия позволяют рассматривать наноматериалы с точки зрения рассматриваемой клинической имплементации. Так, была показана способность наноматериалов стимулировать клеточную пролиферацию, ограничивать воспалительные реакции, управлять миграционной активностью отдельных популяций клеток [12-14].

### **Степень разработанности темы исследования**

В России и мире последние годы ознаменованы повышением внимания ученых и представителей практической медицины к биологическим свойствам наночастиц оксида церия (НОЦ). Многочисленные публикации описывают различные подходы к биосинтезу наночастиц диоксида церия с использованием микроорганизмов, растений, других живых продуктов [15, 17]. В то же время работ, касающихся применения НОЦ для ранозаживления, все еще крайне мало. В ходе анализа, не было обнаружено опубликованных

исследований, касающихся применения наночастиц церия в составе биологических припоев в лазерных способах соединения тканей.

Вместе с тем, известно, что наночастицы диоксида церия обладают уникальной совокупностью свойств, среди которых следует назвать противовоспалительную, противомикробную, активность, способность НОЦ стимулировать образование новых сосудов и сдерживать обороты перекисного окисления липидов.

В нашей лаборатории М.А. Мироновым, Д.В. Пахомовым и А.Б.С. Алхататнех получены чрезвычайно ценные результаты по ранозаживляющей активности лекарственных форм, содержащих НОЦ, на моделях диабетических ран у животных с сахарным диабетом 1 и 2 типов, а также инфицированных и ожоговых ран [17-19]. В своей фундаментальной работе А.И. Соколов показал возможность *in vivo* использования лазерной пайки у лабораторных животных [20].

Эти результаты позволили нам выдвинуть принципиально новую научную идею об эффективности применения НОЦ для повышения эффективности лазерных технологий соединения тканей, что определяет актуальность настоящей диссертации.

### **Цель работы**

На основании комплексного изучения биологических свойств топического применения жидких сред, содержащих наночастицы углерода и церия, в сочетании с лазерным излучением обосновать возможность хирургического соединения дефектов кожи и сосудов в эксперименте.

### **Задачи исследования**

1. Определить цитотоксические свойства наночастиц диоксида церия, полученных методом лазерной абляции, и биологического состава, содержащего сывороточный альбумин 25 масс.%, индоцианин зелёный 0,1 масс.%, одностенные углеродные нанотрубки 0,1 масс.%, воду, в диапазоне

концентраций от 0,001 до 100,0 мг/мл, в культурах фибробластов и клеток эндотелия пупочной эмбриональной вены человека.

2. Определить проникающую способность наночастиц диоксида церия, полученных методом лазерной абляции, через клеточную мембрану в культурах фибробластов, в зависимости от их размера.

3. Изучить зависимость внутриклеточной продукции реактивных форм кислорода – пероксида водорода и супероксид-аниона, активности фермента-антиоксиданта супероксиддисмутазы, а также функциональной активности эндотелиоцитов, – от концентрации наночастиц диоксида церия в культурах фибробластов и клеток эндотелия пупочной эмбриональной вены человека.

4. Определить биомеханические характеристики лазерного соединения кожи и брюшной аорты кролика с использованием биологического состава, содержащего сывороточный альбумин 25 масс.%, индоцианин зелёный 0,1 масс.%, одностенные углеродные нанотрубки 0,1 масс.%, воду при топическом нанесении на область повреждения наночастиц диоксида церия.

5. Оценить динамику, активность воспалительного и регенеративного процессов в области раневого дефекта при комплексном использовании биологического состава и наночастиц диоксида церия при лазерном соединении кожи крыс.

6. Оценить в динамике эффективность закрытия полнослойного дефекта участка брюшного отдела аорты лабораторного кролика при помощи лазерного соединения с биологическим составом на основе углеродных нанотрубок и топического применения НОЦ на область соединения.

### **Научная новизна**

Впервые в отечественной науке проведено комплексное изучение биофизических свойств и применимости наночастиц диоксида церия в комплексе с лазерным излучением и биологическим составом на основе углеродных нанотрубок для хирургического соединения тканей – кожи и артериального кровеносного сосуда.

Наночастицы диоксида церия проникают внутрь фибробластов человека: мелкие фракции наночастиц размером до 15 нм не требуют для попадания внутрь клетки активного механизма, тогда как для транспорта крупных фракций НОЦ в фибробласты необходима активации мембрано-зависимого транспорта – эндоцитоза.

В опытах *in vitro*, посвященных изучению влияния различных концентраций наночастиц диоксида церия и биологического состава для лазерного соединения на выживаемость и функциональную активность основных популяций клеток – фибробластов и эндотелиоцитов, вовлеченных в регенерацию кожной раны и сосудистого дефекта, были получены следующие принципиально новые данные: НОЦ не обладают цитотоксическими свойствами в широком диапазоне концентраций от 0,001 до 1,0 мг/мл, снижение выживаемости клеточных популяций наблюдается при увеличении присутствия наночастиц диоксида церия в среде культивирования до 10,0 – для эндотелиоцитов и 100,0 мг/мл – для фибробластов. Использование лазерного излучения на жидкие среды на основе углеродных нанотрубок в культуре клеток фибробластов не только не снижает количество живых фибробластов, но и приводит к их активной пролиферации к 2 и 3 суткам.

Рост концентрации НОЦ сопровождается повышением активности свободнорадикальных реакций и продукции пероксида водорода и супероксид-аниона, подавлением функциональной активности эндотелиоцитов (в концентрации 100,0 мг/мл), что приводит к компенсаторному росту экспрессии фермента – антиоксиданта СОД, сдерживающего негативные последствия внутриклеточной стресс-реакции.

Экспериментально-хирургическое изучение качества тканевого соединения на моделях кожной раны лабораторных крыс выявило, что использование 1% НОЦ приводит к повышению прочности послеоперационного рубца при узловом соединении, а сочетанное применение лазерного излучения с БС и локального воздействия НОЦ на область лазерного соединения, по прочности на разрыв сопоставимо с узловым швом на 21 сутки наблюдения. При

этом патоморфологически в области соединения воспалительный компонент выражен в меньшей степени, а явления регенерации и миграции прокератиноцитов начинаются раньше и более активно, чем в случае использования БС без локального применения НОЦ.

Лазерное соединение полнослойного дефекта брюшной аорты с биологическим составом как с НОЦ, так и без него не приводит к тромбообразованию, деформации и сужению просвета сосуда, увеличению скорости кровотока в сравнении с узловым швом. Топическое использование НОЦ позволяет снизить воспаление в области сосудистого соединения и развитие спаечного процесса в области оперативного вмешательства.

### **Научно-практическая значимость работы**

Методом лазерной абляции наработаны наночастицы диоксида церия с размером частиц от 10 до 15 нм; на их основе получена жидкая топическая лекарственная форма 1% спрей.

Определен диапазон безопасных нетоксичных концентраций наночастиц диоксида церия, полученных методом гидротермального синтеза, для клеточных популяций фибробластов и эндотелиоцитов человека. Показано, что появление цитотоксичности НОЦ в концентрациях свыше 10,0 мг/мл обусловлено ростом продукции реактивных форм кислорода.

Для безопасного и эффективного соединения неосложненных дефектов кожи и непроникающих повреждений кровеносных сосудов может быть применен альтернативный узловому сшиванию метод лазерного шва с применением биологического состава на основе углеродных нанторубок, альбумина и коллагена с топическим применением на область соединения наночастиц диоксида церия.

### **Методология и методы исследования**

При планировании настоящего диссертационного исследования мы основывались на принципах комплексности методических подходов, единстве

замысла и методов его реализации, в связи с чем диссертационная работа методологически включала два больших раздела – *in vitro* исследование в культурах клеток человека и на тканях лабораторных животных, и *in vivo* исследование на лабораторных животных двух видов – лабораторных крысах и кроликах.

Этапность реализации плана работы состояла из инициальной глубокой теоретической проработки научной задачи, реферирования литературных источников, подготовки обзора, выбора адекватных поставленным задачам методов исследования, составления базы данных исследования на платформе Excel.

На доэкспериментальном этапе была разработана и осуществлена лабораторная технология получения наночастиц на основе диоксида церия методом лазерной абляции, проведена наработка субстанции в количествах, достаточных для проведения исследовательской работы, а также создан лабораторный образец топической лекарственной формы НОЦ в виде 1% спрея, проведена правовая защита способа получения рассматриваемого вида НОЦ в виде получения патентов Российской Федерации [130,131].

Экспериментально-биофизический раздел исследования был выполнен *in vitro*. Его целесообразность была продиктована тем, что НОЦ были синтезированы новым способом, что требовало тщательного и всестороннего изучения токсических свойств наночастиц диоксида церия в культурах тех клеток, которые преимущественно вовлекаются в репарационный процесс при сшивании сосудов и кожи – эндотелиоцитов и фибробластов. Цитотоксичность оценивали в диапазоне концентраций НОЦ от 0,001 до 100,0 мг/мл при помощи МТТ-теста. Регистрацию внутриклеточной концентрации перекиси водорода проводили в реакции с дихлородигидрофлюоресцеина диацетатом,  $O_2^{\cdot -}$  – с дигидроэтидием, с последующей фотометрической регистрацией продукта реакции. Активность супероксиддисмутазы (СОД) в фибробластах оценивали с помощью SOD assay kit.

При помощи флюоресцентной и конфокальной сканирующей микроскопии определили способность трансмембранного перемещения меченных флюоресцентной меткой НОЦ различного размера в культуре фибробластов.

На экспериментально-хирургическом этапе работы изучили эффективность лазерного шва кожной и сосудистой раны с использованием биологического состава на основе углеродных нанотрубок в комбинации с топическим нанесением жидкой спрей-формы НОЦ на область соединения краев раны. Для этого провели серии экспериментальных хирургических операций на лабораторных крысах и кроликах. Изучали скорость и результаты заживления раны с помощью морфологических методов исследования, биомеханические свойства соединения кожи, герметичность и полноценность соединения кровеносного сосуда, скорость кровотока с использованием доплерографии, выживаемость животных. Активность воспалительной и регенеративной реакций оценивали морфологически, в том числе методами иммуногистохимии (ИГХ). На завершающем этапе работы провели анализ полученных результатов, их описание, статистическую обработку с применением методов описательной и сравнительной статистики, сформулировали выводы, положения и практические рекомендации.

### **Связь диссертации с основными научными темами. Внедрение результатов работы**

Выполнение настоящей диссертационной работы было частично поддержано грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации НШ-843.2022.3, федеральной программой «Приоритет – 2030» ФГАОУ ВО «НИЯУ МИФИ», крупным научным проектом Минобрнауки России (Соглашение № 075-15-2024-555 от 25.04.2024 г.) НИУ МИЭТ, проектом FSMR-2024-0003 НИУ МИЭТ.

Основные положения и выводы настоящей диссертационной работы используются в учебной работе кафедры фундаментальной медицины и

медицинской физики ИФИБ ФГАОУ ВО «НИЯУ МИФИ», оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), а также используются в работе научного семинара лаборатории молекулярно-клеточных технологий и экспериментальных исследований ИФИБ НИЯУ МИФИ и научно-исследовательской и учебной работе лаборатории «Биомедицинские нанотехнологии Института биомедицинских систем НИУ МИЭТ (Москва).

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. НОЦ проникают внутрь клетки, причем наибольшей проникающей способностью обладают наночастицы церия размером от 15 до 100 нм. НОЦ не обладают цитотоксическими свойствами в диапазоне концентраций от 0,001 до 1,0 мг/мл, снижение выживаемости клеточных популяций наблюдается при увеличении присутствия наночастиц диоксида церия в среде культивирования до 10,0 мг/мл – для эндотелиоцитов и 100,0 мг/мл – для фибробластов. Токсический эффект НОЦ на клетки проявляется повышением активности свободнорадикальных реакций и продукции пероксида водорода и  $O_2^-$ , подавлению функциональной активности эндотелиоцитов (в концентрации 100,0 мг/мл), что приводит к компенсаторному росту экспрессии фермента – антиоксиданта СОД, сдерживающего негативные последствия внутриклеточной стресс-реакции.

2. Использование биологического состава, содержащего углеродные нанотрубки в концентрации 0,1 масс.% при лазерном воздействии в комбинации с 1% НОЦ приводит к повышению прочности соединения кожи к 21 суткам, сопоставимой со значениями показателя узлового шва. При этом, топическое применение спрея НОЦ повышает прочность традиционного узлового шва кожи. В области лазерного соединения НОЦ приводит к сдерживанию воспалительно-деструктивных изменений тканей, активизирует

клеточную регенерацию, а также сопровождается формированием более плотного контакта краев раны, повышает гомогенность шовного соединения.

3. В условиях *in vivo* лазерное соединение стенки брюшной аорты кролика с использованием биологического состава, содержащего углеродные нанотрубки в комбинации с 1% НОЦ обеспечивает формирование надежного тканевого соединения, не деформирующего просвет сосуда и не нарушающему гемодинамику в сосудах, но уступающего по прочности интактному сосуду. Использование 1 % НОЦ снижает воспаление в области сосудистого соединения и развитие спаечного процесса в области оперативного вмешательства, не приводит к термическому повреждению тканей, не вызывает тромбообразования.

### **Степень достоверности**

Достоверность полученных результатов определяется совокупностью как методологических, так и организационных обстоятельств. Первые включают оптимальный выбор объектов исследования, использование описанных в литературе подходов к получению наночастиц диоксида церия и воспроизведению модельных патологических процессов, применение культур клеток, условий их культивирования и оценки функционального состояния общепринятыми методами, выполнение экспериментально-хирургических интервенций в условиях, соответствующих клинической практике, формирование групп и экспериментальных серий, позволяющих получить репрезентативные данные и осуществить сравнительный анализ. Организационная основа достоверности связана с тщательно выверенным планом проведения исследования, регистрацией всех событий исследования в базе данных, корректно проведенным анализом полученных результатов.

### **Апробация диссертационной работы**

Апробация диссертационной работы проведена на совместном расширенном межучрежденческом заседании кафедры фундаментальной

медицины №99, лаборатории бионанофотоники, лаборатории молекулярно-клеточных технологий и экспериментальных исследований инженерно-физического института биомедицины федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», лаборатории «Биомедицинские нанотехнологии» федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский университет «Московский институт электронной техники», протокол №10 от 10.10.2025 г.

Результаты проведенного диссертационного исследования обсуждались и докладывались на многочисленных всероссийских конференциях и конгрессах с международным участием, а именно: на Международном конгрессе «Здоровье и образование в XXI веке» (Москва, 2024, 2025), XIII Российской научно-практической конференции с международным участием студентов и молодых ученых «Авиценна-2022» (Новосибирск, 2022), 3-й Ассамблее детской хирургии головы и шеи (Светлогорск, 2025), XII Съезде хирургов России (Москва, 2025), конференции Нанобиофотоника XIII международного Симпозиума по оптике и биофотонике (Саратов, 2025).

### **Личный вклад автора**

Автор самостоятельно выдвинул научную гипотезу и сформулировал исследовательский вопрос, легший в основу настоящего диссертационного исследования. Автор лично спланировал работу, разработал первичные регистрационные формы событий исследования. Автор включенно участвовал в выполнении исследования цитотоксичности НОЦ в культурах клеток, а также в изучении функциональной активности фибробластов и эндотелиоцитов в зависимости от концентрации наночастиц диоксида церия. Лично автором проведены все исследования на изолированных фрагментах кожи и кровеносных сосудов. Автор самостоятельно провел все экспериментально-хирургические операции на лабораторных крысах и кроликах. При проведении

морфологического и иммуногистохимического исследований автор непосредственно участвовал в подготовке препаратов, их окрашивании, морфологической верификации. Автор самостоятельно систематизировал полученные данные, выявил закономерности и провел анализ результатов. Диссертант принимал самое деятельное участие в написании публикаций и апробации данных на конференциях различного уровня. Автор самостоятельно подготовил рукопись диссертации и автореферат.

### **Публикации по теме диссертационной работы**

По теме настоящей диссертационной работы автор опубликовал в соавторстве 11 научных работ, из которых 7 полнотекстовых статей опубликованы в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, в том числе 5 – в журналах, индексируемых международными цитатно-аналитическими системами Scopus, получено 2 патента на изобретение Российской Федерации.

### **Объём и структура работы**

Диссертация оформлена по традиционному плану и состоит из следующих разделов: введение; глава 1 – литературный обзор; глава 2 – материал и методы исследования; главы 3 и 4 включены в раздел «Результаты собственных исследований»; глава 5 «Заключение» обобщает и критически анализирует полученные научно-практические результаты, намечает перспективы дальнейшего развития темы исследования; выводы; практические рекомендации; список сокращений и условных обозначений; библиографический список.

Диссертация изложена на 130 страницах компьютерного текста, иллюстрирована двадцатью четырьмя рисунками и семью таблицами. Библиографический список содержит выходные данные 132 работ, из которых 12 работ отечественных и 120 – зарубежных авторов.

# **ГЛАВА 1 ПОЛУЧЕНИЕ, БИОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ В КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЦЕРИЯ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)**

Наночастицы оксида церия (НОЦ) в настоящее время представляют собой многообещающего кандидата для биомедицинского применения. Это связано с уникальным набором биологических, биохимических и биофизических свойств, присущих НОЦ, включающих: антиоксидантные, противовоспалительные, ангиогенные и противомикробные свойства. Поскольку восстановление целостности тканей при ранах кожи, сосудистой патологии и других состояниях представляют собой значимую клиническую и медико-социальную проблему, фокус внимания исследователей в последние годы все чаще обращается к НОЦ. Недавние исследования показали, что локальное и системное применение НОЦ вызывает репаративный эффект вследствие активации неоангиогенеза, редукции воспалительной реакции, а также вследствие выраженных противомикробных свойств. Также было показано, что тканеинженерные конструкции с включением в их структуру наночастиц диоксида церия позволяют реализовывать каркасные и регенеративные задачи в пластической и реконструктивной хирургии. В связи с этим в рамках настоящего литературного обзора мы рассмотрим вопросы, связанные как с современными достижениями в области получения НОЦ, так и с имеющимися в научной периодике данными об их фармакологических свойствах, токсичности и опыте применения в реконструктивной и пластической хирургии.

## **1.1 Физические и химические подходы к синтезу НОЦ**

В настоящее время известны несколько физических и химических подходов к лабораторному и промышленному получению наночастиц диоксида

церия, по своим характеристикам пригодного для экспериментальных исследований и клинического применения.

### **1.1.1 Способ получения НОЦ шаровым фрезерованием**

Шаровое фрезерование представляет собой довольно простой механический способ, который обычно применяется для дробления фрагментов твердых тел и уменьшения их размера. Для реализации этого подхода обычно применяют цилиндрическую полуемкость, частично заполненную шариками, которые могут вращаться вокруг своей оси. Шарики могут быть изготовлены из различных материалов в зависимости от решаемых технических задач, например, из резины, нержавеющей стали или иметь керамическое происхождение. В основе такого процесса фрезерования – энергия, выделяемая при контакте шариков и порошка [21, 22]. Достоинствами описанного метода являются его экономичность, быстрота, сравнительная простота, экологичность и хорошая воспроизводимость.

В одном из недавно проведенных исследований авторы сообщили о синтезе наночастиц диоксида церия с использованием метода высокоэнергетического шарового фрезерования. В результате авторам удалось получить практически сферические НОЦ со средним размером около 10 нм [23].

В другом исследовании авторы для изготовления частиц диоксида кремния применили механохимический процесс. Его суть состояла в том, что на первом этапе производили смешивание карбогидрата трехвалентного церия с едким натром в соотношении один к четырем. После чего при комнатной температуре в течение суток измельчали. Полученный порошок отмывали в этиловом спирте и дистиллированной воде, высушивали в течение суток, после чего прокаливали на протяжении 5 часов при температурах от 100 до 800°C. Авторы продемонстрировали в своей работе увеличение среднего размера наночастиц диоксида кремния с 5 до 20 нм при повышении

температуры прокаливания с 350 до 800°C. При этом следует подчеркнуть, что при высоких температурах происходит более эффективная кристаллизация порошка НОЦ, однако их размер также повышается вследствие активации роста гранул (эффект гранулирования порошка при высоких температурах) [24].

Описанный метод, безусловно, обладает целым рядом уже упомянутых преимуществ, однако не лишен и недостатков. К ним можно отнести высокий риск инфекционного загрязнения НОЦ, свойство наночастиц к слипанию и формированию крупных структур, образование частиц разных размеров, и, наконец, довольно большое время, которое приходится затрачивать на сам процесс производства и последующую отмывку полученных НОЦ [21].

### **1.1.2 Получение наночастиц диоксида церия методом осаждения**

Вторым наиболее часто используемым методом синтеза наночастиц диоксида церия является метод осаждения. При этом способе получения НОЦ исходным источником церия выступает гексагидрат нитрата церия, а реактивной основой для метода могут быть различные вещества – раствор аммония, карбонат калия, карбонат аммония, и, наконец, едкий натр [25-27].

Вместе с тем, варианты такого способа получения могут довольно широко варьировать в зависимости от выбора как первичного источника церия, так и реактивной основы. В частности, в одном исследовании авторы получили НОЦ со средним размером частиц 8 нм путем осаждения церия нитрата аммония в мочевины [28]. В другой работе НОЦ были синтезированы путем гомогенного осаждения в разведенном растворе аммония разведенного в дважды дистиллированной воде гексагидрата нитрата церия. При этом преципитация проводилась при закапывании в церий-содержащий раствор раствора аммония. Водорастворимые фракции полученного продукта были удалены промыванием в деионизированной воде. Для дегидратации полученных НОЦ и разрушения водородных связей, образовывавшихся между

водой и первичным источником церия, авторы исследования применяли этиловый спирт. Для получения порошка НОЦ выпавший осадок высушивали в течение 12 часов, размалывали в агатовой ступке и прокаливали на протяжении 3 часов при температуре 500°C. По результатам проведенной сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии форма полученных наночастиц диоксида кремния была сферической и составляла около 5 нм. Здесь следует подчеркнуть, что размер НОЦ имеет критическое значение для развития фармакологического действия, и полученный авторами размер, безусловно, является эталонным [29].

В недавно проведенной работе международным научным коллективом НОЦ были получены довольно простым методом соосаждения. Для этого авторы использовали нитрат трехвалентного церия как источник металла, и реакционной средой выступал карбонат натрия. В результате реакции двух упомянутых водных растворов при рН 6,0 был получен осадок карбоната трехвалентного церия, который высушивали в течение 6 часов при температуре 65°C, затем прокаливали при температуре 220°C в течение двух с половиной часов, после чего продолжили каление еще на 3 часа при повышении температуры до 600°C для получения конечного продукта – наночастиц диоксида церия с размером 20 нм по данным рентгеновской кристаллографии [30].

Рассуждая о достоинствах и недостатках, ограничениях метода преципитации и соосаждения, следует подчеркнуть, что способ соосаждения позволяет получать наночастицы диоксида церия меньшего размера и более высокой чистоты вследствие одномоментного смешивания как источника церия, так и реакционной среды. Это способствует более гомогенному образованию ядер преципитации и осаждению частиц. Вместе с тем, этот метод более дорогой, сложный и требует больших затрат времени по сравнению с прямым осаждением [31-33].

### 1.1.3 Гидротермальный способ получения НОЦ

Наряду с описанными методами шарового фрезерования и осаждения, гидротермальный метод также может рассматриваться как один из наиболее распространенных способов получения наночастиц диоксида церия в лабораторных и промышленных условиях.

Гидротермальный метод основан на использовании высокого давления и высоких температур в условиях замкнутого объема. При этом вода выступает в роли растворителя, а сама химическая реакция проводится в автоклаве [34].

Впервые метод был использован Zhou и Rahman в 1993 году. Авторы получили НОЦ, используя в качестве источника церия гексагидрат нитрата трехвалентного церия. На первом этапе авторы для образования осадка к растворенному в воде гексагидрату нитрата трехвалентного церия при интенсивном помешивании добавляли раствор гидроокиси аммония, после чего осадок отфильтровывали и промывали дистиллированной водой. В результате описанных манипуляций образовывался гель с низкой вязкостью. Гель помещали в тefлоновые цилиндры, тщательно их запаивали и перемещали в автоклав, где при температуре 200°C к трубам подводили давление до 10 Мпа в течение 4 часов. Полученный порошок наночастиц двуокиси церия промывали в дистиллированной воде, высушивали при комнатной температуре и размалывали в ступке, после чего опять высушивали, но уже при температуре 200°C на протяжении 2 часов. По данным трансмиссионной электронной микроскопии средний размер получившихся наночастиц церия колебался в пределах 11-17 нм [35].

Другая исследовательская группа для получения НОЦ описанным способом использовала хлорид церия в качестве источника металла. Авторы получили довольно крупные НОЦ со средним размером частиц в диапазоне от 100 до 200 нм. При проведении исследований в культуре мышинных

фибробластов линии L929, полученные НОЦ не обладали токсическими свойствами [36].

Авторская группа, возглавляемая Masui, модифицировала гидротермальный метод для выработки более чистых и мелких НОЦ: ученые использовали в качестве источника церия гексагидрат его хлорида, а для подавления образования крупных гранул использовали лимонную кислоту [37].

#### **1.1.4 Способ образования золя – геля как источник получения НОЦ**

Следующим широкоупотребимым методом получения НОЦ является способ создания золя – геля. В рамках метода на его первом этапе образуется золь, представляющий собой коллоидную систему – суспензию твердых частиц в жидкой дисперсионной среде – с последующим его сгущением и образованием геля. Затвердевание геля проводится при его прокаливании [38, 39].

Схематично алгоритм метода синтеза НОЦ можно представить в виде последовательности процессов [40-42]: 1) получение золя: для этого церий-содержащий источник растворяется в растворителе, подходящем для образования гомогенной коллоидной системы, с последующим добавлением в систему для ее стабилизации сурфактанта или иного полимера (препятствуют слипанию частиц); 2) гидролиз и конденсация, процессы, при которых золь подвергается гидролизу с последующей реакцией конденсации, в результате которых и образуются наночастицы двуокиси церия. При этом, при гидролизе источник церия реагирует с водой, тогда как при последующей конденсации образуются ковалентные связи между атомами церия и кислорода с образованием диоксида церия; 3) созревание геля, при котором полученный на предшествующем этапе гель, содержащий наночастицы двуокиси церия дозревает на протяжении времени от нескольких часов до нескольких дней. В результате гель приобретает плотность, тогда как отдельные частицы

обретают схожие размеры и форму; 4) высушивание образованного геля для удаления применяемого растворителя и оставшейся при созревании геля воды: эти операции проводятся либо с применением технологии криоэвапорации (удаление воды при критически низких температурах), либо технологии критического высушивания; 5) прокаливание при температуре не менее 500°C позволяет удалить из НОЦ оставшиеся органические компоненты, стабилизаторы и растворители.

В одном из недавно проведенных исследований авторы использовали вышеописанную технологию для получения НОЦ. Для стабилизации золя авторы применили желатин, тогда как источником церия выступал гексагидрат нитрата церия. Исследование проводилось для того, чтобы определить оптимальные соотношения источника церия и стабилизатора для получения наночастиц с заданными свойствами. Ученым удалось показать, что увеличение присутствия гексагидрата нитрата церия в золе и снижение доли желатина приводит к увеличению размеров получаемых НОЦ [43].

Таким образом, описанный метод представляет собой высокочувствительный и труднорегулируемый процесс получения наночастиц диоксида церия различных формы и размеров. Метод при этом позволяет очень эффективно контролировать размеры частиц и чистоту продукта реакции, что отражается на его стоимости и затратах времени [44, 45].

### **1.1.5 Метод отжига раствора как эффективный способ получения частиц диоксида церия**

Данный метод описывается авторами как довольно простой и эффективный способ получения наночастиц двуокиси церия с заданными свойствами. При этом, в основе метода – отжиг органического растворителя (как правило, мочевины или глицина), в котором растворен источник церия (в форме нитрата или хлорида церия). В результате выделения высокой энергии

вследствие того, что реакция экзотермическая, образуются наночастицы диоксида церия. Достоинством метода является то, что в результате реакции, длящейся несколько секунд, получается чистый порошок с хорошими свойствами [46, 47].

Описываемым способом были получены сферические наночастицы диоксида церия размером от 20 до 30 нм, при этом в качестве источника металла выступал водный раствор нитрата церия, а органическая составляющая включала раствор нитрата аммония и глицина. При проведении исследований в культуре мышечных фибробластов линии L929, полученные НОЦ не обладали токсическими свойствами даже в максимально исследуемых концентрациях до 1000 мкг/мл. Эти результаты позволили авторам сделать заключение о безопасности, биосовместимости полученных НОЦ и возможности их применения в клинической практике [48].

В другом исследовании авторы для получения НОЦ использовали гексагидрат нитрата церия, а в качестве органического растворителя – мочевины, глюкозу, глицин и лимонную кислоту. Авторы показали, что вид органического растворителя оказывает непосредственное влияние на размер, форму и качество НОЦ, что связано с особенностями реакции горения и температурными режимами, возникающими при этом. Наиболее высокотемпературная реакция отжига достигается при использовании в качестве источника энергии горения глицина, при этом образуется наиболее качественный порошок наночастиц диоксида церия. При анализе антикоррозийных свойств получаемых НОЦ от источника энергии горения было показано, что оптимальным источником является мочевины, поскольку при ее отжиге формируются НОЦ с максимальным высвобождением свободных ионов четырехвалентного церия [49].

Следовательно, метод отжига органического растворителя представляется простым, малозатратным способом получения НОЦ, требует мало времени и при этом создает не очень высокие температурные режимы. Вместе с тем, метод нуждается в тщательной подготовке и контроле во

избежание нежелательных последствий и получения некачественных продуктов реакции [47, 50].

### **1.1.6 Сонохимический метод получения НОЦ с заданными свойствами**

Вследствие чрезвычайно высокой экобезопасности методы физикохимии представляются оптимальными для получения наночастиц металлов в настоящее время. Физической основой метода является воздействие высокочастотными звуковыми волнами на среду, содержащую источник церия, с образованием эффекта микрокавитации. В свою очередь, микрокавитация сопровождается созданием очагов высокой температуры и давления, что, в конечном счете, запускает химическую реакцию образования наночастиц двуокиси церия [51, 52].

Сонохимический метод получения НОЦ применили в своей недавней работе японские ученые. В качестве источника церия ими был использован гексагидрат нитрата церия в едком натре. Они на первом этапе смешивали 1,0 М раствор гексагидрата нитрата церия с деионизированной водой с последующим прибавлением 0,5 М раствора едкого натра титрованием при постоянном встряхивании. Полученная смесь помещалась в соникатор на 1 час при температуре 40°C. Продукт реакции фильтровали через ватманскую бумагу, промывали водой и этиловым спиртом для удаления избытков едкого натра. Осадок высушивали при температуре 100°C на протяжении часа в потоке горячего воздуха с последующим прокаливанием при температуре 1000-1100°C на протяжении 2 часов с получением НОЦ. Полученные наночастицы диоксида церия имели размер части до 35 до 38 нм. Полученные НОЦ продемонстрировали высокую способность катализировать биodeградацию метиленового синего под действие ультрафиолетового излучения, а также были с успехом использованы для детекции ацетаминофена [53].

В другой работе, НОЦ были получены из гексагидрата нитрата церия и азадикарбонамида с добавлением этилендиамина, гидрохлорида тетраэтиламмония или гидрохлорида тетрабутиламмония. Применение последних веществ значительно повлияло как на размер, так и на распределение частиц в НОЦ. При использовании органических компонентов частицы имели меньший размер и схожую друг с другом форму, тогда как в отсутствие реагентов имели тенденцию к образованию крупных гранул. Авторы показали также, что использование смеси гексагидрата нитрата церия, азадикарбонамида и гидрохлорида тетрабутиламмония в молярном соотношении 1:1:1 приводит к образованию НОЦ со средним размером частиц, не превышающем 3,3 нм [54].

### **1.1.7 Микроэмульсионный метод получения НОЦ**

Как хорошо известно, эмульсии представляют собой термодинамически стабильные, прозрачные и изотропичные коллоидные системы, в которых дисперсная фаза (как правило лишенный заряда липид в виде масла) присутствует в заряженной дисперсионной среде (вода), при этом обе среды не смешиваемы, а дисперсная система стабилизируется добавлением органического полимера, например сурфактанта. Сурфактант смешивается с водно-масляной системой и уменьшает поверхностное натяжение молекул дисперсной фазы, что вызывает образование мельчайших капель последней. Вследствие описанных явлений микроэмульсии обладают целым рядом уникальных физико-химических свойств, позволяющих применять их чрезвычайно широко в народном хозяйстве [55-58]. В частности, для синтеза наночастиц различного состава также могут быть использованы микроэмульсии, поскольку метод позволяет контролировать такие параметры образующихся частиц как размер, форма, геометрия, гомогенность, структура, поверхность [59].

Были предприняты и успешные попытки получения НОЦ методом микроэмульгирования. В частности, в микроэмульсию, состоящую из октилфенилового эфира полиоксиэтилена, гексилового спирта и циклогексана добавляли водный раствор нитрата церия. Параллельно была подготовлена микроэмульсия, содержащая гидроокись аммония. Обе эмульсии смешивались и встряхивались до формирования коллоидной суспензии. Образованные НОЦ отделяли путем центрифугирования и отмывания метанолом, деионизированной водой и ацетоном. Последующее высушивание с помощью криовакуумного метода позволило получить на выходе продукт в виде НОЦ с размером частиц от 2 до 6 нм [60].

Другая исследовательская группа изучала влияние температуры прокаливания микроэмульсии на размер получающихся НОЦ. Ученые установили, что применение температуры в районе 623 Кельвин приводит к образованию сферических частиц-агрегатов с размером около 65 нм. Повышение температурного режима до 873 Кельвин сопровождалось уменьшением размеров нанокристаллов до 6-8 нм. Также менялась и геометрия кристаллов – они превращались из тетраэдрических в кубические, а валентность церия менялась с трех на четыре [61].

## **1.2 Биофизические свойства наночастиц, содержащих диоксид церия: применение в хирургии**

В ряде исследований было показано, что НОЦ обладают широким спектром биологических свойств, которые могут найти применение в различных областях клинической медицины, в том числе и в хирургической клинике. Так, установлено, что наночастицы диоксида церия высокоэффективны при стимуляции заживления кожных ран, что связано как с подавлением воспалительной реакции, так и с ингибированием явлений перекисного окисления липидов, оксидативного стресса, снижения риска развития инфекций в ране, а также стимуляции неоангиогенеза. Кроме того,

установлена позитивная роль НОЦ в области регенерации костной ткани, в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии. Остановимся подробнее на биологических свойствах НОЦ в рамках настоящего обзора.

### **1.2.1 Противовоспалительные и антиоксидантные свойства наночастиц диоксида церия**

Как известно, реактивные формы кислорода (РФК), представляющие собой химически-активные молекулы, образуются как побочные продукты в результате течения естественных обменных процессов в эукариотической клетке. Эти молекулы получили свое название вследствие того, что несут в своей структуре кислород в реакционно-активном состоянии.

Реактивные формы кислорода формируются вследствие таких внутри- и межклеточных метаболических процессов как клеточное дыхание (дыхательная цепь, локализуемая в митохондриях), воспалительная реакция, в ответ на воздействие агрессивных факторов окружающей среды в виде ионизирующей радиации, химического загрязнения и др. [62].

Помимо физиологических функций, связанных с явлениями внутриклеточной сигнализации и противомикробной защиты, избыточная продукция реактивных форм кислорода может вызвать развитие явлений оксидативного стресса и повреждению внутриклеточных структур – молекул ДНК, липидов и белков [63-65]. Для борьбы с окислительным стрессом и нейтрализации избыточной продукции РФК клетка обладает рядом защитных ферментативных механизмов и веществ – антиоксидантов [62]. Вещества – антиоксиданты нейтрализуют реактивные формы кислорода путем донирования электронов и восстановления свободных валентностей вследствие чего происходит предотвращение повреждения клеток и тканей [66]. Вследствие этого оптимальное равновесие между продукцией РФК и концентрацией антиоксидантов представляет собой фундаментальную основу поддержания клеточного гомеостаза [67].

Последние десятилетия мировая наука не теряет интерес к поиску новых подходов к контролю процессов оксидативного стресса, в том числе новых антиоксидантов среди природных веществ и молекул, полученных методами органического синтеза. При этом в последнее десятилетие НОЦ рассматривается как один из самых перспективных кандидатов в антиоксиданты. Антиоксидантные свойства наночастиц двуокиси церия лежат в плоскости воспроизводства свойств природных ферментов-антиоксидантов. Причем, следует отметить, что НОЦ способны элиминировать как РФК, такие как супероксид-анион, так и реактивные формы азота – радикалы оксида азота [68, 69]. Так, в частности, в одной из последних работ с использованием 1,1-дифенил-2-пикрилгидразинового метода оценки перекисного окисления липидов, была показана зависящая от концентрации супероксиддисмутаза (СОД)-миметическая и каталаза-миметическая активность НОЦ. При увеличении концентрации наночастиц диоксида церия с 1 мкг/мл до 300 мкг/мл антиоксидантная активность НОЦ по нейтрализации супероксид-радикала значительно возрастала. СОД-подобная активность НОЦ также повышалась при росте концентрации наночастиц в лекарственной форме до 600 мкг/мл, тогда как каталазная активность вещества достигалась при применении раствора с концентрацией НОЦ до 1000 мкг/мл [70].

В основе повреждения тканей и воспалительной реакции, как мы уже неоднократно упоминали, лежит избыточная продукция активных форм кислорода на протяжении длительного времени. Вследствие способности сдерживать обороты оксидативного стресса НОЦ рассматриваются как мощные противовоспалительные агенты.

Международная научная группа изучила способность НОЦ нейтрализовывать генерацию РФК и подавлять образование индуцированной медиаторами воспаления синтазу оксида азота (iNOS) в культуре макрофагов мыши (J774A.1). Авторами было установлено, что проникновение наночастиц двуокиси церия в клетки культуры наблюдалось при достижении концентрации НОЦ в среде культивирования 10 мкМ на протяжении 24 часов.

Также была показана способность НОЦ сдерживать образование активных форм кислорода и подавлять активность iNOS в культуре клеток. Результаты позволили рассматривать НОЦ как потенциальный противовоспалительный агент [71].

Другой научный коллектив использовал в своей работе НОЦ размером около 40 нм, полученные методом горящего спрея. В присутствии указанных наночастиц двуокиси церия в диапазоне концентраций от 0,001 до 60 мг/мл авторы инкубировали эндотелиальные клетки человеческой аорты на протяжении 4 часов. Было установлено, что сама инкубация не сопровождается формированием воспалительной реакции, а после инкубации не было установлено значительных колебаний уровня экспрессии мРНК трех провоспалительных генов, кодирующих внутриклеточную молекулу адгезии 1 типа, ИЛ-8 и MCP-1 [72].

Вместе с тем, подавление провоспалительных сигнальных путей в основе развития противовоспалительных свойств НОЦ было убедительно доказано. Так, в частности был изучен эффект наночастиц диоксида церия в отношении псориаза. Авторы использовали имиквимод местно для моделирования псориаза у лабораторных BALB/c мышей. Животные были разделены на группы, в которых мыши получали терапию наночастицами диоксида церия местно, внутрибрюшинно и подкожно. Режим введения (нанесения) был идентичен во всех группах – однократно в сутки. Было показано, что вне зависимости от пути введения НОЦ статистически значимо уменьшали явления спленомегалию, тяжесть кожного процесса и процессы перекисного окисления липидов. Помимо этого, существенному снижению подвергалась тканевая концентрация таких провоспалительных цитокинов и хемокинов, как ИЛ-17, ИЛ-23, ИЛ-22, СОХ-2, ядерный фактор-каппа В, фактор пролиферации Ki-67 и GSK-3. Авторами был сделан вывод о том, что в основе антипсориазического эффекта НОЦ лежит способность подавлять Th-опосредованный ИЛ17/ИЛ-23 сигнальный провоспалительный путь с ингибированием общего воспалительного ответа [73].

### 1.2.2 Противомикробная активность НОЦ

Противомикробная активность церия, характеризующаяся широким спектром активности в отношении как Гр(+), так и Гр(-) микроорганизмов, и длительно сохраняющимся эффектом, известна довольно давно, и выдвинула этот металл в ряд эффективных микробицидных агентов.

Это обстоятельство повлекло за собой целую серию исследований, в которых изучалась противомикробная активность церия и содержащих его лекарственных форм в различных условиях формирования инфекционного процесса, в том числе, это касается и церий-содержащих наноматериалов и наночастиц.

Механизм антимикробного действия наночастиц диоксида церия включает ряд компонентов. Первым из них является прямой контакт НОЦ с мембраной микробной клетки [74]. Он происходит вследствие электростатического взаимодействия положительно заряженных наночастиц двуокиси церия с отрицательно заряженной поверхностью бактериальной клетки, что приводит к абсорбции НОЦ на поверхность мембраны как Гр(+), так и Гр(-) микроорганизмов. Этот феномен обуславливает длительное присутствие НОЦ на поверхности микробной клетки и замедляет или предотвращает проникновения наночастиц внутрь микроорганизма. В свою очередь, длительное присутствие наночастиц церия сопровождается нарушением вязкости и текучести клеточной мембраны микроорганизма, нарушением функционирования ряда трансмембранных ферментативных систем, в том числе жизненно-важных для бактерии ионных насосов, через которые производится обмен информацией и биологически активными веществами с окружающей средой [75, 76,126].

Помимо этого, наночастицы церия оказывают повреждающее действие на белки микробной клетки, а выделяющиеся ионы церия при их диффузии

внутри клетки подавляют процессы клеточного дыхания за счет акцептования свободных электронов в митохондриях бактерий [77].

Высвобождающиеся ионы церия, кроме того, могут связываться с тиоловыми группами, вовлекаться в функционирование белков-транспортеров и поринов, нарушать поступление нутриентов внутрь микробной клетки [75, 78]. Помимо прочего, сложная геометрическая структура НОЦ, наличие в кристаллах острых углов приводит к прямому механическому повреждению мембран в особенности Gr(+) микроорганизмов [79]. В целом вся совокупность перечисленных обстоятельств ведет к замедлению роста микробных клеток и их колоний, и гибели бактерий.

На рисунке 1 суммированы в виде схемы современные представления о прямом и непрямом механизмах противомикробного действия наночастиц двуокиси церия.

Согласно многочисленным литературным данным первичным механизмом клеточного повреждения наночастиц является активация под их действием генерации свободных активных форм кислорода и явлений окислительного стресса. Применительно к НОЦ это кажется противоречит всему, что было изложено в настоящем обзоре ранее. Однако, это не так. В бактериальной клетке химическое разрушение различных органических молекул может сопровождаться выделением РФК, оксидативным стрессом и последующим повреждением витальных функций бактерий [75, 80].

Согласно многочисленным литературным данным первичным механизмом клеточного повреждения наночастиц является активация под их действием генерации свободных активных форм кислорода и явлений окислительного стресса. Применительно к НОЦ это кажется противоречит всему, что было изложено в настоящем обзоре ранее. Однако, это не так. В бактериальной клетке химическое разрушение различных органических молекул может сопровождаться выделением РФК, оксидативным стрессом и последующим повреждением витальных функций бактерий [75, 80].

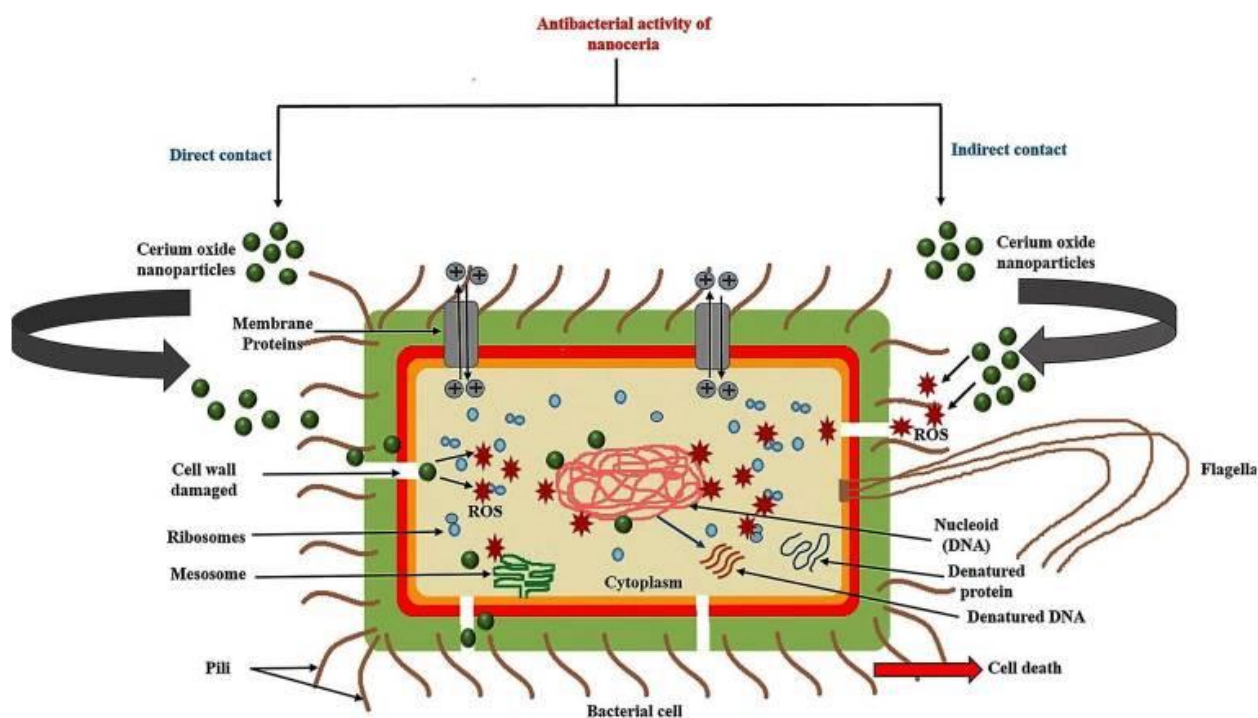


Рисунок 1 – Прямые и не прямые механизмы противомикробного действия НОЦ по [20] в ред. автора

НОЦ, как описано в научной периодике, способны повышать в микробной клетке продукцию РФК, которые, в свою очередь, повреждают нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК), белки, липиды и полисахариды бактерий [75, 77]. Интересны результаты недавнего исследования, в котором описаны механизмы бактерицидного эффекта наночастиц диоксида церия в отношении инкапсулированных форм бактерий и микроорганизмов в составе биопленки. Решающее значение здесь имеют ионы церия, диссоциирующие из наночастиц при их взаимодействии на поверхности микроорганизма с реактивными формами кислорода. При этом повреждающее значение имеет не сам церий, а образующиеся под его действием РФК, диффундирующие через капсулу или пленку внутрь микробной клетки и повреждающие ее [81]. Дополнительным фактором агрессии против микробов здесь может быть то, что НОЦ способны вступать в реакции подобно пероксидазе, сопровождающиеся продукцией РФК [82, 83].

### 1.2.3 Влияние НОЦ на процессы неоангиогенеза

Как известно, ангиогенез – это сложный биологический процесс формирования новых кровеносных сосудов, берущих свое начало от имеющихся. В естественных условиях ангиогенеза сопровождает формирование новых тканей, ранозаживление, репаративный процесс, однако может приобретать и патологическое значение, например, при злокачественных новообразованиях.

В процессе ангиогенеза выстилающие кровеносный сосуд изнутри эндотелиальные клетки размножаются и мигрируют в область формирования нового сосудистого коллектора. Они организуются в трубкоподобные структуры, привлекают соединительнотканые клеточные элементы, и происходит образование нового сосуда. В процессе ранозаживления биологический смысл ангиогенеза сводится к доставке нутриентов и кислорода к вновь образованным тканям, покрывающим рану, клеткам, таким как фибробласты, клетки иммунной системы.

Также вновь-образованные сосуды служат для эвакуации продуктов деградации и токсинов из области раневого дефекта. В последние десятилетия научными коллективами многих стран были предприняты попытки, и не безуспешные, разработать эффективные подходы к стимуляции ангиогенеза для повышения скорости и эффективности ранозаживления, что имеет критическое значение для хирургии ран.

С этих позиций, применение наноматериалов открывает чрезвычайно широкую перспективу для клеточной и тканевой инженерии, в том числе для создания технологий ангиогенеза, а, значит, говоря шире, и для всей регенеративной медицины.

Однако, строго говоря, к сегодняшнему дню накоплены доказательства как стимулирующего, так и угнетающего действия НОЦ в отношении процесса ангиогенеза [64, 75].

Так, в исследовании Das с соавт. было показано, что наночастицы диоксида церия могут активировать неоангиогенез за счет влияния на внутриклеточный метаболизм кислорода. В опытах в культурах клеток было установлено, что мелкокристаллические НОЦ с размером частиц, не превышающем 3-5 нм и высоким поверхностным соотношением трех- и четырехвалентных ионов церия могут стимулировать образование эндотелиальных трубок – источников новых кровеносных сосудов. Аналогичные результаты были получены в модельной системе на куриной хорионаллантоисной мембранной системе. Следует еще раз подчеркнуть, что чем меньше размер НОЦ (оптимально ниже 15 нм) и выше соотношение трех- и четырехвалентных ионов церия, тем ярче проявляются ангиогенные свойства наночастиц церия [84].

В представленном исследовании также была установлена корреляционная зависимость между активностью стимулировать ангиогенез и способностью НОЦ снижать внутриклеточную концентрацию кислорода, в том числе и его высокоректогенных форм. Упомянутое снижение сопровождается временной активацией перемещения гипоксического фактора 1 альфа (HIF-1 $\alpha$ ) в ядро клетки, что приводит к повышению экспрессии белков, вовлеченных в процесс образования новых кровеносных сосудов [84].

Все описанные выше обстоятельства, несомненно, повысили интерес исследователей к изучению влияния НОЦ на ранозаживление. И в самом деле, в целом ряде публикаций описаны результаты такого рода исследований, выполненных на лабораторных животных.

Так, международная группа исследователей изучила ранозаживляющий потенциал водорастворимой формы НОЦ, наносимой местно на область повреждения самцам мышей линии C57Bl<sub>6</sub> с полнослойной раной кожи. Был показан мощный репаративный эффект, проявляющийся в активации пролиферативного и миграционного потенциала фибробластов и кератиноцитов наряду с миграцией в очаг поражения эндотелиоцитов и образовании новых сосудов. Активация репаративного процесса

сопровождалась подавлением явлений оксидативного стресса и редукцией свободных форм кислорода в ткани раны [85].

Любопытно, что в зависимости от микроокружения и экологии области воздействия наночастицы с диоксидом церия могут проявлять и антиангиогенную активность. В частности, это может быть обусловлено рН окружающей среды: НОЦ приводят к накоплению пироксида водорода и пироксид-радикалов при закислении окружающей среды и, напротив, нейтрализуют перекисные валентности при нормальном значении кислотно-щелочного состояния окружающих тканей. Из этого можно сделать вывод о том, что, например, в условиях опухолевого роста будут наблюдаться явления избыточной продукции перекиси водорода с подавлением как роста опухоли, так и неоангиогенеза в ней вследствие того, что опухоль имеет, как правило низкий показатель рН (кислая среда) [67].

Научное сообщество предпринимало неоднократные попытки модифицировать структуру наночастиц диоксида церия для повышения их эффективности в отношении репарационных процессов в ране.

Так, исследовательская группа из Китая разработала уникальные сериево-графеновые наночастицы, загруженные аминокислотой аргинином, при этом в самих наночастицах связь ионов церия и графена осуществлялась при помощи N-гидроксисукциниминового эфира. Топическое применение разработанных графен-цериевых наночастиц позволило воспроизвести существенный противомикробный эффект на фоне легкого светового облучения за счет образования электронных пор между церием и графеном и генерации реактивных форм кислорода. В стадию пролиферации указанные наночастицы поглощались пролиферирующими клетками, использовались для ограничения избыточной продукции кислородных радикалов, в то время как графен служил каркасом для облегчения миграции фибробластов в область раневого ложа [86].

Подобные же полые НОЦ, содержащие аргинин, но в отсутствие графена разработал научный коллектив под руководством Ма. Авторы

доказали, что использование таких НОЦ оказывается также эффективным на всех стадиях процесса ранозаживления. Во время стадии гемостаза НОЦ формировали своеобразный наномост в тканях для прекращения кровотечения. В воспалительную стадию наблюдался выраженный противомикробный эффект, связанный с избыточной продукцией РФК в микробных клетках под действием НОЦ. В пролиферативную фазу наночастицы активно нейтрализовывали избыток РФК вследствие СОД и каталаза-подобной активности и конверсии синтазы оксида азота [87].

### **1.3 Формы применения НОЦ в хирургической практике для лечения кожных ран**

Последние десятилетия ознаменованы появлением многочисленных работ по вопросам разработки, создания, доклинического исследования и клинического применения различных тканеинженерных конструктов, скаффолдов, повязок, местных лекарственных форм наночастиц диоксида церия для их применения в реконструктивной хирургии и лечения кожных ран.

В таблице 1 собраны сведения об основных подходах к созданию и производству таких топических форм, содержащих наночастицы двуокиси церия, которые либо воспроизводят естественную структуру кожи, либо служат основой для повышения интенсивности ранозаживления и восстановления целостности утраченных или поврежденных тканей. Безусловно, все они имеют свои достоинства и недостатки, на которые необходимо обращать внимание.

Помимо перечисленных выше методов было разработано ряд других подходов к созданию повязок и мягких лекарственных форм, содержащих наночастицы диоксида церия, для применения в хирургии кожной раны был разработан в последние годы [101-121].

Таблица 1 – Местные формы, скаффолды для лечения кожных ран и восстановления целостности тканей на основе наночастиц диоксида церия

Метод	Описание	Достоинства	Недостатки	Ссылки
1	2	3	4	5
Метод электроспиннинга	Образование волокон из полимерного раствора под действием электрического поля	Производство однородных нановолокон с высоким соотношением площади поверхности к объему. Высокая пористость с взаимосвязанными порами. Возможность контролировать диаметр волокна. Использование различных полимеров. Структура подобная межклеточному матриксу. Простота выполнения (простой метод изготовления)	Требуется высоковольтное оборудование. Могут потребоваться токсичные растворители. Может быть сложно контролировать выравнивание волокон. Ограничение загрузки биокерамики в полимерную матрицу.	[88-91]
Метод криовысушивания	Замораживание полимерного раствора с последующим удалением органического растворителя путем сублимации	Создает высокопористые каркасы. Использование различных полимеров. Масштабируемый и относительно простой процесс.	Требуется оборудование (аппарат для сублимационной сушки). Требуется оборудование (аппарат для сублимационной сушки). Трудоемкое производство. Ограниченный контроль размера пор. Может быть трудно контролировать пористость	[92-94]

Продолжение таблицы 1

Метод	Описание	Достоинства	Недостатки	Ссылки
1	2	3	4	5
Метод удаления растворителя	Выпаривание органического растворителя с целью создания пористого скаффолда	Простота выполнения (простой метод изготовления). Использование различных полимеров. Хорошие механические свойства. Требуется относительно дешевое оборудование.	Могут потребоваться токсичные растворители. Ограниченный контроль над архитектурой строительных лесов для испарения. Недостаточная воспроизводимость метода. Возможность удержания токсичного растворителя внутри каркаса при испарении	[93-95]
Метод вспенивания газа	Использование газа для образования пор в НОЦ-скаффолде	Не содержит растворителей (экологически чистый) метод. Масштабируемый	Требуется высокое давление. Плохая взаимосвязанность (сообщаемость пор). Кристаллические полимеры использовать нельзя.	[93, 96]
Метод разделения фаз	Разделение фаз в полимерном растворе для формирования пор в НОЦ-скаффолде	Высокая пористость образующегося НОЦ-содержащего конструкта. Простота метода (простой метод изготовления).	Может потребоваться использование токсичных растворителей. Ограниченный контроль над.	[93, 95]

Продолжение таблицы 1

Метод	Описание	Достоинства	Недостатки	Ссылки
1	2	3	4	5
			архитектурой строительных лесов при производстве. Ограниченный контроль над размером пор в готовом НОЦ-содержащем скаффолде	
Метод разделения фаз	Разделение фаз в полимерном растворе для формирования пор в НОЦ-скаффолде	Высокая пористость образующегося НОЦ-содержащего конструкта. Простота метода (простой метод изготовления).	Может потребоваться использование токсичных растворителей. Ограниченный контроль над архитектурой строительных лесов при производстве. Ограниченный контроль над размером пор в готовом НОЦ-содержащем скаффолде.	[93, 95]
Трехмерная печать	Формирование трехмерного конструкта послойно путем объемного принтинга с помощью управляемого компьютером устройства	Высокая точность. Можно создавать сложные геометрические формы. Масштабируемый метод. Точный контроль морфологии и размера пор.	Требует управляемого компьютером Устройства (трехмерного принтера)	[97-101]

Так, под действием ультрафиолета и образования желатина метакрилоила были получены гидрогели, содержащие НОЦ в различных концентрациях (от 0,5 до 5% масс.). Они с успехом повышали заживляемость кожных ран при их моделировании у мышей и крыс с сахарным диабетом и без экспериментальной патологии.

Гидрогели, разработанные и полученные на основе криовысушивания сочетают в себе целый ряд уникальных и чрезвычайно полезных для ранозаживления свойств. Имея пористость до 75% и размер пор в диапазоне от 40 до 300 мкм, эти формы НОЦ-содержащих гидрогелей обеспечивают оптимальные пролиферацию, обмен нутриентами и транспорт жидкости в области регенерации тканей. При этом, гидрогели, содержащие в своей структуре наночастицы оксида церия проявляют большие адсорбционные свойства, прочность и поверхностное натяжение при сравнении с гидрогелями другой физико-химической природы.

Описанные свойства обуславливают высокую активность церий-содержащих местных форм и повязок для лечения мокнущих кожных ран. Топическое применение гидрогелей с НОЦ показало оптимистические результаты, основанные на предшествующих наблюдениях по их стимуляции пролиферации фибробластов и кератиноцитов.

Все вышесказанное еще раз подчеркивает важность исследованию по поиску оптимальных, безопасных, нетоксичных топических методов контроля репарационного процесса. Церий-содержащие наночастицы в этой связи могут рассматриваться как чрезвычайно перспективное направление. Вместе с тем, в настоящее время мы не нашли работ, которые бы описывали результаты применения наночастиц оксида церия для повышения эффективности использования лазерных технологий в восстановительной хирургии, что и обуславливает несомненную актуальность проведения настоящего исследования.

## ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С позиции клинической медицины восстановление целостности тканей, качественное и эффективное соединение краев раны, имеет ключевое значение в настоящее время. Технологическое совершенствование и биофизическое обоснование подходов к восстановительной медицине, регенеративной и реконструктивной хирургии позволили совершить прорыв в рассматриваемой области. Однако, доступность высокотехнологичной медицинской помощи, широкое распространение раневых процессов в популяции вне зависимости от уровня экономического развития государства диктует необходимость продолжения поиска безопасных и менее затратных способов восстановления органов и тканей.

Лазерное соединение тканей является минимально инвазивным методом, снижающим образование рубцов и фиброза по сравнению с традиционными швами. Кроме того, технология ускоряет заживление ран, снижает активность воспалительной реакции и способствует быстрой регенерации. Благодаря герметичности соединения и отсутствию реакции на инородное тело при таком способе соединения тканей снижается риск инфицирования и кровотечений. Лазерное соединение тканей имеет ряд недостатков, ограничивающих распространение данной технологии. Основным из них является чрезмерное термическое воздействие на ткани и низкая, по сравнению с узловыми, прочность сварных швов на разрыв. Описанных недостатков можно избежать при использовании специальных биологических составов (БС), которые наносят на область повреждения. Интенсивно поглощая и локализуя лазерное излучение, БС уменьшает термическое воздействие на окружающие ткани. Сывороточный альбумин активно используется в регенеративной медицине и тканевой инженерии благодаря своим высоким адгезионным свойствам и положительному влиянию на пролиферацию клеток. Локализовать лазерное излучение в

области формирования соединения позволяет индоцианин зеленый, имеющий пик поглощения, соответствующий выбранной длине волны лазерного излучения (810 нм). Добавление одностенных углеродных нанотрубок в биологический состав значительно повышает прочность лазерной пайки и эффективность самоорганизации клеток восстанавливаемой ткани. Эти наноструктуры обладают уникальными механическими свойствами и могут способствовать созданию прочной и устойчивой матрицы для клеток, что, в свою очередь, ускоряет процесс регенерации и улучшает функциональные результаты после хирургического вмешательства [123].

В последние годы внимание многочисленных исследовательских групп обращено в сторону церия, а именно инновационной формы церия – наночастиц, содержащих диоксид церия (НОЦ), обладающих целым набором уникальных качеств – способностью подавлять воспалительную реакцию, развитие инфекционного процесса, стимулировать антиоксидантную систему и образование новых кровеносных сосудов.

Работы последних лет в основном касались применения НОЦ в составе жидких и мягких топических лекарственных форм, а также тканевой инженерии для разработки скаффолдов и тканевых конструкторов. В то же время, мы не нашли в доступной литературе упоминания об использовании наночастиц диоксида церия, использующихся в комбинации с технологиями лазерного соединения тканей, главным образом, кожи и кровеносных сосудов, что и подтолкнуло нас на проведение настоящего диссертационного исследования.

Поскольку поставленная перед нами цель охватывает несколько областей медицинского знания, а именно изучение биофизических эффектов и их механизмов действия биологического состава, содержащего сывороточный альбумин 25 масс.%, индоцианин зелёный 0,1 масс.%, одностенные углеродные нанотрубки 0,1 масс.%, воду при лазерном воздействии и наночастиц диоксида церия, в том числе получение этой топической формы, с одной стороны, а также экспериментально-

хирургическое обоснование инновационных подходов к восстановлению целостности тканевых дефектов, с другой, для решения задач работы применялись методы биомедицинской физики, экспериментальной хирургии, биомеханики и клеточной биологии.

## 2.1 Планирование диссертационного исследования

При планировании настоящего диссертационного исследования мы основывались на принципах комплексности методических подходов, единстве замысла и методов его реализации, в связи с чем диссертационная работа методологически включала два больших раздела – *in vitro* исследование в культурах клеток человека и на тканях лабораторных животных, и *in vivo* исследование на лабораторных животных двух видов – лабораторных крысах и кроликах.

На рисунке 2 схематично представлен дизайн настоящей диссертационной работы. Этапность его реализации состояла из инициальной глубокой теоретической проработки научной задачи, реферирования литературных источников, подготовки обзора, выбора адекватных поставленным задачам методов исследования, составления базы данных исследования на платформе Excel.

На следующем этапе была разработана и осуществлена лабораторная технология синтеза наночастиц на основе диоксида церия, проведена правовая защита способа получения рассматриваемого вида НОЦ в виде получения патента Российской Федерации, а также наработка субстанции в количествах, достаточных для проведения исследовательских работ.

Большой раздел исследования был выполнен *in vitro*. Его целесообразность была продиктована тем, что НОЦ были синтезированы новым способом, что требовало тщательного и всестороннего изучения токсических свойств наночастиц диоксида церия в культурах тех клеток, которые преимущественно вовлекаются в репарационный процесс при

сшивании сосудов и кожи – эндотелиоцитов и фибробластов. Качественно и количественно была оценена проникающая способность НОЦ в фибробласты. Также проведены исследования цитотоксичности биологического состава, используемого при лазерном соединении тканей.



Рисунок 2 – Общий дизайн исследования по изучению эффективности НОЦ в процессе лазерной пайки тканей

Также чрезвычайно важно было оценить биомеханические свойства лазерного соединения кровеносного сосуда (аорты) кролика и кожи крысы, для чего были определены прочность соединения на разрыв. На

хирургическом этапе работы изучили эффективность лазерного соединения кожной и сосудистой раны при помощи биологического состава, содержащего углеродные нанотрубки при топическом нанесении жидкой спрей-формы НОЦ на область соединения краев кожной раны и сосуда. Для этого провели серии экспериментальных хирургических операций на крысах и кроликах. Изучали скорость и этапы заживления раны, прочность соединения кожи, стадии регенерации с помощью морфологических методов исследования; герметичность и полноценность соединения кровеносного сосуда, скорость кровотока до и после операции, диаметр сосуда. На завершающем этапе работы провели анализ полученных результатов, их описание, статистическую обработку, сформулировали выводы, положения и практические рекомендации.

## **2.2 Соответствие работы принципам биомедицинской этики.**

### **Стандартные операционные процедуры**

При планировании и проведении исследования неукоснительно руководствовались принципами биомедицинской этики, касающихся вопросов минимизации использования лабораторных животных для получения репрезентативных результатов, гуманного с ними обращения как в процессе содержания в виварии, так и проведении биомедицинских манипуляций, адекватное обезболивание всех процедур, сопровождающихся формированием болевого синдрома.

Протокол исследования был своевременно представлен на рассмотрение в ЛЭК при ФГАОУ ВО «НИЯУ МИФИ», был обсужден и получил одобрение (Протокол №04-2024 от 12.12.24).

Работа была выполнена в лаборатории бионаноптоники, лаборатории молекулярно-клеточных технологий и экспериментальных исследований, кафедре фундаментальной медицины №99 инженерно-физического института биомедицины Федерального государственного автономного образовательного

учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» и лаборатория «Биомедицинские нанотехнологии» федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский университет «Московский институт электронной техники» в соответствии со следующими стандартными операционными процедурами:

- 1) Работа с культурами клеток.
- 2) Определение цитотоксичности в культуре клеток.
- 3) Содержание лабораторных грызунов.
- 4) Содержание кроликов.
- 5) Выполнение оперативного пособия на лабораторной крысе при ингаляционной анестезии.
- 6) Выполнение оперативного пособия на кролике в условиях ИВЛ и ингаляционной анестезии.
- 7) Лабораторное определение активности супероксиддисмутазы в культуре клеток.
- 8) Лабораторное определение перекиси водорода и активных форм кислорода в культуре клеток.
- 9) Лабораторное определение оксида азота в культуре клеток.

Также в качестве руководящих материалов использовали положения следующих нормативных и правовых актов, регламентирующих участие лабораторных животных и биологического материала в научных биомедицинских исследованиях:

- 1) Федеральным Законом №61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (действующая редакция);
- 2) Федеральным Законом №52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» (действующая редакция);
- 3) приказом Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека №224 от 19.07.2007 г. «О санитарно-

эпидемиологических экспертизах, обследованиях, исследованиях, испытаниях и токсикологических, гигиенических и иных видах оценок»;

4) приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 г. №199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики»;

5) ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики»;

6) ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами»;

7) ГОСТ Р ИСО 10993-5 – 2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*» (Национальный стандарт);

8) ГОСТ Р ИСО 10993-2 – 2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными» (Национальный стандарт);

9) Хельсинкской декларацией «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта» (от 1964, в действующей редакции);

10) Интегрированным дополнением к ICH E6(R1) Руководство по надлежащей клинической практике E6(R2) (от 9.11.2016 г.) и

11) Директивы Совета ЕС от 24 ноября 1986 г. о сближении Законов, постановлений и административных положений государств ЕС по вопросам защиты животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (86/609/ЕЕС).

Все эксперименты с участием лабораторных животных выполняли при адекватном обезболивании. Для этих целей применяли анестезиологическую приставку для лабораторных грызунов RWD Bioscience Technology (Китай) и ингаляцию изофлураном ветеринарным (Германия). Кроликов оперировали также под ингаляционным наркозом изофлураном в условиях экспериментальной операционной и ИВЛ. Выведение животных из

эксперимента осуществляли путем внутривенного введения углекислоты под ингаляционным наркозом.

### **2.3 Метод получения наночастиц диоксида церия**

Метод получения наночастиц диоксида церия был разработан нами совместно с коллегами лаборатории «Бионанофотоника» ИФИБ ФГАОБУ ВО «НИЯУ МИФИ».

Использовали метод фемтосекундной лазерной абляции в воде с последующей лазерной фрагментацией (лазер Avesta TETA-20 (Россия)). Контроль размерного распределения наночастиц осуществляли методом спектроскопии динамического рассеяния света на приборе Malvern Panalytical Zetasizer Nano ZS (Швейцария). Морфологию наночастиц исследовали на сканирующем электронном микроскопе TESCAN MAIA3 Triglav (Чехия) при ускоряющем напряжении 20 кэВ. Концентрацию наноматериала в растворе измеряли гравиметрически.

### **2.4 Метод лазерного соединения живых тканей. Принципиальная схема и состав лазерной установки. Качественная и количественная характеристика биоприпоя**

Для проведения экспериментально-хирургической операции по сшиванию сосудистой стенки и кожи нами была использована специальная установка, разработанная и сконструированная специалистами ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет «Московский институт электронной техники» [123]. Установка состоит из нескольких основных модулей: оптический модуль обеспечивает генерацию и передачу лазерного излучения к объекту спаивания, температурный модуль обеспечивает непрерывное измерение и постоянное поддержание температуры (температурную обратную связь) шва; модуль управления обеспечивает

задание необходимых параметров процедуры сшиванию сосудистой стенки и кожи.

Оптический модуль изготовлен на базе полупроводникового галиево-алюминиевого-мышьякового (GaAlAs) лазера, генерирующего непрерывное излучение с длиной волны равной  $807 \pm 4$  нм и максимальной допустимой мощностью лазерного излучения 5 Вт. При этом необходимо подчеркнуть, что длины волн в ближней инфракрасной области спектра широко используются для проведения лазерных хирургических операций. Лазерное излучение передается к области формирования соединения с помощью оптоволоконна диаметром 600 мкм. Далее с помощью коллиматора с фокусным расстоянием равным 10,99 мм формируется плоско-параллельный пучок излучения. Диаметр пучка лазерного излучения составляет около 2 мм.

Температурный модуль необходим для минимизации риска температурного некроза мягких тканей. Для этого осуществляется непрерывный контроль и поддержание заданной температуры в области формирования соединения (температурная обратная связь).

При измерении температуры мягких тканей в процессе лазерного восстановления целостности тканей, необходимо учитывать следующие ограничивающие факторы: резкий контраст температур между зонами воздействия лазерного излучения и окружающими здоровыми тканями, малую область измерения (около 2 мм в диаметре), резкий нагрев и охлаждение измеряемой поверхности.

Для достижения максимальной точности измерения температуры в области формирования спаянного соединения и снижения влияния ограничивающих факторов в разработанной лазерной установке используется инфракрасный (ИК) датчик температуры с разрешением 4x16 пикселей. Из матрицы температур выбирается максимальное значение, по которому регулируется мощность лазерного излучения. Данный алгоритм исключает возникновение ошибки, вызванной удалением от спаянного соединения тканей точки пересечения оптических осей лазерного излучения и ИК датчика

температуры. Описанный метод позволяет достичь погрешности контроля температуры в диапазоне 0,5°C.

Для поддержания заданной температуры, мощность лазерного излучения регулируется пропорционально-интегрально-дифференцирующим регулятором (ПИД-регулятор). ПИД-регулятор постепенно снижает мощность, подаваемую на нагреватель, по мере установки заданной температуры. В нашем случае это сила тока, подаваемая на лазерный диод источником питания. После стабилизации температуры, мощность  $N$ , которая должна выделяться нагревателем, выраженная в процентах от его максимальной мощности, рассчитывается по формуле:

$$N(t) = P + I + D = K_p e(t) + K_i \int_0^t e(\tau) d\tau + K_d \frac{de}{dt}, \quad (1)$$

где  $K_p$ ,  $K_i$ ,  $K_d$  – коэффициенты усиления пропорциональной, интегральной и дифференциальной составляющих регулирования мощности,  $P$  – пропорциональная составляющая, прямо пропорциональная разности между установленным значением температуры и фактическим измеренным значением температуры,  $I$  – интегральная составляющая, равная величине тепловой мощности, необходимой для компенсации тепловых потерь при  $\Delta T = 0$ ,  $D$  – дифференциальная составляющая, пропорциональная скорости изменения температуры с обратным знаком и препятствующая резким изменениям температуры объекта. При лазерном восстановлении мягких тканей все коэффициенты необходимо подбирать индивидуально.

На рисунке 3 представлена схема устройства лазерной установки. Лазерное излучение выходя волокна с коллиматором (1) падает на биологическую ткань (2). Регистрация температуры осуществлялась с помощью ИК датчика температуры (3) с определенной области спаивания (4). ИК датчик температуры позволяет определить наиболее нагретую точку сканируемой области. Далее температура самой нагретой точки передается на микроконтроллерный блок, который обеспечивает регулировку силы тока

лазерного диода. Таким образом, осуществляется поддержание температуры нагрева лазерного пучка с точностью до  $0,5^{\circ}\text{C}$ . Задание необходимого значения температуры нагрева шва осуществляется перед проведением экспериментально-хирургической операции с помощью специально разработанного программного обеспечения для управления установкой. Изображение с распределением температуры по области воздействия лазерного излучения показано на рисунке 3 (b).

Программа позволяет осуществлять непрерывный мониторинг динамического изменения температуры сварного шва и мощности лазерного излучения. Однако, предварительно необходимо провести калибровочные исследования для того или иного типа биологической ткани и состава лазерного припоя. Подбор коэффициентов ПИД регулятора, обеспечивающих наиболее быстрое установление заданной температуры и точное её поддержание осуществлялся с помощью алгоритма.

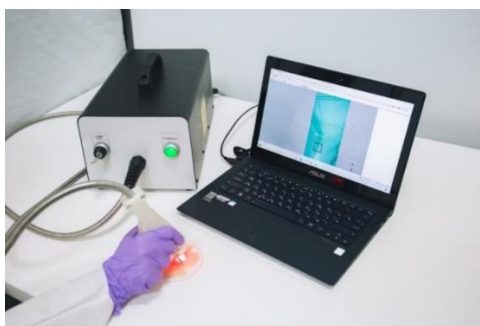
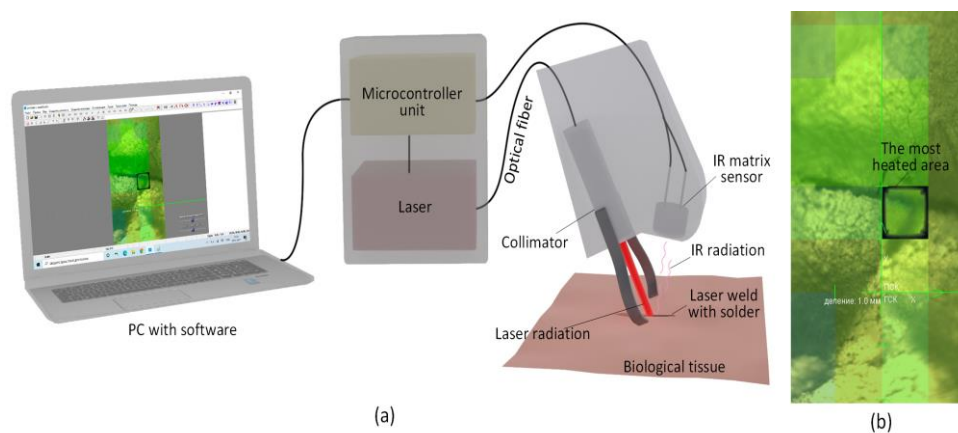


Рисунок 3 – Схема установки для спаивания мягких тканей (a), изображение с распределением температуры по области воздействия лазерного излучения в программном обеспечении (b) (Рисунок используется с разрешения автора, Герасименко А.Ю. [123])

## 2.4.1 Качественная и количественная характеристика биологического состава

Для осуществления лазерного соединения мягких тканей учеными ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет «Московский институт электронной техники» был разработан биологический состав, в состав которого входят: бычий сывороточный альбумин (чистота 99%, BioClot, Германия) с концентрацией 25% (по весу), индоцианин зеленый (Merck Sigma-Aldrich, США) с концентрацией 0,1% (по весу), одностенные углеродные нанотрубки (Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка, Россия) с концентрацией 0,1% (по весу) и дистиллированная вода. Предложенный композиционный состав позволяет формировать электропроводящие нейроинтерфейсные структуры *in situ*, создавая комплексы между соседними дендритными компартментами, тем самым повышая возбудимость отдельных нейронов и поддерживая адгезию и рост нейронов.

Для изготовления биологического состава осуществлялось несколько шагов. Изначально была приготовлена гомогенная водная дисперсия одностенных углеродных нанотрубок с использованием ультразвукового гомогенизатора при 40 Вт в течение 45 минут. Это было необходимо для равномерного распределения нанотрубок по объему воды. Нанотрубки обладают гидрофильными свойствами, за счет функционализации карбоксильными группами. Далее в дисперсию одностенных углеродных нанотрубок добавляли индоцианин зеленый и бычий сывороточный альбумин при непрерывном механическом перемешивании в течение 30 минут. После этого нанокompозитный биоприпой помещали в ультразвуковую ванну при 5 Вт на 45 минут для достижения полной однородности припоя. Полученный нанокompозитный биологический припой хранили при температуре 4°C.

Для проведения экспериментально-хирургической операции необходимый объем биосостава нагревали до комнатной температуры.

## **2.5 Методы исследования in vitro**

В культуре фибробластов и эндотелиоцитов человека оценили цитотоксические свойства БС и НОЦ, а также их влияние на генерацию активных форм кислорода, генерацию оксида азота, активность СОД.

### **2.5.1 Методы исследования цитотоксических свойств НОЦ и БС в культуре фибробластов**

Культура фибробластов человека в культуральных флаконах Т-25 была любезно предоставлена сотрудниками лаборатории физиологии и патологии стволовых клеток ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. Клетки инкубировали в среде DMEM/F12 с добавлением по объему 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% противомикробных средств (бензилпенициллина натриевая соль 100 ЕД/мл, 100 мг/мл стрептомицина) в CO<sub>2</sub> инкубаторе во влажной атмосфере, содержащей 5% углекислого газа при температуре 37°C.

Цитотоксичность оценивали при 24-часовой инкубации клеток в присутствии наночастиц диоксида церия и биологического состава, растворенного в среде культивирования в диапазоне концентраций 0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 и 100,0 мг/мл. Для исключения морфологических изменений фибробластов учет результатов проводили в инвертном микроскопе Axiovert (Carl Zeiss, Германия).

Оценку выживаемости клеток по уровню митохондриальной активности проводили в тесте с триметилтетразолием хлоридом (МТТ, Merck Sigma-Aldrich, Германия). Тест проводили следующим образом: раскапанную культуру клеток в 96-луночном планшете инкубировали в течение 24 часов в

присутствии с НОЦ в упомянутом диапазоне концентраций (по 3 лунки на каждую концентрацию). Через сутки среду с НОЦ удаляли и клетки инкубировали в течение 4 часов в среде, содержащей 10% по объему триметилтетразолий хлорид. В забранную после инкубации культуральную среду добавляли изопропановую кислоту для растворения образовавшегося формазана. После этого образцы среды подвергали фотометрированию при длине волны 570 нм на полуавтоматическом ридере StatFax (Awareness Technology, США).

### **2.5.2 Методы определения активности супероксиддисмутазы (СОД) в культуре фибробластов**

Для определения активности фермента – антиоксиданта в культуре фибробластов человека под действием наночастиц диоксида церия применяли диагностический набор SOD assay kit (Merck Sigma Aldrich, Германия). Для изучения активности СОД культуру фибробластов раскапывали в лунки 24-чуночного планшета и инкубировали в течение суток при стандартных условиях. Затем еще на сутки вносили НОЦ в исследуемой концентрации, после чего трипсинизировали клетки и добивались их лизиса путем серии размораживаний и заморозок. Гомогенат клеток с добавлением забуференного стерильного 0,9% физиологического раствора хлорида натрия в течение 5 мин центрифугировали при 2500 g с охлаждением до 4°C. Супернатант собирали, 20 мкл отправляли для анализа в полуавтоматическом ридере StatFax (Awareness Technology, США) при длине волны 455 нм.

### **2.5.3 Методы исследования цитотоксических свойств НОЦ в культуре эндотелиальных клеток**

Для оценки влияния наночастиц диоксида церия использовали культуру эндотелиальных клеток пупочной вены человека (АТСС, США). Инкубация

клеток не отличалась от вышеописанной за исключением того, что в культуральную среду добавляли факторы роста эндотелия сосудов производства Cell Applications (США). Дальнейшие процедуры культивации клеточной линии, инкубации ее в присутствии различных концентраций НОЦ не отличаются от таковых, описанных в п. 2.6.1. Определение жизнеспособности эндотелиальных клеток в присутствии наночастиц диоксида церия проводили также с помощью МТТ-теста.

#### **2.5.4 Метод определения внутриклеточных реактивных форм кислорода в эндотелиоцитах**

Определяли влияние инкубации клеток эндотелия в присутствии НОЦ на внутриклеточную продукцию реактивных форм кислорода в виде пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) и супероксид-аниона ( $O_2^{\cdot-}$ ). Внутриклеточную концентрацию пероксида водорода определяли в реакции клеток дихлородигидрофлюоресцеина диацетатом, легко проникающим внутрь клетки и при взаимодействии с  $H_2O_2$  образующим флюоресцирующий продукт дихлородигидрофлюоресцеин. Для этого в лунки 96-луночного планшета с клеточной культурой вносили по 100 мкл красителя на 55 мин в концентрации 50 мкМ. После этого образцы среды подвергали фотометрированию на полуавтоматическом ридере StatFax (Awareness Technology, США).

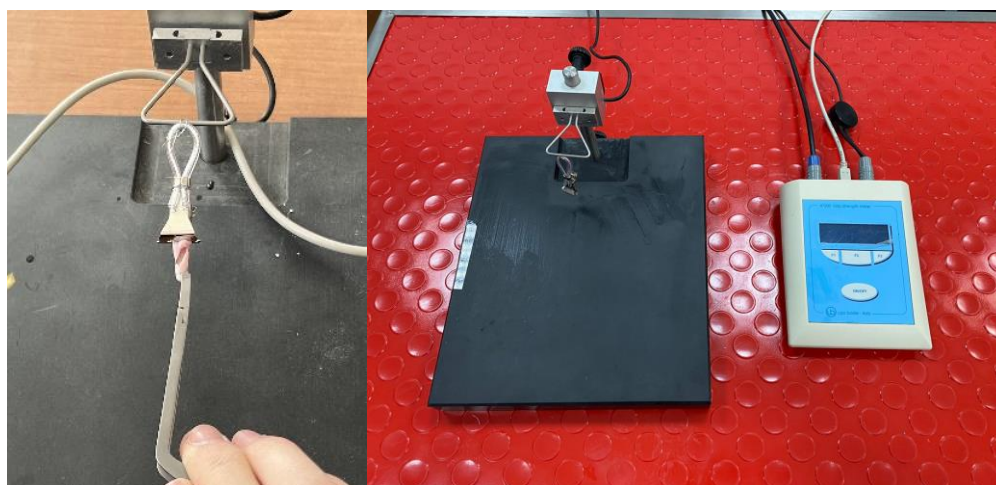
Сенглетный кислород специфически реагирует с проницаемым через клеточную мембрану дигидроэтидием, в результате чего образуются красные продукты реакции этидий и 2-гидроэтидий. Последние вследствие высокого тропизма к молекулам ДНК интенсивно прокаршивают ядра клеток. Для оценки уровня  $O_2^{\cdot-}$  культуры инкубировали в присутствии 5 мкМ дигидроэтидия на протяжении 30 мин с последующей регистрацией аутофлюоресценции.

Для определения внутриклеточной концентрации оксида азота применяли традиционный фотометрический способ с реактивом Грисса (раствор сульфаниловой кислоты и альфа-нафтиламина в уксусной кислоте). При этом формируется нитрит-анион, который регистрируется фотометрически на полуавтоматическом ридере StatFax (Awareness Technology, США). Эксперимент проводили следующим образом: через 24 часа после инкубации культур клеток в присутствии НОЦ клетки трижды отмывали в забуференном 0,9% изотоническом растворе хлорида натрия, после чего инкубировали в течение 5 часов с реактивом Грисса, после образования продукта реакции проводили измерение оптической плотности среды при длине волны 540 нм.

#### **2.5.5 Метод определения биомеханических свойств лазерного соединения фрагментов кожи и кровеносного сосуда *in vitro***

Фрагменты биологического материала (полоски кожи размером 3 x 2 см, фрагменты брюшной аорты длиной 3-4 см) получали от выводимых из эксперимента экспериментальных животных.

Прочность лазерного и шовного соединений оценивали с использованием динамометра (Ugo Basil, Италия). Полоски кожи, содержащие узловый шов и лазерное соединение помещали в прибор таким образом, чтобы направление соединения тканей было перпендикулярно направлению движения зажимных устройств. После этого прикладывали линейную силу для разрыва соединения с регистрацией максимально приложенной силы в Ньютонах, которая приводила к разрыву соединения (рисунок 4).



А

Б

Рисунок 4 – Измерение прочности на разрыв лазерного соединения (А) и экспериментальная установка на основе динамометра производства Ugo Basil, Италия

### **2.5.6 Метод определения проницаемости мембран фибробластов для наночастиц диоксида церия различного размера**

Флюоресцентный краситель FITC (fluorescein isocyanite, Thermo Fisher Sci. Inc., США) был конъюгирован с поверхностью лазерно-аблированных наночастиц оксида церия размером фрагментов до 15 нм и 15-100 нм для визуализации материала. Первичная культура фибробластов была посажена в 96-луночный планшет в концентрации  $200 \times 10^3$  клеток/мл. Культивацию клеточной культуры проводили при 37°C в 5% атмосфере CO<sub>2</sub>-инкубатора в течение двух суток до достижения конфлюэнтного состояния.

Для исследования эндоцитоза наночастиц, 1 мл коллоидного раствора FITC-CeO (1 мг/мл) в зависимости от размера фракции наночастиц добавили в чистую среду ДМЕМ (Диаэм, Россия). Затем из лунок была убрана питательная среда, проведена отмывка клеток с помощью фосфатно-буференного изотонического 0,9% раствора хлорида натрия, и 100 мкл раствора FITC-CeO в ДМЕМ были добавлены к клеткам.

Ко-инкубацию проводили в течение часа при 37°C в 5% атмосфере CO<sub>2</sub>-инкубатора.

После этого, для уменьшения фоновой флюоресценции, а также удаления не связанных частиц, раствор наночастиц убирали и промывали лунки с помощью с помощью фосфатно-забуференного изотонического 0,9% раствора хлорида натрия трехкратно.

Затем клетки были изучены на флюоресцентном микроскопе, интенсивность внутриклеточной флюоресценции измерена.

## **2.6 Методы экспериментально-хирургического исследования**

Экспериментально-хирургический раздел работы проведен на лабораторных крысах и кроликах, а также на изолированных полосках кожи лабораторной крысы и участке брюшной аорты кролика.

### **2.6.1 Лабораторные животные**

Эксперименты выполнены на 60 лабораторных беспородных белых крысах обоего пола весом 200-220 г. и 60 лабораторных кроликах-самцах весом 3000-3500 г. породы «Советская шиншилла», приобретенных в питомнике «Столбовая» – филиале ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Партии лабораторных животных были снабжены ветеринарными сертификатами и содержались до использования в виварии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), в периоперационном периоде – в лаборатории молекулярно-клеточных технологий и экспериментальных исследований ИФИБ ФГАОУ ВО «НИЯУ МИФИ». Крысы содержались по 5 особей в пластиковых клетках, снабженных решетчатой крышкой из нержавеющей стали, съемными поилками и кормушками. Кролики содержались в индивидуальных клетках из нержавеющей стали, установленных на специальном стеллаже из того же материала.

Кормление животных осуществлялось специальным кормом: крыс – гранулированным сбалансированным кормом, кроликов – сбалансированным комбикормом, приобретенными у поставщика лабораторных животных. Подстил из стружки деревьев лиственных пород меняли 1 раз в 7 дней, водопроводную воду – ежедневно.

Накануне проведения экспериментально-хирургического вмешательства животные ограничивались в пище без ограничения потребления воды. После выполнения интервенции животные рассаживались в индивидуальные клетки для ограничения возможности дополнительной травматизации и проявлений агрессивного поведения.

Формирование экспериментальных групп осуществлялось в соответствии с принципами гуманности и максимальной экономии числа животных для достижения репрезентативных результатов. В этой связи в каждую группу включали не более 5 животных каждого вида, при этом в зависимости от вида интервенции (узловой шов, лазерное соединение) формировали серии из трех групп в соответствии со сроками выведения из эксперимента – на 7, 14 и 21 сутки.

Краткая характеристика экспериментальных групп представлена в таблице 2.

Все эксперименты с участием лабораторных животных выполняли при адекватном обезболивании. Для этих целей применяли анестезиологическую приставку для лабораторных грызунов RWD Bioscience Technology (Китай) и ингаляцию изофлураном ветеринарным (Германия). Кроликов оперировали также под ингаляционным наркозом изофлураном в условиях экспериментальной операционной и ИВЛ.

Выведение животных из эксперимента осуществляли на 7, 14 и 21 сутки по 5 случайным образом отобранных особей в каждой серии путем внутривенного введения углекислоты под ингаляционным наркозом.

Таблица 2 – Краткая характеристика экспериментально-хирургических групп животных

<b>Вид животных</b>	<b>Экспериментальная серия</b>	<b>n</b>	<b>Проводимые исследования</b>
<i>Восстановление целостности кожи</i>			
Лабораторные беспородные белые крысы обоего пола	Узловой шов	15	Скорость заживления раны Прочность соединения на разрыв Морфологическая и иммуногистохимическая картина области раневого дефекта Биомеханический и структурный анализ соединения
	Узловой шов + НОЦ местно	15	
	Лазерное соединение +БС	15	
	Лазерное соединение +БС+ НОЦ местно	15	
<i>Восстановление целостности кровеносного сосуда</i>			
Кролики-самцы породы «Советская шиншилла»	Узловой шов	15	Оценка герметичности Оценка выживаемости экспериментальных животных Биомеханический и структурный анализ соединения, скорость кровотока
	Узловой шов +НОЦ	15	
	Лазерное соединение +БС	15	
	Лазерное соединение +БС+ НОЦ местно	15	

На всем протяжении последующего наблюдения за животными проводили мониторинг болевого синдрома с помощью мимической шкалы для крыс и кроликов. В случае появления признаков тяжелого и

средней степени тяжести болевого синдрома животным внутрижелудочно вводили кетопрофен из расчета 50 мг/кг для крыс и 15 мг/кг для кроликов.

### **2.6.2 Метод проведения лазерного соединения кожи с помощью биологического состава на фоне обработки области шва НОЦ**

Исследование выполняли на лабораторных крысах с линейной полнослойной кожной раной. Половозрелое лабораторное животное за сутки лишали доступа к корму при сохранении свободного доступа к воде.

В день исследования крысу наркотизировали ингаляцией изофлурана ветеринарного (Германия) при помощи анестезиологической приставки для лабораторных грызунов RWD Bioscience Technology (Китай) и укладывали на подогреваемый хирургический операционный стол для мелких животных. На холке сбривали шерсть, кожу обрабатывали раствором этилового спирта, размечали и выполняли острым способом продольный разрез в каудальном направлении длиной 3 см.

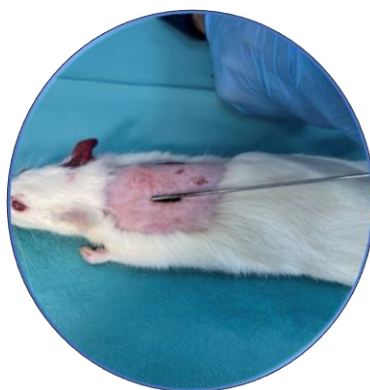
После выполнения разреза в соответствии с планом рандомизации все животные были разделены на 4 серии: крысам первой серии ( $n = 15$ ) с помощью наложения традиционных узловых с помощью нитей Prolene 5.0 (Ethicon Inc., США); крысам второй серии после наложения узловых швов ежедневно в течение 10 суток, начиная с первых на область раневого дефекта наносили 1% спрей, содержащий НОЦ 1 раз в сутки. Животным 3 – 4 серий осуществляли лазерное соединение краев линейной полнослойной раны кожи: в третьей серии ( $n = 15$ ) использовали БС на основе углеродных нанотрубок, в четвертой серии ( $n = 15$ ) использовали БС на основе углеродных нанотрубок с нанесением ежедневно в течение 10 суток, начиная с первых, на область раневого дефекта 1% спрея, содержащего НОЦ 1 раз в сутки (рисунок 5).

Животных описанных серий выводили из эксперимента под ингаляционным наркозом: первая группа в серии, состоящая из 5 особей,

выводилась на 7 сутки, тогда как вторая третья, также состоящая из 5 лабораторных крыс, выводилась на 14 и 21 сутки опыта.



Формирование  
линейной раны



Нанесение БС,  
содержащего  
углеродные нанотрубки



Лазерное соединение

Рисунок 5 – Этапы лазерного соединения кожи с помощью биологического состава

Биомеханические свойства (прочность) лазерного и шовного соединений оценивали на 7, 14 и 21 сутки после выполнения экспериментально-хирургической манипуляции. Для этого использовали специальный аппарат «Mini Bionix II tensile testing machine» производства MTS Systems (США). Полоски кожи, резецированные у выведенных из эксперимента лабораторных животных, содержащие узловый шов и лазерное соединение, помещали в прибор таким образом, чтобы направление соединения тканей было перпендикулярно направлению движения зажимных устройств. После этого прикладывали линейную силу для разрыва соединения с регистрацией максимально приложенной силы, которая приводила к разрыву соединения, регистрируемого электронным штангенциркулем с точностью измерения до  $10^{-5}$  м. Часть забранного биологического материала подвергали морфологическому, иммуногистохимическому и иммуноферментному

исследованию для определения влияния НОЦ в качестве топического средства на активность тканевой воспалительной реакции.

### **2.6.3 Метод проведения лазерного соединения кровеносного сосуда лабораторного кролика с помощью БС на основе углеродных нанотрубок на фоне обработки области шва НОЦ**

Исследование эффективности соединения кровеносного сосуда лабораторного кролика с помощью БС на основе углеродных нанотрубок на фоне обработки области шва НОЦ наночастиц диоксида церия выполняли на кроликах «Советская шиншилла» с линейной продольной полнослойной раной сосуда. Половозрелое лабораторное животное за сутки лишали доступа к корму при сохранении свободного доступа к воде.

В день исследования кролика наркотизировали ингаляцией изофлурана ветеринарного (Германия) при помощи анестезиологической приставки к аппарату ИВЛ Mindtay Veta 5 (Германия) и укладывали на подогреваемых хирургический операционный стол для мелких лабораторных животных. В положении на спине животное фиксировали, передней брюшной стенке сбривали шерсть, кожу обрабатывали раствором этилового спирта, размечали и выполняли острым способом продольный разрез в каудальном направлении длиной 5 см, осуществляли доступ к брюшной аорте, расположенной в забрюшинном пространстве, фиксировали ее микрососудистых клипсах таким образом, чтобы расстояние между ними не превышало 2 см. В центре выделенного участка проводили полнослойный разрез сосуда протяженностью 5 мм.

После выполнения разреза в соответствии с планом рандомизации все животные были разделены на 5 групп. Первая группа животных была ложнооперированная (ЛО), которой выполняли срединную лапаротомию и затем послойно ушивали рану. Второй группе животных продольный дефект аорты ушивали узловыми швами (УШ) нитью Prolen 7.0 (Ethicon Inc., США);

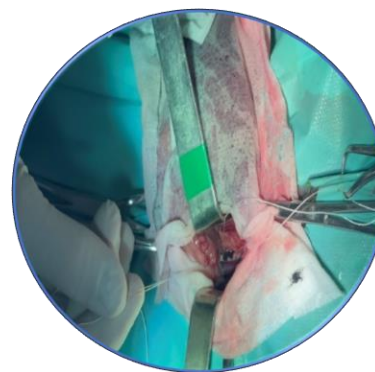
третьей группе, после ушивания дефекта аорты, на область шва распыляли 1% спрей, содержащий наночастицы диоксида церия (УШ+НОЦ); четвертой - после нанесения биологического состава, на дефект стенки сосуда воздействовали лазерным излучением (ЛШ); пятой группе на область, где проводили лазерное соединение, распыляли 1% спрей, содержащий наночастицы диоксида церия (ЛШ+НОЦ).такового (рисунок 6).



Выделение брюшной аорты



Лазерное соединение



Вид лазерного соединения

Рисунок 6 – Этапы лазерного соединения кровеносного сосуда лабораторного кролика с помощью БС на основе углеродных нанотрубок на фоне обработки области шва НОЦ

После наложения швов для подтверждения герметичности соединения наблюдали за сосудом в течение 10 мин после восстановления сосудистого кровотока. Животным внутривенно вводили гепарин в дозе 10 ЕД/кг для профилактики тромбообразования однократно.

Животных описанных серий выводили из эксперимента под ингаляционным наркозом на 7, 14 и 21 сутки опыта, участок сосуда с моделированной патологией извлекали, изучали прочность соединения на разрыв в соответствии с ранее описанной методикой и проводили морфологические исследования.

## 2.7 Морфологические и иммуногистохимические методы исследования

Образцы биологического материала (фрагмент кожи лабораторной крысы, участок брюшной аорты лабораторного кролика) забирали и фиксировали их в забуференном 10% растворе формальдегида, после чего после соответствующей процедуры дегидратации в батарее спиртов возрастающей концентрации заключали в парафин. Все вышеуказанные процедуры проводили в автоматическом режиме на станции марки STP – 120 (Германия) типа «Карусель». Срезы толщиной 4 мкм изготавливали при помощи ротационного микротомы HM340E (Microm Laborgerate GmbH, Германия), окрашивали гематоксилином и эозином по методу Хелендаделя и просматривали в микроскоп OLYMPUS BX51 (Япония), снабженный видеокамерой того же производителя.

Для комплексной оценки степени воспалительной реакции и активности процессов тканевой регенерации при проведении морфометрического анализа применяли программный пакет ImageJ 8.0 (США) и пользовались количественной шкалой, включающей выставление суммарного балла, при этом 0 – неизмененные ткани кожи или сосуда; 1 – незначительные изменения; 2 – патологические изменения средней степени тяжести; 3 – значительные повреждения; 4 – тяжелое повреждение ткани.

Иммуногистохимический (ИГХ) анализ выполняли на автоматическом иммуногистостейнере Ventana (Roche, Швейцария). Использовали коммерческие наборы первичных мышинных моноклональных антител к ламинину  $\alpha$ -1, кроличьих антителах к Caspasa 3, клон E87, Genetex, разведение 1:100, анти-PCNA (клон PC10) (Dako, разведение 1:100, США) антител [19]. Срезы инкубировали с первичными антителами в течение 30 мин. в соответствии с предусмотренной компанией-производителем инструкции к набору антител.

Анализ ИГХ исследования осуществляли в 4 случайных полях зрения при увеличении  $\times 400$ . Для оценки ИГХ реакции на Caspasa 3, PCNA, и Laminin

экспрессию, для чего подсчитывали количество позитивно окрашенных клеток в полях зрения, определяли их отношение к общему числу клеток в исследуемых областях, и полученное отношение выражали в процентах [19].

## **2.8 Изучение скорости кровотока при лазерном соединении сосуда с биологическим составом на основе нанокремнеземных трубок и использования НОЦ**

Скорость кровотока в брюшной аорте кроликов изучали с использованием УЗИ аппарата ветеринарного производства компании Toshiba (Япония) на 7, 14 и 21 сутки после проведения экспериментально-хирургического вмешательства по поводу сшивания магистрального кровеносного сосуда. Кратко протокол эксперимента выглядел следующим образом: бодрствующего животного фиксировали в положении на спине на подогреваемой площадке операционного стола и в режиме доплеровского сканирования регистрировали скорость кровотока в брюшной аорте в области хирургического вмешательства.

## **2.9 Статистический анализ полученных результатов**

При анализе полученных результатов использовали методы описательной и сравнительной статистики. В частности, определяли однородность и дисперсию данных в исследуемых сериях и группах. Нормальность распределения проверяли графически, а также с помощью проведения дисперсионного анализа. В случае нормального распределения признаков для межгруппового сравнения 3 и более групп применяли тест ANOVA (analysis of variance) с последующим использованием теста Тьюки. В случае выявления ненормального распределения для сравнения использовали тест Крускала-Уоллиса. Непараметрические признаки сравнивали с

помощью точного критерия Фишера, позволяющего получать наиболее точные результаты на небольших (до  $n = 10$ ) выборках. Изменение параметров в динамике оценивали при помощи теста Уилкоксона.

Базу данных исследования вели в среде Excel, расчеты проводили на персональном компьютере с процессором М1, применяли лицензионный пакет программ по статистике STATA v. 17.0 (США).

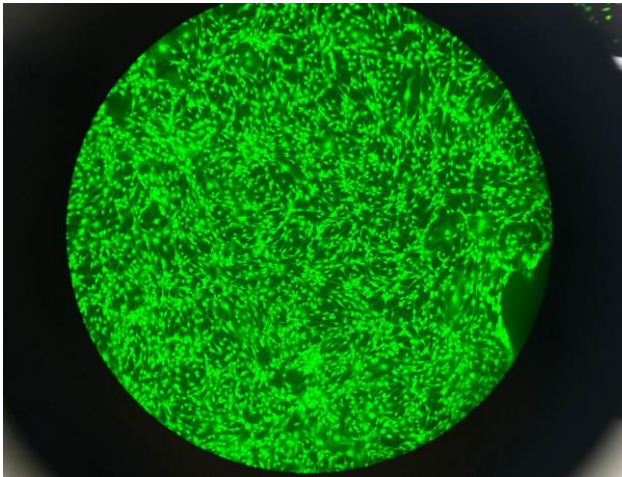
## **РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **ГЛАВА 3 ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ КЛЕТОК**

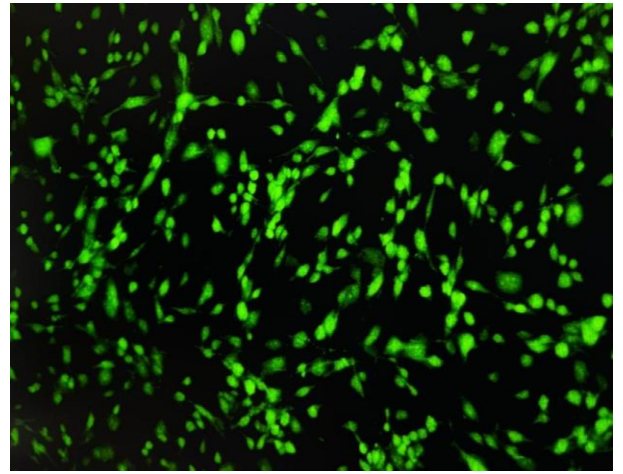
Поскольку в соответствии с целью и задачами настоящей работы нам необходимо проверить гипотезу о безопасности БС и НОЦ было проведено исследование влияния композиций, содержащих наночастицы церия и углерода на основные клеточные популяции кожной раны и кровеносного сосуда. В связи с этим в качестве объекта исследования на данном этапе работы мы выбрали культуры фибробластов и эндотелиальных клеток человека. Помимо выживаемости, нам было чрезвычайно важно узнать, каким образом различные концентрации наночастиц оксида церия влияют на продукцию реактивных форм кислорода, активность антиоксидантных систем клетки и иные функциональные свойства.

#### **3.1 Проницаемость мембран фибробластов для наночастиц диоксида церия в зависимости от размера рабочей фракции**

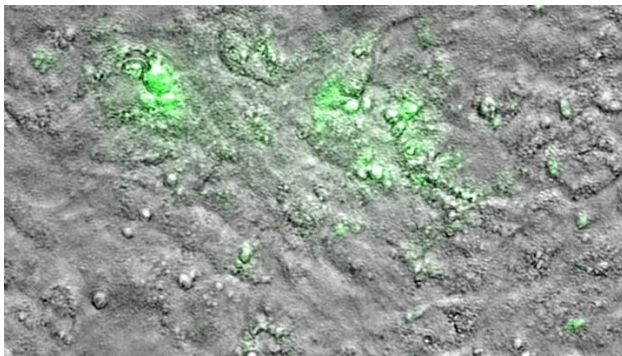
Ввиду того, что используемый в работе метод получения НОЦ позволяет наработать наночастицы с различным размером фракции, а по данным литературы нам хорошо известно, что наночастицы церия различных размеров отличаются по видам биологического эффекта, в частности, по влиянию на свободнорадикальные реакции и динамику и направления воспалительного процесса, нам необходимо было принять решение о возможности изучения менее токсичной фракции от 15 до 100 нм в своей экспериментальной работе. Для этого изучили процесс эндоцитоза крупных фракций НОЦ в фибробласты человека с использованием меченных флюоресцеиновым красителем НОЦ и регистрации флюоресценции клеток культуры. Результаты представлены на рисунках 7 и 8.



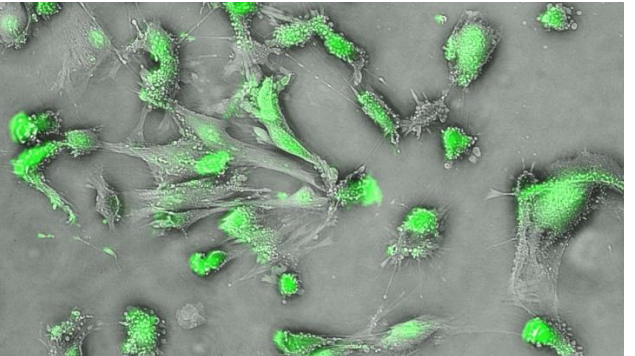
А



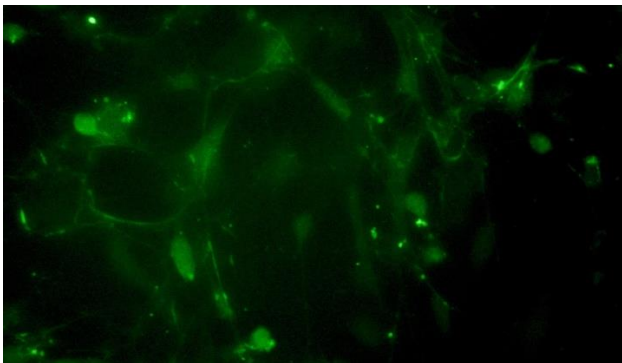
Б



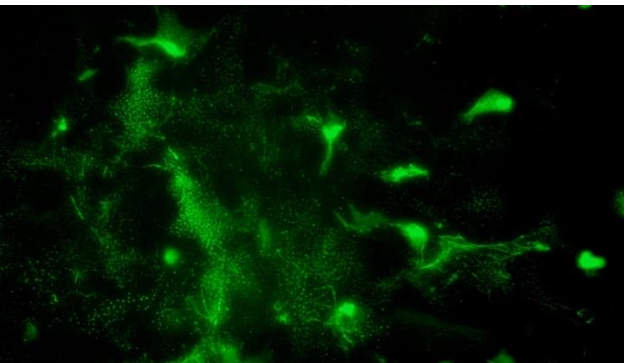
В



Г



Д



Е

Рисунок 7 – Флюоресценция фибробластов через 2 часов после инкубации в присутствии FIST-CeO в зависимости от размера фракций наночастиц: А, Б – картина флюоресценции в объективе микроскопа; В, Г – сканирующая конфокальная микроскопия эндосом с НОЦ размер фракции до 15 нм и до 100 нм; Д – в присутствии аминазина, НОЦ на мемтане клеток; Е – без аминазина, НОЦ в эндосомах фибробластов

Как хорошо видно, НОЦ размером до 15 нм свободно проникают внутрь фибробластов, в том числе методом пассивной диффузии. Использование более крупной фракции НОЦ (размером от 15 до 100 нм) сопровождается замедлением диффузии в клетку и зависит от активности эндоцитоза, что наглядно продемонстрировали эксперименты с добавлением в среду культивирования ингибитора образования эндосом – нейролептика аминазина. При этом, активный эндоцитоз обеспечивает сопоставимое с мелкими фракциями поступление крупной фракции НОЦ внутрь клетки (Рисунок 8).

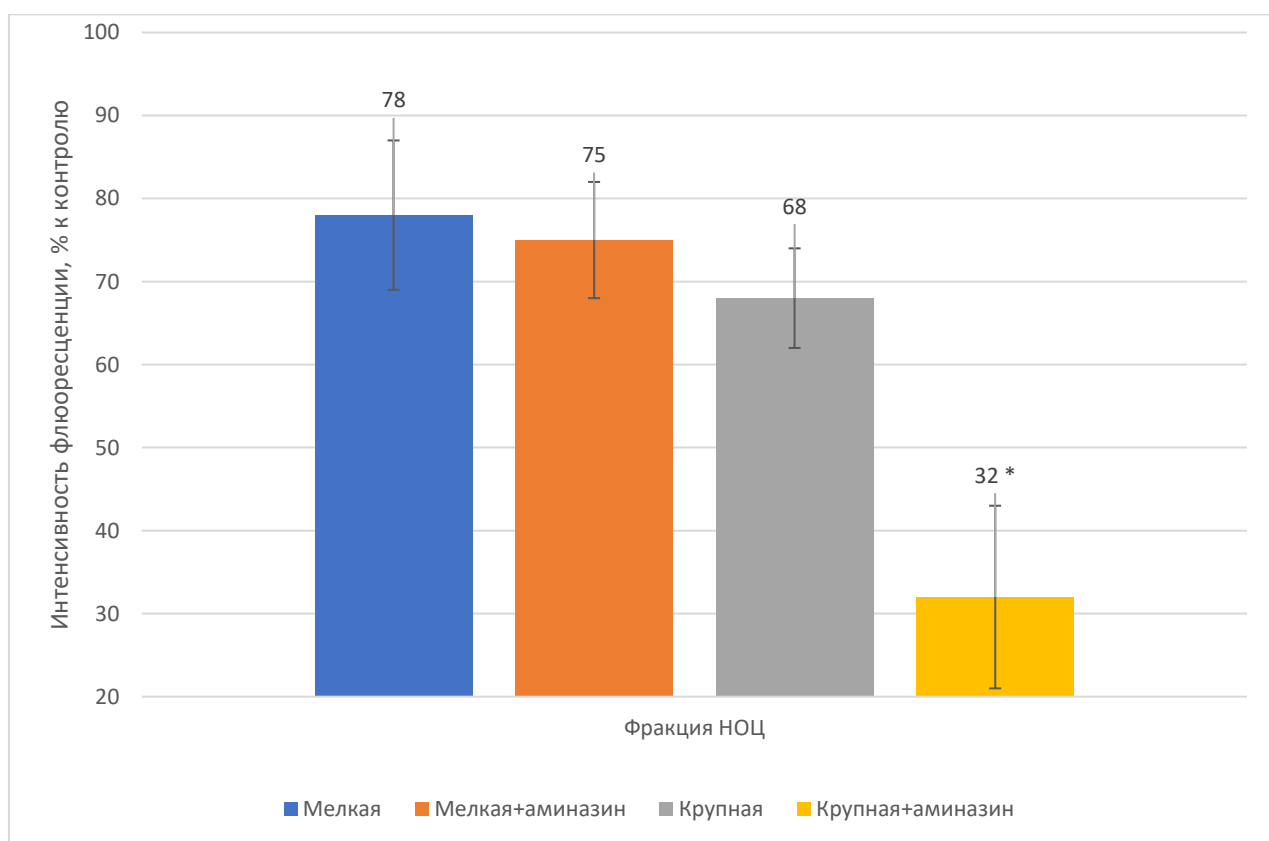


Рисунок 8 – Интенсивность флюоресценции (в % к контрольным значениям) в культуре фибробластов человека при 2-часовой инкубации в присутствии FICT-SeO в зависимости от размера фракций наночастиц (n = 3 для каждой концентрации); \* различия достоверны при сравнении с предыдущими группами (тест Крускала-Уоллиса)

Следовательно, для целей настоящего исследования возможно применение в составе топической формы НОЦ крупной фракции наночастиц диоксида церия с размером фракции от 15 до 100 нм для предотвращения формирования дополнительных токсических эффектов и гиперактивации свободнорадикальных реакций.

### **3.2 Токсические эффекты наночастиц диоксида церия в культуре клеток фибробластов**

Культура фибробластов человека была любезно предоставлена сотрудниками лаборатории физиологии и патологии стволовых клеток ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России<sup>1</sup>. Клетки инкубировали в среде DMEM/F12 с добавлением по объему 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% противомикробных средств (бензилпенициллина натриевая соль 100 ЕД/мл, 100 мг/мл стрептомицина) в CO<sub>2</sub> инкубаторе во влажной атмосфере, содержащей 5% углекислого газа при температуре 37°C. Цитотоксичность оценивали при 24-часовой инкубации клеток в присутствии НОЦ, растворенных в среде культивирования в диапазоне концентраций 0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 и 100,0 мг/мл. Для исключения морфологических изменений фибробластов учет результатов проводили в инвертном микроскопе Axiovert (Carl Zeiss, Германия). Результаты представлены на Рисунке 9.

Как хорошо видно, в диапазоне концентраций от минимальной 0,001 мг/мл до 10,0 мг/мл наночастицы диоксида церия не вызывают статистически значимых изменений доли выживших клеток в культуре фибробластов по сравнению с культурой, не подвергавшейся воздействию НОЦ. Увеличение концентрации до 100,0 мг/мл приводит к небольшому росту цитотоксичности

---

<sup>1</sup> Выражаем признательность заведующему лабораторией д.б.н. Е.Ю. Осиповой за любезно предоставленные клеточные культуры

со снижением доли выживших клеток до  $95 \pm 1\%$ , однако имеющему статистическую значимость при сравнении как с интактной культурой, так и с точками 0,001 и 10,0 мг/мл.

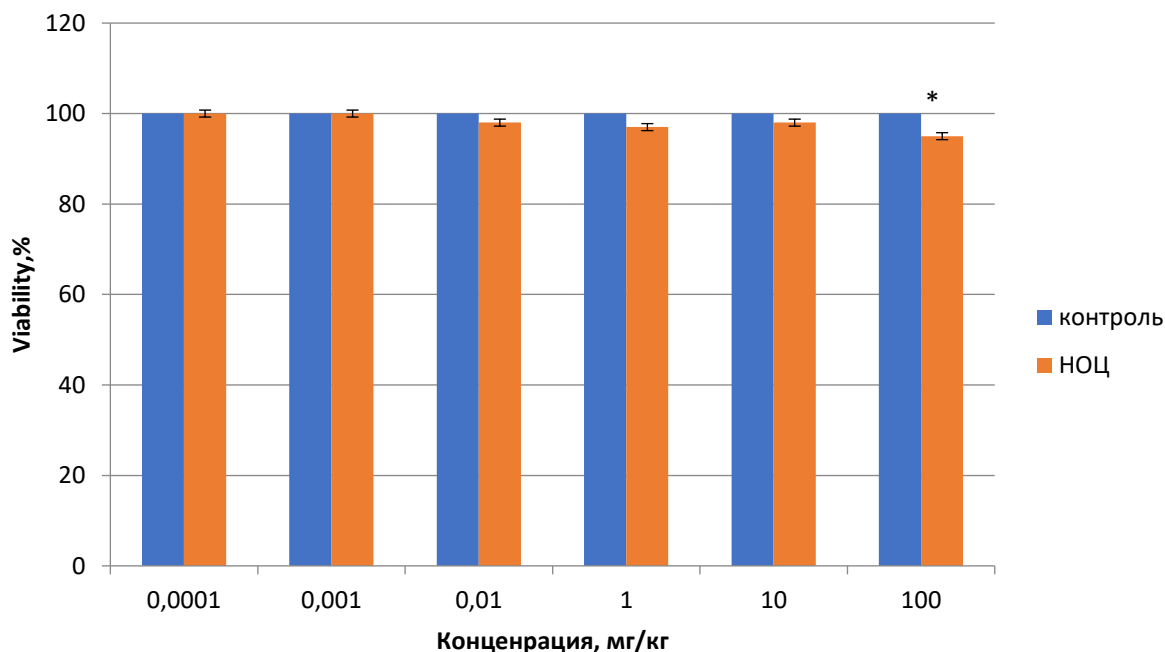


Рисунок 9 – Выживаемость фибробластов человека при 24-инкубации в присутствии НОЦ в диапазоне концентраций от 0,001 до 100,0 мг/мл ( $n = 3$  для каждой концентрации); \*  $p < 0,05$  различия достоверны при сравнении с точками 0,001 и 10,0 мг/мл (тест Крускала-Уоллиса)

### 3.3 Токсические эффекты БС при лазерном воздействии на культуру клеток фибробластов

Токсические эффекты биологического состава, содержащего сывороточный альбумин 25 масс.%, индоцианин зелёный 0,1 масс.%, одностенные углеродные нанотрубки 0,1 масс.%, воду оценивали при воздействия лазерного излучения оценивали через 3, 24, 48 и 72 часа. Результаты представлены на рисунках 10 и 11. Было показано, что воздействия лазерного излучения на жидкие среды на основе углеродных нанотрубок в культуре клеток фибробластов не только не снижает количество живых фиброюластов, но и приводит к их активной пролиферации к 2 и 3 суткам.

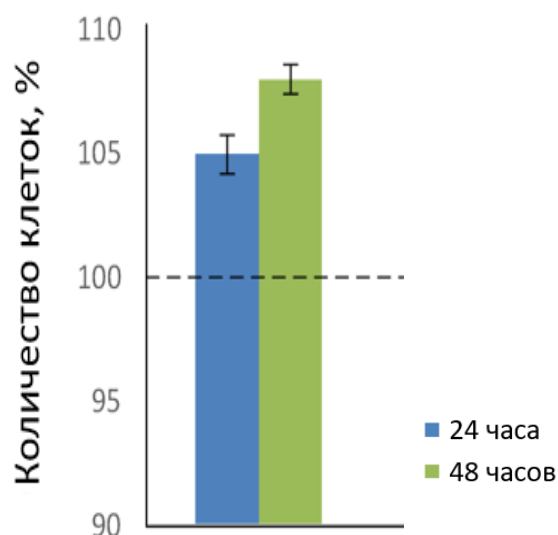
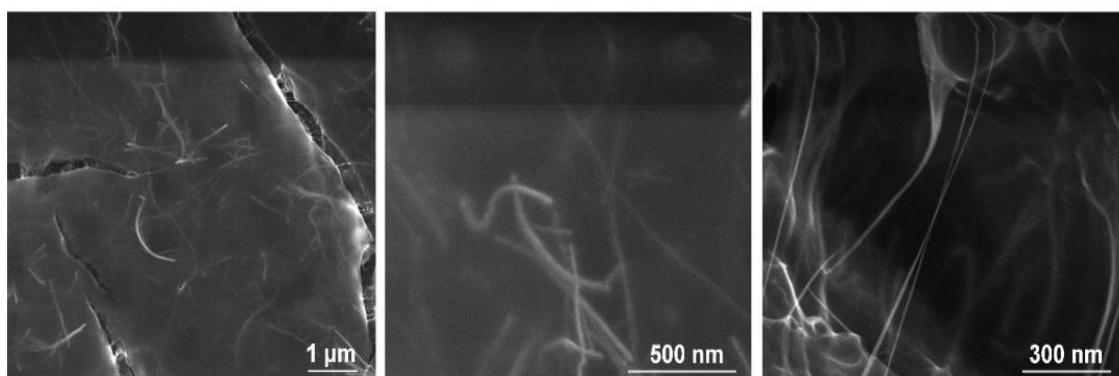


Рисунок 10 – Изображения сканирующей электронной микроскопии образцов, полученных в результате воздействия лазерного излучения на жидкие среды на основе углеродных нанотрубок при разном увеличении (а); количество клеток фибробластов на образце относительно контрольного образца через 24 и 48 ч после начала культивирования (б)

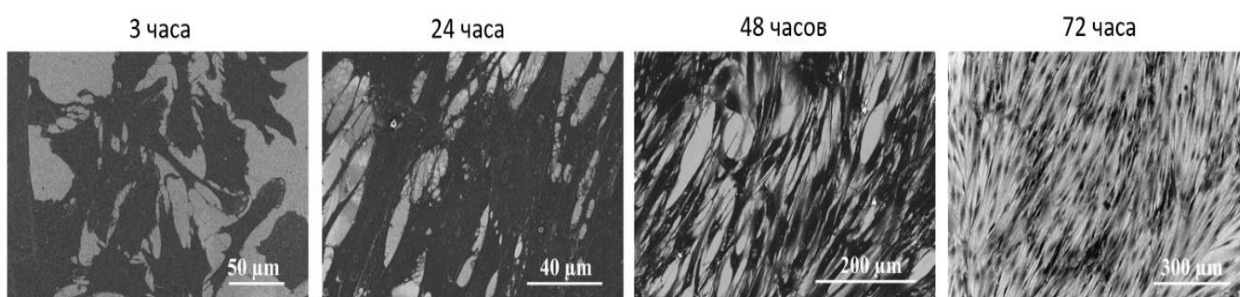


Рисунок 11 – Изображения сканирующей электронной микроскопии фибробластов на образцах, образованных в результате воздействия лазерного излучения на жидкие среды на основе углеродных нанотрубок через 3, 24, 48 и 72 часа после начала культивирования

### **3.4 Влияние НОЦ на внутриклеточную активность супероксиддисмутазы фибробластов**

Для определения активности фермента в культуре фибробластов человека под действием наночастиц диоксида церия применяли специфический диагностический набор SOD assay kit (Merck Sigma Aldrich, Германия). Результаты оценивали фотометрически при длине волны 455 нм.

На Рисунке 12 представлены результаты проведенного исследования по изучению активности СОД в культуре клеток под действием крупных фракций наночастиц диоксида церия. В естественных условиях инкубации фибробластов человека внутриклеточная активность фермента-антиоксиданта СОД колебалась в пределах  $34 \pm 9\%$ . Добавление в инкубационную среду НОЦ в концентрациях от 0,001 до 1,0 мг/мл не сопровождалось статистически незначимыми колебаниями активности супероксиддисмутазы, что свидетельствовало о том, что в указанных концентрациях наночастицы диоксида церия не вызывали избыточную продукцию реактивных форм кислорода и компенсаторное повышение активности СОД – фермента, нейтрализующего такие формы кислорода. Повышение концентрации НОЦ до 10,0 мг/мл приводило к статистически значимому росту внутриклеточной активности супероксиддисмутазы до  $56 \pm 8\%$  ( $p = 0,005$  при сравнении с группой без воздействия НОЦ). Это может означать, что повышение объема наночастиц с высокой поверхностной активностью сопровождается повышением образования активных форм кислорода и вызывает гиперэкспрессию СОД как внутриклеточный компенсаторный механизм.

Нарастание концентрации НОЦ до 100,0 мг/мл вызывало декомпенсацию компенсаторного механизма в виде гиперэкспрессии супероксиддисмутазы и прямо и сильно коррелировало с ростом гибели фибробластов в культуре, зафиксированным нами на предыдущем этапе эксперимента (п. 3.2).

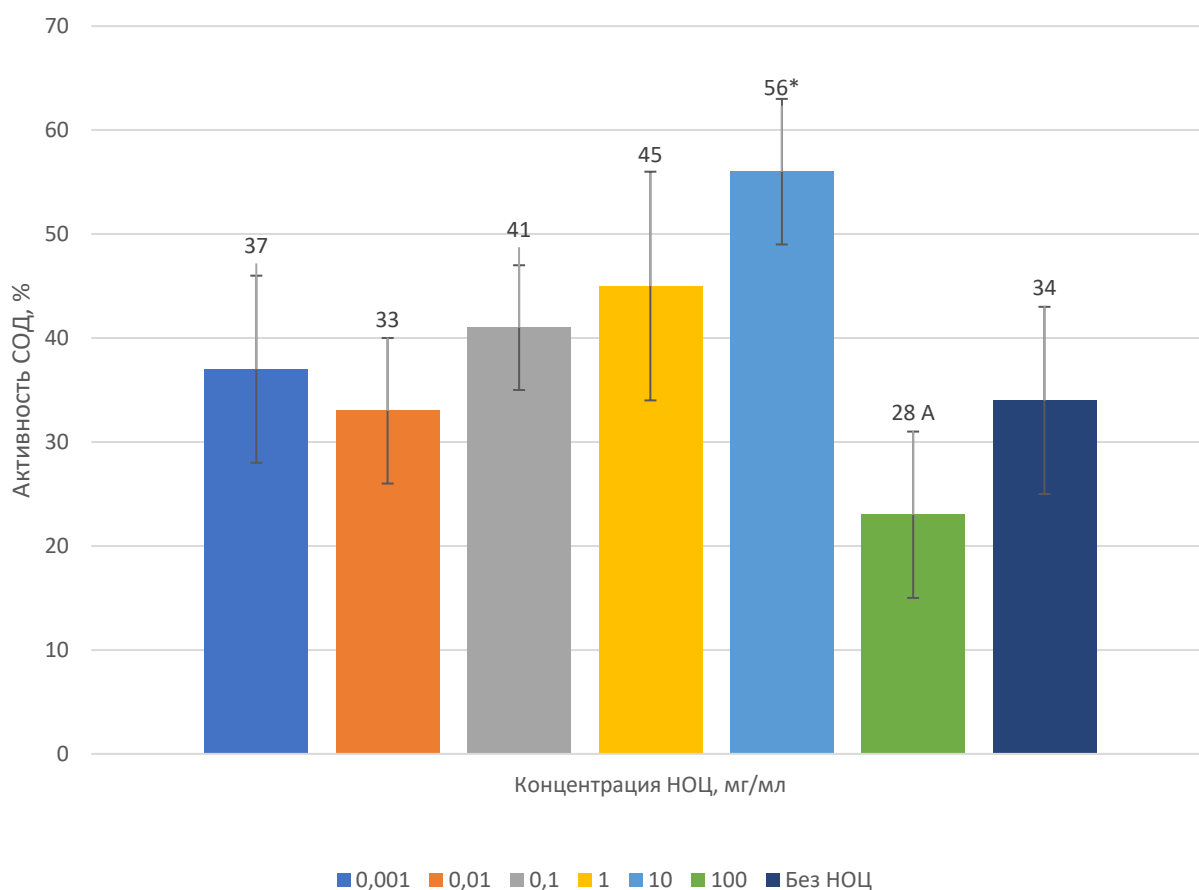


Рисунок 12 – Внутриклеточная активность СОД (в %) в культуре фибробластов человека при 24-инкубации в присутствии НОЦ в диапазоне концентраций от 0,001 до 100,0 мг/мл (n = 3 для каждой концентрации); \* различия достоверны при сравнении с группой без НОЦ; А различия достоверны при сравнении с группами концентраций за исключением 0,01 мг/мл (тест Крускала-Уоллиса)

### 3.5 Токсические эффекты наночастиц диоксида церия в культуре эндотелиоцитов эмбриональной пупочной вены

Для оценки влияния наночастиц диоксида церия использовали культуру эндотелиальных клеток пупочной вены человека (АТСС, США). Инкубация клеток не отличалась от вышеописанной для фибробластов за исключением того, что в культуральную среду добавляли факторы роста эндотелия сосудов производства Cell Applications (США). Дальнейшие процедуры культивации клеточной линии, инкубации ее в присутствии различных концентраций НОЦ не отличаются от таковых, описанных в п. 2.6.1. Определение

жизнеспособности эндотелиальных клеток в присутствии наночастиц диоксида церия также проводили также с помощью МТТ-теста. Рисунок 13 содержит результаты проведенных культуральных экспериментов с клетками эндотелия эмбриональной пупочной вены.

Как хорошо видно, в диапазоне концентраций от минимальной использованной 0,001 мг/мл до 1,0 мг/мл наночастицы диоксида церия не вызывают статистически значимых изменений доли выживших клеток в культуре эндотелиоцитов эмбриональной пупочной вены человека по сравнению с культурой, не подвергавшейся воздействию наночастицами диоксида церия. Увеличение концентрации до 10,0 мг/мл, а затем и 100,0 мг/мл приводит к прогрессирующему росту цитотоксичности со снижением доли выживших клеток до  $82 \pm 1\%$ , имеющему при этом статистическую значимость при сравнении как с интактной культурой, так и с точками 0,001 – 1,0 мг/мл.

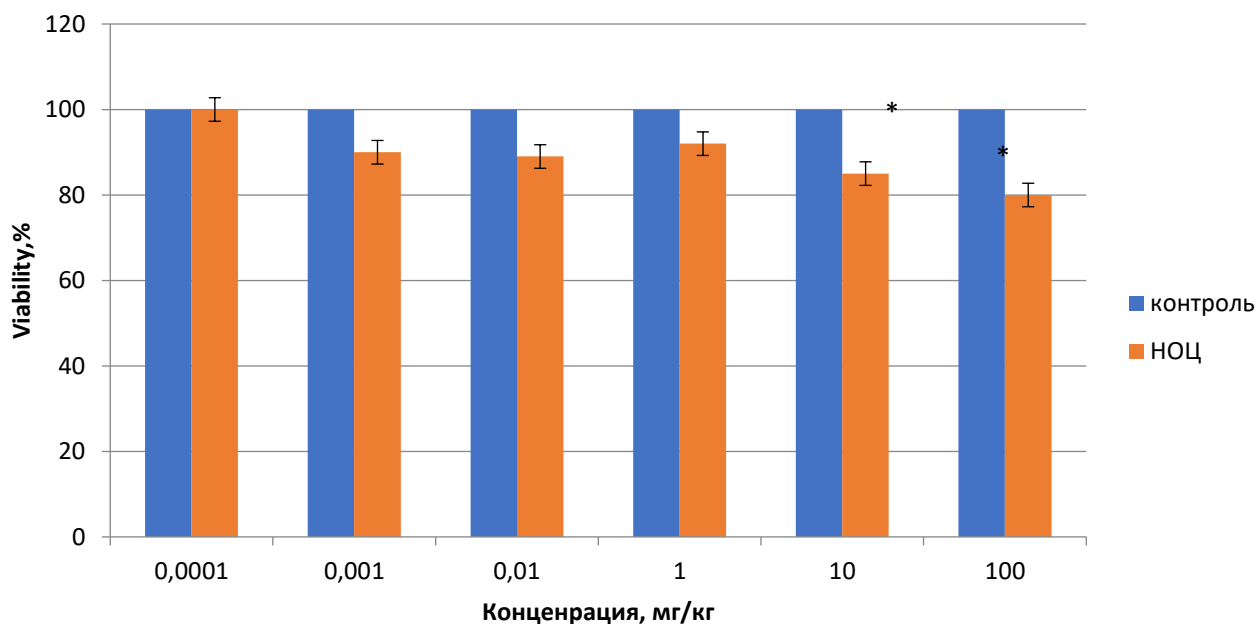


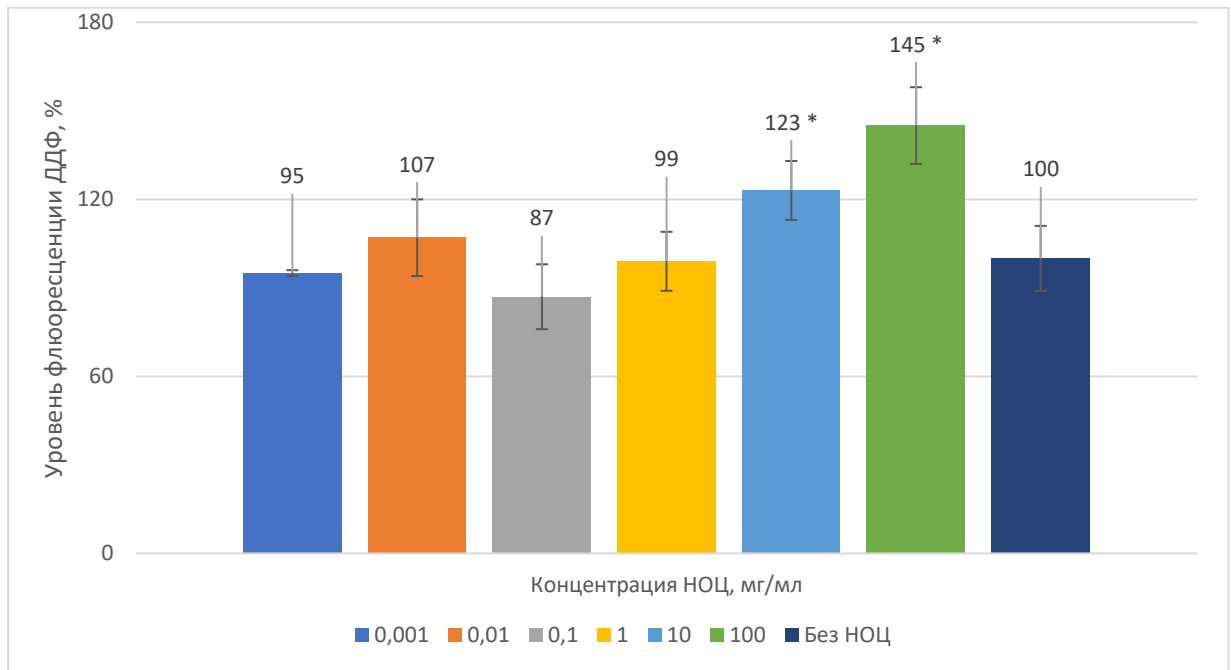
Рисунок 13 – Выживаемость эндотелиоцитов человека при 24-инкубации в присутствии НОЦ в диапазоне концентраций от 0,001 до 100,0 мг/мл ( $n = 3$  для каждой концентрации); \* различия достоверны при сравнении с точками 0,001 и 10,0 мг/мл (тест Крускала-Уоллиса)

### **3.6 Влияние различных концентраций НОЦ на продукцию внутриклеточных реактивных форм кислорода в эндотелиоцитах человека**

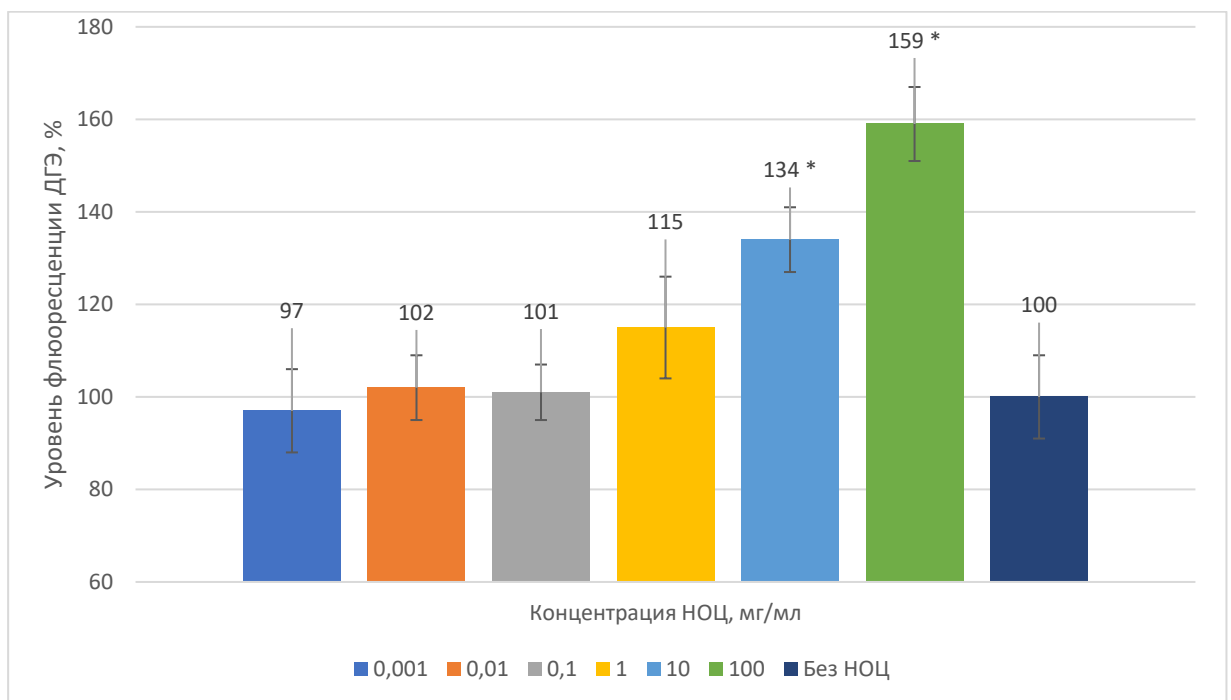
Определяли влияние инкубации клеток эндотелия в присутствии НОЦ на внутриклеточную продукцию реактивных форм кислорода в виде пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) и супероксид-аниона ( $O_2^{\cdot-}$ ). Внутриклеточную концентрацию пероксида водорода определяли в реакции клеток дихлородигидрофлюоресцеина диацетатом, легко проникающим внутрь клетки и при взаимодействии с  $H_2O_2$  образующим флюоресцирующий продукт дихлородигидрофлюоресцеин (ДДФ). Селенитный кислород специфически реагирует с проникаемым через клеточную мембрану дигидроэтидием, в результате чего образуются красные продукты реакции этидий и 2-гидроэтидий. Последние вследствие высокого тропизма к молекулам ДНК интенсивно прокаршивают ядра клеток. Для оценки уровня  $O_2^{\cdot-}$  культуры инкубировали в присутствии 5 мкМ дигидроэтидия (ДГЭ) на протяжении 30 мин с последующей регистрацией аутофлюоресценции.

Уровень внутриклеточного содержания пероксида водорода и активного кислорода представлен на рисунке 14.

При регистрации флюоресценции дихлородигидрофлюоресцеина в присутствии низких концентраций НОЦ в диапазоне от 0,001 мг/мл до 1,0 мг/мл колебания показателя, отражающего продукцию пероксида водорода эндотелиоцитами умбиликальной вены, не выходили за рамки статистической погрешности для нормальных значений в культуре без интервенции и составляли в среднем 87 – 107% от показателя контроля. Рост концентрации наночастиц диоксида церия в среде культивации до 10,0 и выше – до 100,0 мг/кг приводил к повышению продукции пероксида водорода на 23 и 45% по сравнению с контрольными значениями соответственно ( $p < 0,05$  при сравнении с группой без воздействия НОЦ). Подобные результаты были получены нами и при регистрации флюоресценции дигидроэтидия (рисунок 10Б).



А



Б

Рисунок 14 – Флюоресценция ДДФ (А) и ДГЭ (Б) (в % к контрольным значениям) в культуре эндотелиоцитов человека при 24-инкубации в присутствии НОЦ в диапазоне концентраций от 0,001 до 100,0 мг/мл (n = 3 для каждой концентрации); \* различия достоверны при сравнении с группой без НОЦ (тест Крускала-Уоллиса)

Рост концентрации наночастиц диоксида церия в среде культивации до 10,0 и выше – до 100,0 мг/кг приводил к повышению продукции супероксид-аниона в среднем на 34 и 59% по сравнению с контрольными значениями соответственно ( $p < 0,05$  при сравнении с группой без воздействия НОЦ).

Нами установлена прямая средней силы корреляционная зависимость между активностью СОД в культуре фибробластов и активностью реактивных форм кислорода в культуре эндотелиоцитов в сопоставимых концентрациях вплоть до концентрации 10 мг/мл: коэффициент корреляции Спирмена составил 0,64 ( $p = 0,02$ ) (рисунок 15). Дальнейший рост продукции реактивных форм кислорода при увеличении концентрации НОЦ до 100 мг/мл приводил к депрессии продукции СОД.

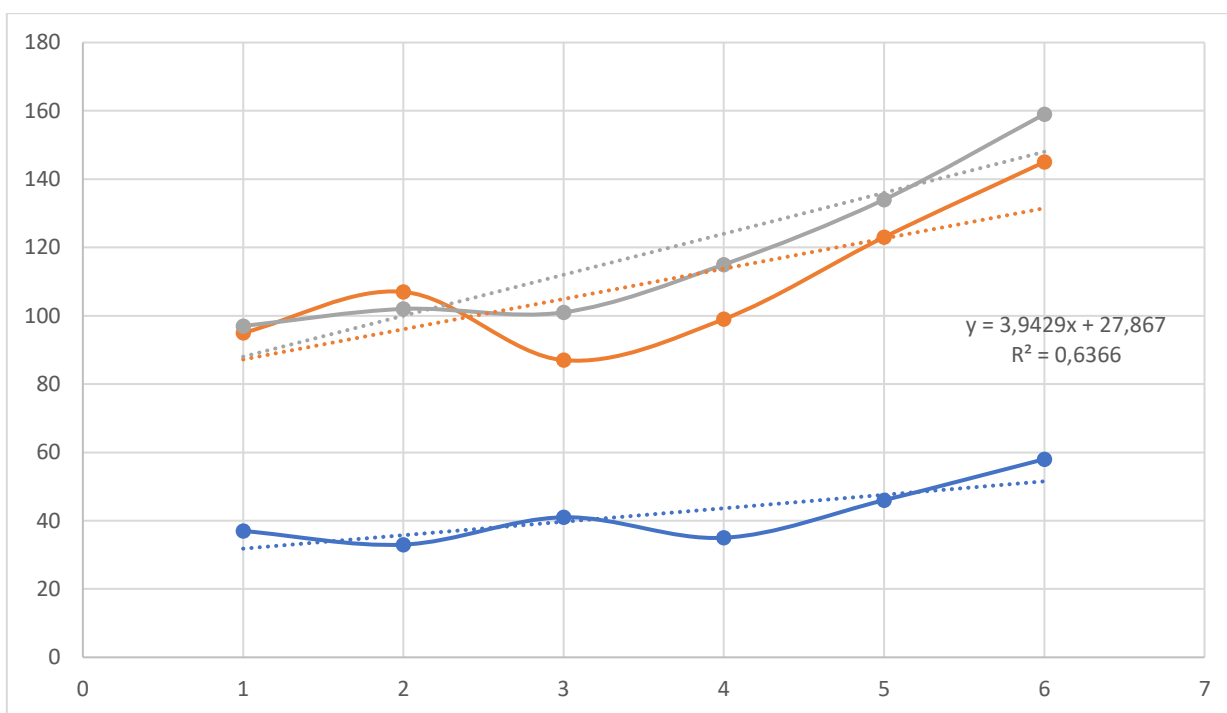


Рисунок 15 – Корреляционная зависимость между активностью СОД в культуре фибробластов и активностью реактивных форм кислорода в культуре эндотелиоцитов в сопоставимых концентрациях (по оси абсцисс нумерация соответствует концентрациям НОЦ 0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 соответственно)

### 3.7 Влияние различных концентраций НОЦ на продукцию оксида азота эндотелиоцитами человека

Для определения внутриклеточной концентрации оксида азота применяли традиционный фотометрический способ с реактивом Грисса (раствор сульфаниловой кислоты и альфа-нафтиламина в уксусной кислоте) с фотометрической регистрацией продукта реакции. Результаты представлены на рисунке 16.

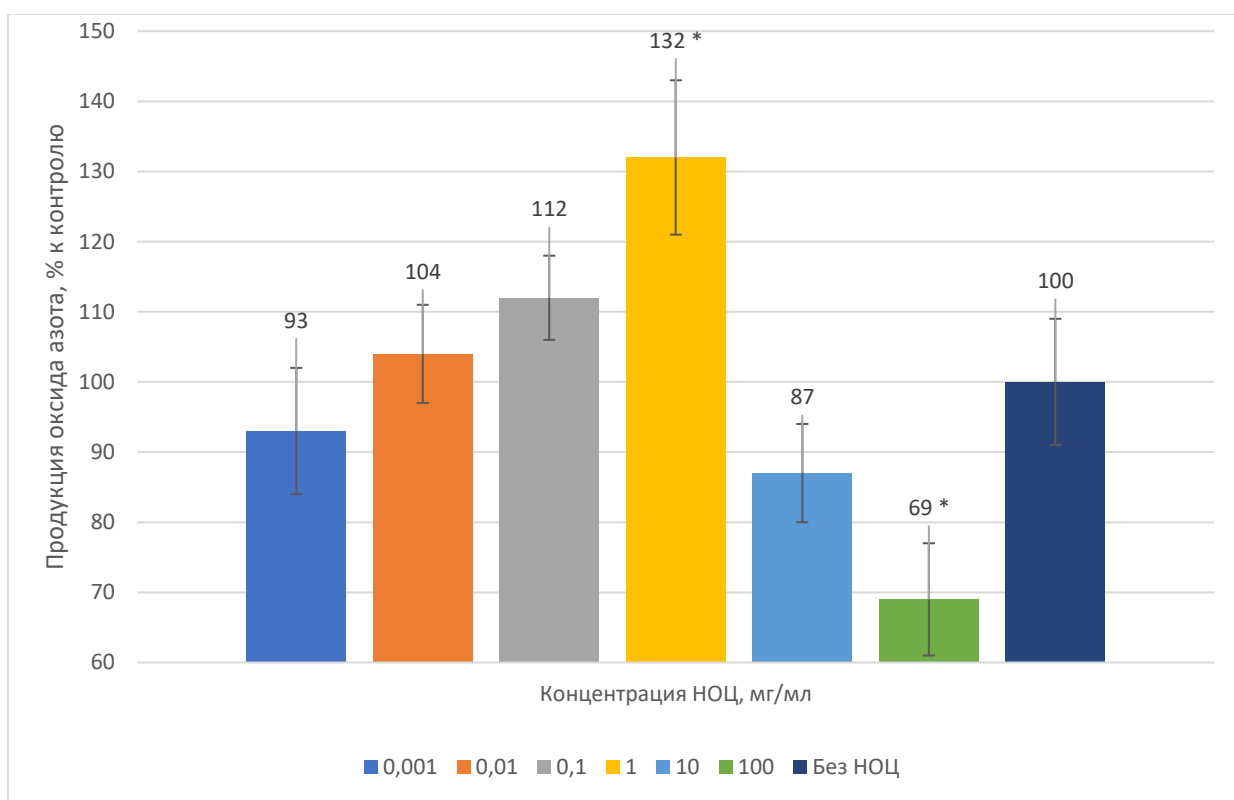


Рисунок 16 – Продукция оксида азота (в % к контрольным значениям) в культуре эндотелиоцитов человека при 24-инкубации в присутствии НОЦ в диапазоне концентраций от 0,001 до 100,0 мг/мл ( $n = 3$  для каждой концентрации); \* различия достоверны при сравнении с группой без НОЦ (тест Крускала-Уоллиса)

Как показали результаты наших измерений, в диапазоне концентраций от минимальной использованной 0,001 мг/мл до 0,1 мг/мл наночастицы диоксида церия вызывают тенденцию к росту функциональной активности

эндотелиоцитов, которая достигает статистической значимости при достижении концентрации НОЦ в среде культивирования 1,0%. Увеличение концентрации до 10,0 мг/мл, а затем и 100,0 мг/мл приводит к прогрессирующему снижению концентрации внутри клеток оксида азота до  $87 \pm 10\%$ , а затем и  $69 \pm 8\%$ , имеющему статистическую значимость при сравнении как с интактной культурой ( $p < 0,05$  при сравнении с группой без воздействия НОЦ).

Таким образом, подводя итоги раздела нашего исследования, посвященного изучению влияния различных концентраций наночастиц диоксида церия на выживаемость и функциональную активность основных популяций клеток – фибробластов и эндотелиоцитов, вовлеченных в регенерацию кожной раны и сосудистого дефекта, можно сделать следующие обобщения: НОЦ не обладают цитотоксическими свойствами в широком диапазоне концентраций от 0,001 до 1,0 мг/мл, снижение выживаемости клеточных популяций наблюдается при увеличении присутствия наночастиц диоксида церия в среде культивирования до 10,0 – для эндотелиоцитов и 100,0 мг/мл – для фибробластов. Рост концентрации НОЦ сопровождается повышением активности свободнорадикальных реакций и продукции пероксида водорода и синглетного кислорода, подавлению функциональной активности эндотелиоцитов (в концентрации 100,0 мг/мл), что приводит к компенсаторному росту экспрессии фермента – антиоксиданта СОД, сдерживающего негативные последствия внутриклеточной стресс-реакции, но лишь до концентрации 100,0 мг/мл, достигнув которой регистрируется декомпенсация антирадикального механизма фибробластов.

## **ГЛАВА 4 ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАННОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТАВА И НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЦЕЛОСТНОСТИ КОЖНОГО И СОСУДИСТОГО ДЕФЕКТА ПРИ ЛАЗЕРНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ**

Настоящий раздел исследования посвящен изучению сочетанного использования БС и НОЦ на эффективность соединения краев полнослойной раны кожи и дефекта сосуда при лазерном воздействии у экспериментальных животных.

### **4.1 Эффективность сочетанного использования лазерного излучения с БС и НОЦ в восстановлении целостности кожной раны лабораторной крысы**

Экспериментально-хирургическое воздействие на живых животных позволило нам не только оценить динамику изменения прочностных характеристик соединения, но и провести сравнительное исследование биологических эффектов БС и НОЦ при их местном применении при лазерном соединении краев кожной раны [126-128] .

После выполнения разреза кожи в соответствии с планом рандомизации все животные были разделены на 4 серии: крысам первой серии ( $n = 15$ ) с помощью наложения традиционных узловых с помощью нитей Prolene 5.0 (Ethicon Inc., США); крысам второй серии после наложения узловых швов ежедневно в течение 10 суток, начиная с первых суток, на область раневого дефекта наносили 1% спрей, содержащий НОЦ 1 раз в сутки. Животным 3 – 4 серий осуществляли лазерное соединение краев линейной полнослойной раны кожи: в третьей серии ( $n = 15$ ) использовали только БС на основе углеродных нанотрубок, в четвертой серии ( $n = 15$ ) после проведения лазерного спаивания краев раны с применением БС ежедневно в течение 10 суток, начиная с

первых на область раневого дефекта наносили 1% спрей, содержащий НОЦ 1 раз в сутки.

В таблице 3 отражена динамика прочности кожного шва, выполненного традиционным узловым способом, а также методом лазерного воздействия с местным нанесением НОЦ. Животных описанных серий выводили из эксперимента под ингаляционным наркозом: первая группа в серии, состоящая из 5 особей, выводилась на 7 сутки, тогда как вторая, также состоящая из 5 лабораторных крыс, выводилась на 14 сутки опыта, третья на 21 сутки.

На 7 сутки после проведение экспериментально-хирургического вмешательства прочность на разрыв кожного соединения составила в группе узлового шва в среднем  $0,03 \pm 0,001$  МПа. Топическое применение 1% спрея, содержащего наночастицы диоксида церия, один раз в сутки, не сопровождалось статистически значимым ростом прочности шва – сила разрыва составляла  $0,031 \pm 0,003$  МПа. Использование лазера для соединения краев полнослойного кожного дефекта приводило к значительному снижению прочности шва до  $0,021 \pm 0,001$  МПа ( $p = 0,001$  при сравнении с группой узлового шва). Локальное применение 1% спрея, содержащего наночастицы диоксида церия, один раз в сутки на область лазерного воздействия с использованием БС незначительно повышало прочность соединения и составила  $0,024 \pm 0,004$  МПа ( $p = 0,4$  при сравнении с группой лазерного соединения без НОЦ), однако, не позволяло добиться сопоставимой с узловым швом прочности ( $p = 0,001$  при сравнении с группой узлового шва).

На 14 сутки после проведение экспериментально-хирургического вмешательства полученные результаты претерпевали незначительные изменения. Так, прочность на разрыв кожного соединения составила в группе контрольного узлового шва в среднем  $0,036 \pm 0,015$  МПа. Топическое применение 1% спрея, содержащего наночастицы диоксида церия, один раз в сутки, также как и на 7 сутки наблюдения не сопровождалось статистически значимым ростом прочности шва – однако проявлялась отчетливая тенденция

к увеличению сила разрыва, составлявшей  $0,038 \pm 0,006$  МПа. Использование БС и лазера для соединения краев полнослойного кожного дефекта на 14 сутки регистрации также приводило к формированию рубца меньшей прочности после выполнения экспериментально-хирургического воздействия, – до  $0,024 \pm 0,002$  Мпа. Локальное применение 1% спрея, содержащего наночастицы диоксида церия, один раз в сутки на область лазерного воздействия повышало прочность соединения – до  $0,028 \pm 0,002$  МПа.

Таблица 3 – Прочность соединения кожи на 7, 14 и 21 сутки после экспериментальной операции в исследуемых группах

Группы	Сутки наблюдения		
	7	14	21
Узловой шов	$0,03 \pm 0,001$ *	$0,036 \pm 0,015$ *	$0,057 \pm 0,018$ *
Узловой шов+2% НОЦ	$0,031 \pm 0,003$ *	$0,038 \pm 0,006$ *	$0,072 \pm 0,016$
Лазерное воздействие с БС	$0,021 \pm 0,001$ * <sup>a</sup>	$0,024 \pm 0,002$ * <sup>a</sup>	$0,048 \pm 0,021$ *
Лазерное воздействие с БС+1% НОЦ	$0,024 \pm 0,004$ *	$0,028 \pm 0,002$ *	$0,051 \pm 0,023$ *

Примечания: \*  $p < 0,05$  при сравнении с интактной кожей; <sup>a</sup>  $p < 0,05$  при сравнении с узловым швом (ANOVA, критерий Даннета)

В связи с естественным течением процесса ранозаживления показатели прочности соединения на 21 сутки росли во всех группах. Следует при этом подчеркнуть, что местное применение НОЦ в сочетании с лазерным воздействием является более эффективным способом повышения прочности соединения, чем орошение НОЦ области узлового шва кожной раны.

#### **4.2 Тканевые и клеточные реакции при использовании лазерного излучения с БС и узлового соединения краев кожной раны на фоне топического применения наночастиц диоксида церия**

На 7-е сутки в образцах поврежденной кожи после ушивания однорядными узловыми швами определялся участок дефекта с зонами пролиферации многослойного плоского ороговевающего эпителия. Поверхность раны местами содержала клеточный детрит, преимущественно по краям. Сосочковый слой дермы с умеренным воспалением. В клеточном воспалительном инфильтрате преобладают сегментоядерные лейкоциты и единичные мононуклеарные клетки. Здесь также множество кровеносных сосудов разного калибра. В местах прорезания слоев кожи хирургической режущей иглой обнаружены фокусы коагуляционного некроза (Рисунок 17).

Топическое нанесение 1% НОЦ на зону узлового шва приводило к пролиферации многослойного плоского ороговевающего эпителия. В области эпидермально-дермального сочленения и сосочковом слое дермы обнаруживались единичные сегментоядерные лейкоциты (нейтрофилы, эозинофилы и др.), а также некоторые мононуклеарные клетки (лимфоциты и макрофаги), элементы грануляционной ткани. Количество кровеносных сосудов и, в первую очередь гемакапилляров, было меньше в сравнении с первой группой. Разрастание волокнистой соединительной ткани отмечалось местами. По-прежнему, определяются фокусы коагуляционного некроза в зонах «прокола» слоев кожи (эпидермис и дерма) (рисунок 17).

В образцах кожи после использования лазерного воздействия с биологическим составом также определяется участок дефекта, но занимающий немного меньшую площадь. В микропрепаратах этой группы наблюдается выраженная пролиферация многослойного плоского ороговевающего эпителия и зоны гиперкератоза. В сосочковом слое также обнаружена воспалительная инфильтрация с разрастанием кровеносных

сосудов, степень ее выраженности была немного слабее, чем в микропрепаратах кожи группы с БС и НОЦ.

Добавление локально 1% спрея, содержащего наночастицы диоксида церия, один раз в сутки на область лазерного воздействия сопровождалось при патоморфологическом исследовании смягчением выраженности воспалительной реакции в области спаивания кожной раны: наблюдали умеренный отек, лимфо-плазмоцитарную инфильтрацию, толщина струпа не отличалась от такового при узловом шве, при этом наблюдали начальные явления реэпителизации в виде миграции прокератиноцитов в области краев раны.

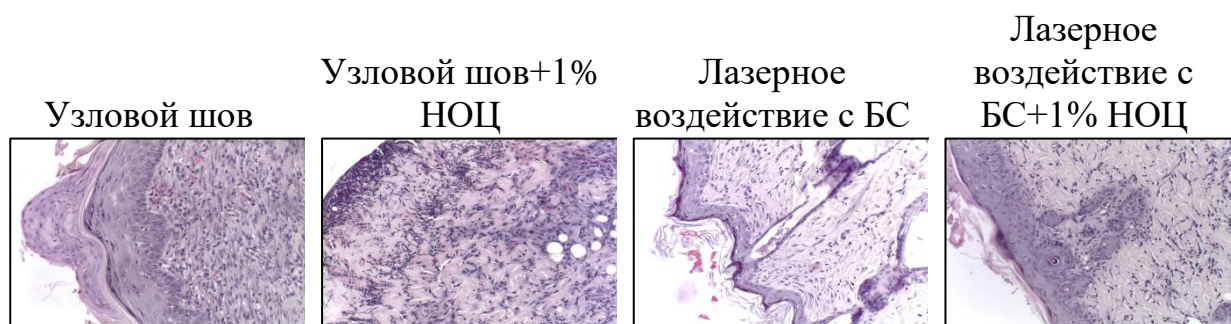


Рисунок 17 – Патоморфологическая картина области соединения кожной раны крысы с использованием узлового шва и лазерного воздействия с использованием БС и 1% НОЦ соединений на 7 сутки ранозаживления; гематоксилин и эозин, х 200

При сравнительном морфологическом анализе образцов кожи групп с узловым швом с нанесением и без нанесения 1% НОЦ на 14-х сутках на большом протяжении наблюдалось восстановление эпидермиса. Степень эпителизации местами достигала до 2/3 поверхности. Большинство кератиноцитов – незрелые и расположены без выраженной демаркации в слоях эпидермиса, но связаны с базальным слоем и базальной мембраной. Дифференциация слоев эпидермиса на большом протяжении затруднена. В сосочковом и сетчатом слоях дермы обнаружили умеренное количество клеток фибробластического ряда, которые параллельно ориентированы к

раневого дефекта (сопоставления краев раны), сосочковый слой дермы образован незрелой рубцовой тканью и не содержит придатков кожи. Единичные лимфоциты и макрофаги располагались группами. Аналогично наблюдались элементы грануляционной ткани.

Активацию клеток фибробластического ряда, большинство из которых были с крупными ядрами овальной формы, наблюдали в сосочковом и сетчатом слоях дермы образцов кожи четвертой группы с БС при лазерном воздействии и нанесении 1% НОЦ. Отмечалось увеличение объема рубцовой ткани, особенно, в области эпидермально-дермального сочленения. Большинство коллагеновых волокон имели параллельную ориентацию, что подтверждает интенсивность рубцевания.

При сравнительном морфологическом анализе образцов кожи всех групп на 21-х сутках наблюдается полное восстановление эпидермиса. Высокая степень эпителизации.

В микропрепаратах кожи, где края раны соединяли однорядными узловыми швами, обнаруживаются признаки фокального гиперкератоза многослойного плоского ороговевающего эпителия. Кератиноциты хорошо идентифицировались и демаркационно располагались в слоях эпидермиса. Четко определяется базальный слой, расположенный на базальной мембране. Сосочковый слой дермы также с признаками тотальной регенерации. Лишь в единичных образцах сохраняется слабая клеточная воспалительная инфильтрация (лимфоциты, макрофаги) вокруг кровеносных сосудов (рисунок 18).

Доля клеток фибробластического ряда заметно была выше в сосочковом и сетчатом слоях дермы микропрепаратов кожи четвертой группы с БС при лазерном воздействии и нанесении 1% НОЦ. Большинство из них имели параллельную ориентацию к раневой поверхности. Здесь же множество кровеносных сосудов и волосяных фолликулов. Коллагеновые волокна были расположены параллельно поверхности, они переплетались между собой,

формируя плотную волокнистую соединительную ткань. Местами встречались единичные лимфоциты и макрофаги (рисунок 18).

Для комплексной оценки степени воспалительной реакции и активности процессов тканевой регенерации при проведении морфометрического анализа пользовались количественной шкалой, включающей выставление суммарного балла, при этом 0 – неизменные ткани кожи или сосуда; 1 – незначительные изменения; 2 – патологические изменения средней степени тяжести; 3 – значительные повреждения; 4 – тяжелое повреждение ткани. При оценке патоморфологических проявлений в области интервенции по полуколичественной шкале наблюдали следующие изменения.

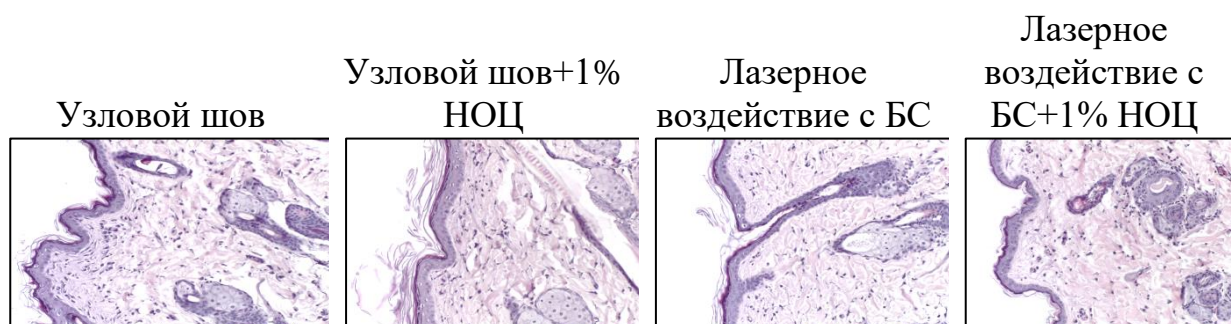


Рисунок 18 – Патоморфологическая картина области соединения кожной раны крысы с использованием узлового шва и лазерного воздействия с использованием БС и 1% НОЦ соединений на 7 сутки ранозаживления; гематоксилин и эозин, x 200

На 7 сутки после соединения кожной раны в группах преобладали деструктивно-воспалительные изменения: значение тяжести поражения в группе узлового шва составило в среднем  $3,4 \pm 0,3$ . Применение НОЦ местно в виде 1% спрея несколько снижало тяжесть морфологических реакций, однако различия не достигали статистической значимости –  $3,1 \pm 0,3$ . Лазерное соединение краев раны с использованием БС на основе углеродных нанотрубок без НОЦ сопровождалось тяжелой воспалительной реакцией, о чем свидетельствовало значение балла, равное  $3,7 \pm 0,2$  ( $p = 0,04$  при сравнении с группой узлового шва и НОЦ местно) (рисунок 19).

Применение НОЦ местно в виде 1% спрея сопровождалось значимым по сравнению со всеми группами снижением тяжести воспаления – до  $2,8 \pm 0,2$  ( $p = 0,001$  при сравнении с группой узлового шва без НОЦ местно;  $p = 0,01$  при сравнении с группой лазерного соединения без НОЦ).

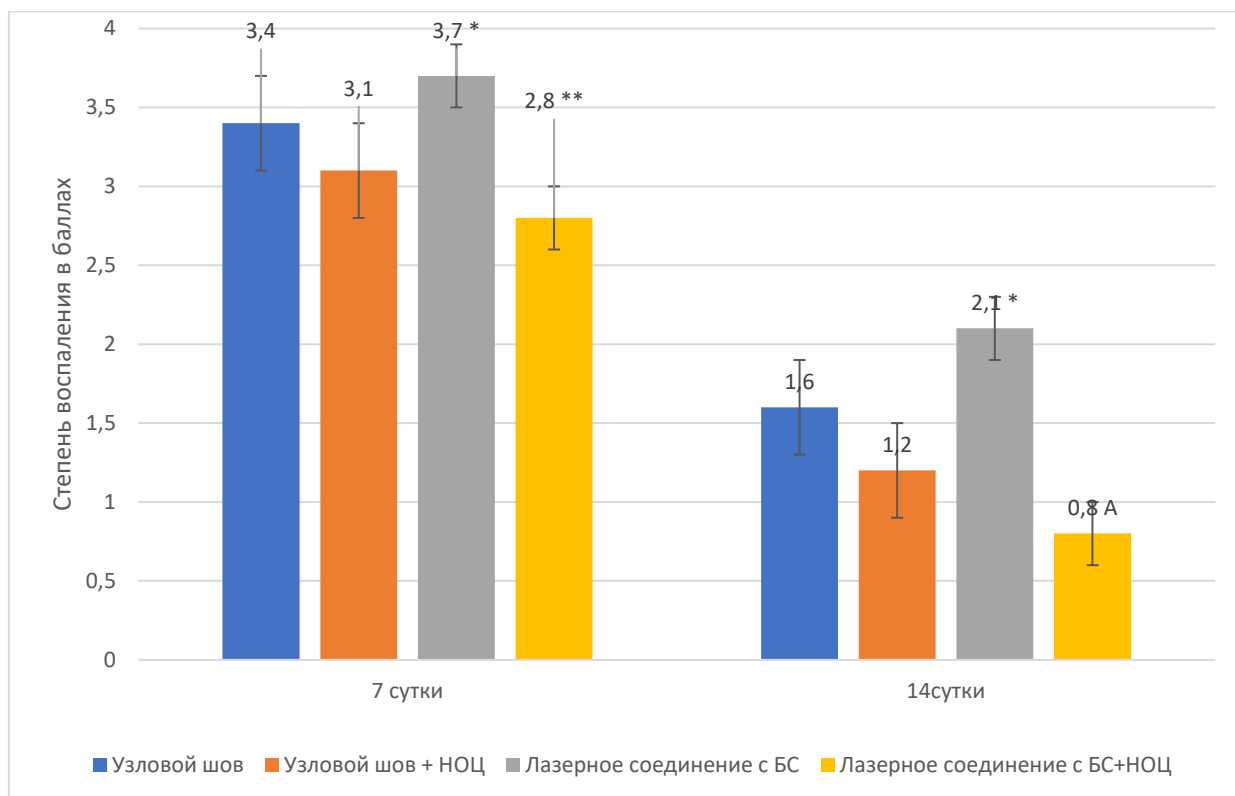


Рисунок 19 – Комплексная оценка степени воспалительной реакции и активности процессов тканевой регенерации при проведении морфометрического анализа с использованием полуколичественной шкалы в исследуемых группах на 7 и 14 сутки ранозаживления; \* различия достоверны при сравнении с узловым швом + НОЦ; \*\* с лазером без НОЦ, А с узловым швом и лазером без НОЦ (ANOVA, с последующим применением теста Тьюки)

На 14 сутки наблюдения во всех группах регистрировали снижение тяжести воспалительного процесса (имевшей статистическую значимость по сравнению с 7 сутками для всех групп). При этом это снижение также происходило неравномерно в зависимости от вида интервенции. Так, в частности, в группе узлового шва показатель составил в среднем  $1,6 \pm 0,3$ . Применение НОЦ местно в виде 1% спрея несколько снижало тяжесть

морфологических реакций, однако различия не достигали статистической значимости –  $1,2 \pm 0,3$ . Лазерное соединение краев раны с использованием БС без НОЦ сопровождалось пролонгацией воспалительной реакций, о чем свидетельствовало значение балла, равное  $2,1 \pm 0,2$  ( $p = 0,03$  при сравнении с группой узлового шва без и с НОЦ местно). Добавление локально 1% спрея, содержащего наночастицы диоксида церия, один раз в сутки на область лазерного воздействия приводило к самому большому по сравнению со всеми группами снижению тяжести воспаления – до  $0,8 \pm 0,2$  ( $p = 0,001$  при сравнении с группой узлового шва без НОЦ местно;  $p = 0,01$  при сравнении с группой лазерного соединения без НОЦ).

Анализ функционального состояния кератиноцитов основывается на характеристике их пролиферации и апоптоза, а также маркера межклеточных контактов, оцененных иммуногистохимическим методом с антителами к PCNA и Caspase 3 и ламинин соответственно

Каспаза-3 запускает каскад ферментативных реакций, которые ведут к конденсации хроматина, фрагментации ДНК и образованию апоптотических телец, облегчающих упорядоченное удаление отмирающих клеток.

При иммуногистохимическом исследовании эпидермиса интактной группы Caspase 3-позитивных кератиноцитов составило 29,2 %. На 7 сутки эксперимента во всех группах сохранялась высокая апоптотическая активность кератиноцитов, особенно в области краев раневой поверхности, что носит вероятно реактивный характер (таблица 4, рисунок 20). К 14 суткам данный показатель уменьшался, к 21 приближался к значениям интактной группы в экспериментальных группах узловых швов +НОЦ.

При иммуногистохимическом исследовании эпидермиса интактной группы обнаружили окрашенные ядра некоторых PCNA-позитивных кератиноцитов ( $34,8 \pm 0,2\%$ ,  $p < 0,05$ ), преимущественно в базальном слое (таблица 5, рисунок 20).

Таблица 4 – Иммуногистохимические реакции с антителами к Caspase 3 в кератиноцитах исследуемых групп, %

Группы	Caspase 3 , %, M±SD		
	7 сутки	14 сутки	21 сутки
Интактная кожа	29,3±0,2		
Узловой шов	78,2±0,1 <sup>a</sup>	53,3±0,2 <sup>a</sup>	31,2±0,7 <sup>a</sup>
Узловой шов +НОЦ	59,2±0,3 <sup>a</sup>	43,3±0,4 <sup>a</sup>	21,2±0,2 <sup>a</sup>
Лазерное соединение БС	57,2±0,2 <sup>b</sup>	48,1±1,1 <sup>b</sup>	39,1±0,4 <sup>b</sup>
Лазерное соединение БС+НОЦ	54,2±0,4 <sup>b</sup>	49,1±0,9 <sup>b</sup>	31,1±0,5 <sup>b</sup>

Примечание: <sup>a</sup> p < 0,05 при сравнении с интактной кожей; <sup>b</sup> p < 0,05 при сравнении с узловым швом (ANOVA)

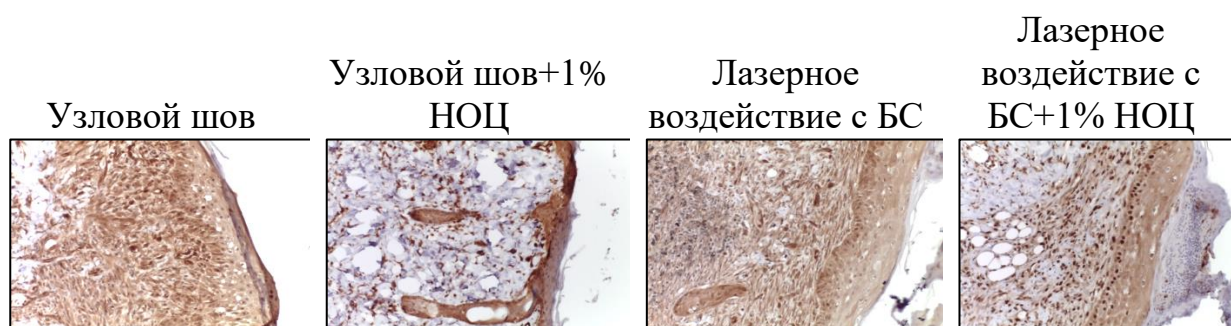


Рисунок 20 – Иммуногистохимическая реакция с антителами к Caspase 3 на 7 сутки докрасивание ядер – гематоксилином. увелич. ×200

Количество PCNA-позитивных кератиноцитов в области дефекта заметно было повышено в образцах кожи всех опытных групп на 7-и сутки, и более выражены был в группах УШ и УШ+НОЦ, что соответствует активной стадии пролиферации заживления кожной раны. К 21 первым суткам во всех исследуемых группах данный показатель приближался к интактной коже (таблица 5, рисунок 21).

Анализ состояния клеточных элементов эпидермиса и дермы, прежде всего сосочкового слоя, также проводили оценивая межклеточные коммуникации иммуногистохимическим методом с антителами к эпителиальному маркеру Laminin. Laminin, обеспечивает поддержание

межклеточного взаимодействия кератиноцитов, формируя клеточный пласт и обеспечивающий гистоархитектонику кожи. Напротив, частичная или полная потеря экспрессии Laminin, говорит о патологическом процессе в структурах кожи, особенно в эпидермисе.

Таблица 5 – Иммуногистохимические реакции с антителами к PCNA в кератиноцитах исследуемых групп, %

Группы	PCNA, %, M±SD		
	7 сутки	14 сутки	21 сутки
Интактная кожа	34,8±0,2		
Узловой шов	62,2±0,1 <sup>a</sup>	44,2±0,2 <sup>a</sup>	49,2±0,9 <sup>a</sup>
Узловой шов +НОЦ	71,2±0,4 <sup>a</sup>	49,2±0,3 <sup>a</sup>	35,1±0,4 <sup>b</sup>
Лазерное соединение БС	52,2±1,1 <sup>b</sup>	38,2±0,1 <sup>b</sup>	35,1±0,1 <sup>b</sup>
Лазерное соединение БС+НОЦ	68,2±0,1 <sup>b</sup>	44,2±0,2 <sup>b</sup>	32,1±0,2 <sup>b</sup>

Примечание: <sup>a</sup> p < 0,05 при сравнении с интактной кожей; <sup>b</sup> p < 0,05 при сравнении с узловым швом (ANOVA)

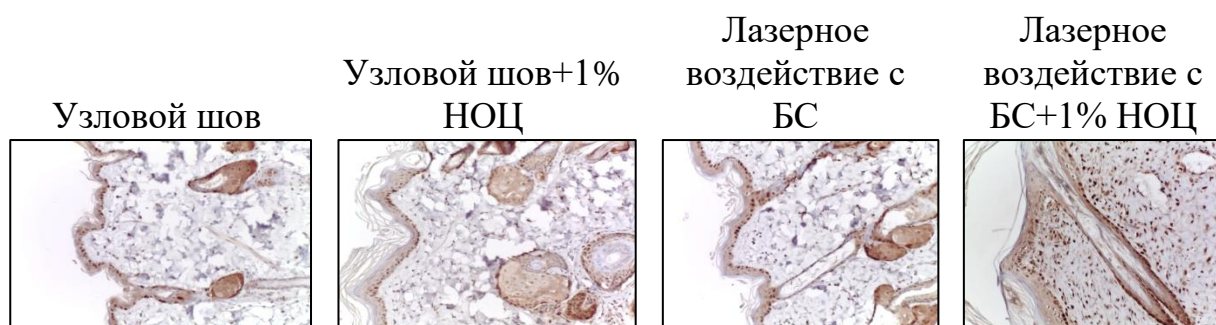


Рисунок 21 – Иммуногистохимическая реакция с антителами к PCNA на 21сутки; докрасивание ядер – гематоксилином. Ув. ×400

При иммуногистохимическом исследовании эпидермиса интактной группы обнаружили мембранную реакцию на Laminin в большинстве кератиноцитах (86,2±0,4%, p < 0,05), преимущественно в базальном слое (таблица 6, рисунок 21). Laminin-позитивные клетки также обнаружили по волосяных фолликулах и в сосочковом слое дермы.

Количество Laminin-позитивных кератиноцитов заметно было снижено в группах с узловым швом ( $48,1 \pm 0,4\%$ ,  $p < 0,05$ ) в первых точках эксперимента (таблица 6). Это указывает потерю коммуникаций между клетками после действия повреждающего фактора. В тоже время количество Laminin-позитивных клеток в сосочковом слое дермы практически не изменялось или местами незначительно повысилось по сравнению с интактной группой.

Таблица 6 – Иммуногистохимические реакции с антителами к Laminin в кератиноцитах исследуемых групп, %

Группы	Laminin, %, M±SD		
	7 сутки	14 сутки	21 сутки
Интактная кожа	86,2±0,4		
Узловой шов	51,1±0,1 <sup>a</sup>	59,2±0,2 <sup>a</sup>	69,2±0,2 <sup>a</sup>
Узловой шов +НОЦ	50,9±0,4 <sup>a</sup>	56,7±0,2 <sup>a</sup>	59,7±0,4 <sup>a</sup>
Лазерное соединение БС	65,1±0,9 <sup>b</sup>	71,1±0,1 <sup>b</sup>	79,1±0,4 <sup>b</sup>
Лазерное соединение БС+НОЦ	61,9±0,1 <sup>b</sup>	68,1±0,5 <sup>b</sup>	71,1±0,9 <sup>b</sup>

Примечание: <sup>a</sup>  $p < 0,05$  при сравнении с интактной кожей; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  при сравнении с узловым швом (ANOVA)

В начальной временной точке, в образцах группы лазерного соединения с БС и БС+НОЦ, количество Laminin-позитивных кератиноцитов, были также снижены по сравнению с интактной группы. На протяжении всего эксперимента выявили положительную динамику восстановлении межклеточной коммуникации кератиноцитов практически во всех опытных группах, особенно в группе лазерного соединения, начиная с 14 суток). Тенденцию к сбалансированности Laminin-позитивных клеток наблюдали и в структурах волоса и элементах сосочкового слоя дермы.

Количество Laminin -позитивных кератиноцитов и других клеток (фибробласты и др.) в группе лазерного соединения на 21 сутки точках

практически соответствовало значениям данных маркеров в интактной группы. В тоже время, положительную динамику восстановления уровней Laminin можно было также наблюдать и в группе с узловым швом на 21 сутки эксперимента ( $69,2 \pm 0,2\%$ ,  $p < 0,05$ ).

Обнаруженная иммуногистохимическая картина оценки межклеточного взаимодействия кератиноцитов, указывает на их сохранность в группе с лазерным соединением с использованием БС с НОЦ и без. Это подтверждает в том числе положительный функциональный статус кератиноцитов и других структур кожи (волосяные фолликулы, клетки рыхлой волокнистой соединительной ткани и др.) в опытных группах.

#### **4.5 Эффективность сочетанного использования БС и НОЦ в восстановлении целостности сосудистой стенки лабораторного кролика**

Экспериментально-хирургическое воздействие на живых животных позволило нам оценить изменения прочностных характеристик сосудистого соединения в зависимости от типа соединения, и провести исследование эффективности 1% спрея, содержащего НОЦ, при его локальном воздействии на область сварного лазерного соединения.

После выполнения разреза в соответствии с планом рандомизации все животные были разделены на 5 групп. Первая группа животных была ложнооперированная (ЛО), которой выполняли срединную лапоратомию и затем послойно ушивали рану. Второй группе животных продольный дефект аорты ушивали узловыми швами (УШ) нитью Prolen 7.0 (Ethicon Inc., США); третьей группе, после ушивания дефекта аорты, на область шва распыляли 1% спрей, содержащий наночастицы диоксида церия (УШ+НОЦ); четвертой - после нанесения биологического состава, на дефект стенки сосуда воздействовали лазерным излучением (ЛШ); пятой группе на область, где проводили лазерное соединение, распыляли 1% спрей, содержащий наночастицы диоксида церия (ЛШ+НОЦ). После снятия зажимов с сосуда

оценивали его герметичность и проходимость. В день выполнения операции, животным подкожно вводили нефракционированный гепарин натрия в дозе 40 ЕД/кг. В послеоперационном периоде антикоагулянты не назначали в связи с их плохой видовой переносимостью.

Перед выведением животных из эксперимента была проведена доплерография брюшной аорты. В группе ЛО животных  $17 \pm 2$  см/с. На 7 сутки после закрытия дефекта брюшной аорты скорость кровотока возрастала во всех группах и приближалась к интактным значениям только в группе ЛШ+НОЦ (рисунок 22).

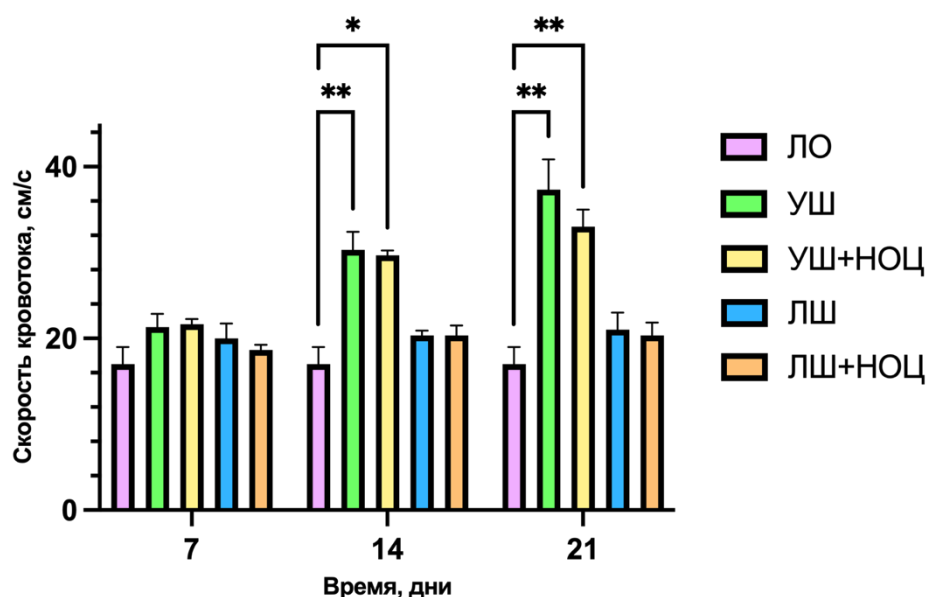


Рисунок 22 – Скорость кровотока в брюшной аорте кролика при использовании разных типов соединения на 7, 14 и 21 сутки: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$

К 21 суткам во всех группах значений скорости кровотока не достигало значений интактного сосуда. Максимальная скорость кровотока была зарегистрирована в группе с УШ и составила  $37,3 \pm 3$  см/с, что свидетельствует о развитие сужения в области оперативного вмешательства. Топическое применения 1% НОЦ на область узлового шва достоверно не влияло на скорость кровотока, однако в группах с лазерным соединением достоверно была меньше в сравнении с группами, которым выполнялся узловой шов.

После выведения животных из эксперимента, во всех экспериментальных группах, сосуд был проходим на протяжении всего эксперимента. При измерении диаметра просвета сосуда в области его соединения нами были получены следующие результаты (рисунок 23). К 21 дню наблюдения в группе УШ, наблюдали наибольшее из всех групп сужение просвета сосуда до  $17 \pm 4\%$  по сравнению с интактной группой, УШ+НОЦ до  $15 \pm 3\%$ . В группе ЛШ и ЛШ+НОЦ до  $9 \pm 3\%$  и  $7 \pm 4\%$  соответственно.

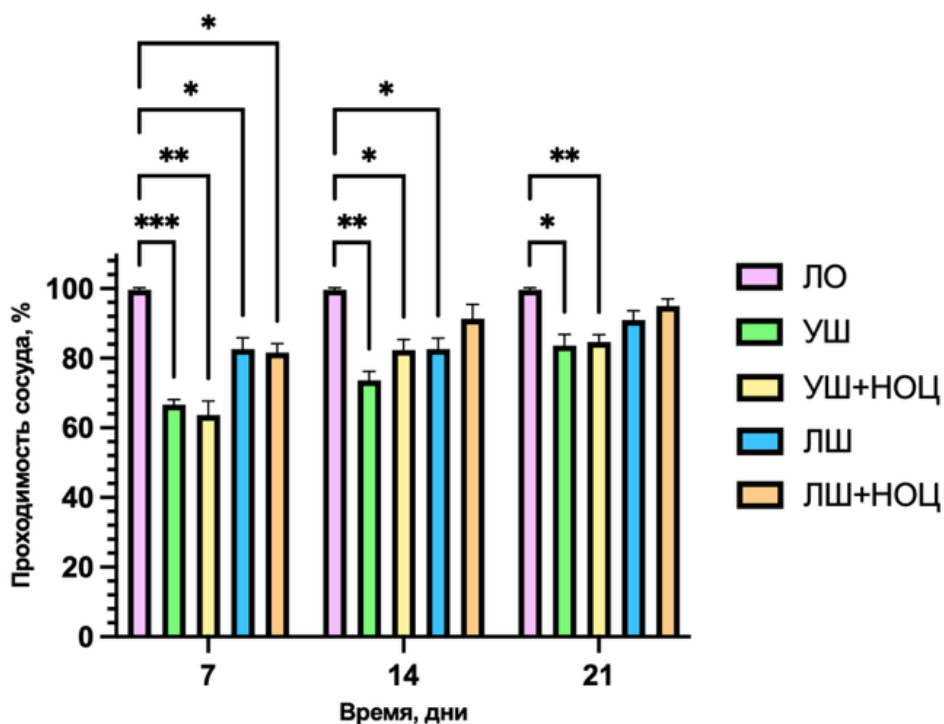


Рисунок 23 – Диаметр сосуда лабораторного кролика при использовании различных видов соединений стенки брюшной аорты кролика на 7, 14, 21 сутки наблюдения; статистическая достоверность различий определена при помощи ANOVA, с последующим применением теста Тьюки: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  (ANOVA)

Данные результаты коррелируются с результатами определения скорости кровотока в брюшной аорте кроликов после восстановления сосудистой стенки к 21 суткам.

Было проведено исследование прочности сосудов на разрыв на 7, 14 и 21 сутки (таблица 7). Сила разрыва стенки интактного сосуда составила  $6,18 \pm 0,12$  Н. Узловое соединение сосуда было несопоставимо по прочности с

интактной сосудистой стенкой, что, тем не менее позволяло герметизировать соединение. К 21 суткам наблюдения прочность узлового шва составляла  $5,7 \pm 0,18$  Н. Орошение области узлового соединения спреем с НОЦ не влияло на прочностные показатели соединения на 7 и 14 сутки, однако приводило к восстановлению прочностных характеристик сосудистой стенке к концу наблюдения. Применение лазерной технологии сшивания сосудов во всех группах уступало по своему результату узловому шву. Прочность на разрыв не восстанавливалась до уровня интактных тканей даже к 21 суткам эксперимента вне зависимости от применения спрея с наноцерием

Таблица 7 – Прочность на разрыв (в Н) различных видов соединений стенки брюшной аорты кролика на 7, 14, 21 сутки наблюдения

Группы	Сутки наблюдения		
	7	14	21
Узловой шов	$2,4 \pm 0,09$ *	$2,6 \pm 0,15$ *	$5,7 \pm 0,18$ *
Узловой шов+2% НОЦ	$2,5 \pm 0,07$ *	$2,7 \pm 0,06$ *	$6,0 \pm 0,16$
Лазерное воздействие с БС	$1,8 \pm 0,11$ <sup>а</sup>	$1,9 \pm 0,18$ <sup>а</sup>	$4,8 \pm 0,21$ <sup>а</sup>
Лазерное воздействие с БС+2% НОЦ	$1,9 \pm 0,14$ <sup>а</sup>	$1,9 \pm 0,17$ <sup>а</sup>	$5,0 \pm 0,23$ <sup>а</sup>

Примечания: \*  $p < 0,05$  при сравнении с интактным сосудом, <sup>А</sup>  $p < 0,05$  при сравнении с классическим узловым соединением (одномерный дисперсионный анализ, ANOVA, критерий Тьюки)

Макроморфологическая картина в области наложения швов у групп УШ и ЛШ характеризовалась разрастанием соединительной ткани вокруг зоны оперативного вмешательства, фиксирующего сосуд к задней брюшной стенке к 21 суткам. Спаечный процесс был меньше в группах животных, где применяли спрей, содержащий 2% НОЦ, на область как узлового шва, так и лазерного соединения с использованием биологического состава.

В ложнооперированной группе световая микроскопия брюшной аорты показала, что сосуды имели тонкий и гладкий эндотелий, концентрически

расположенные гладкомышечные клетки. Адвентиция была образована соединительной тканью, с хорошо выраженными коллагеновыми волокнами (Рисунок 24).

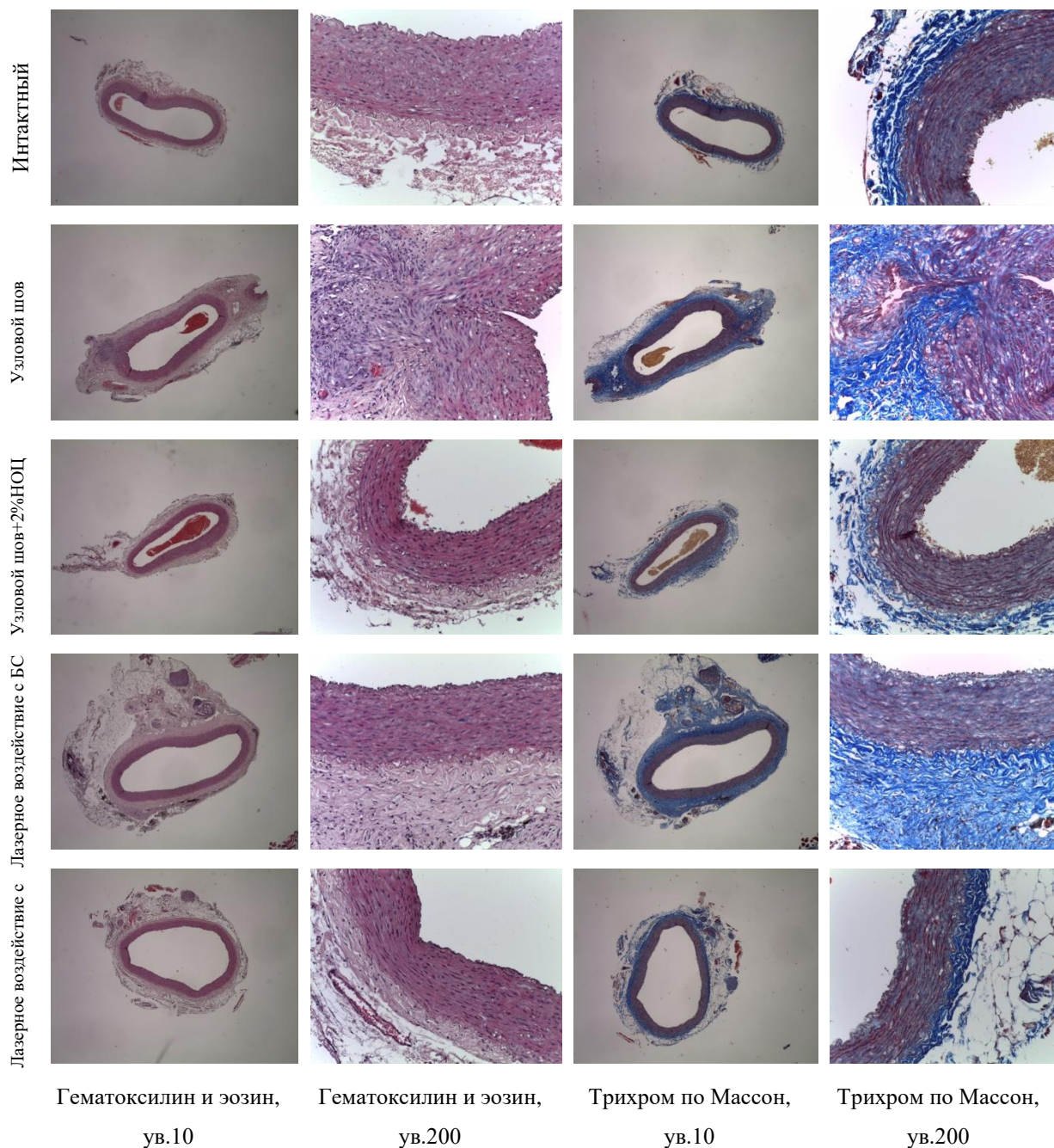


Рисунок 24 – Патоморфологическая картина области закрытия дефекта аорты кролика узловым швом и лазерным воздействием с использованием БС, НОЦ на 21 сутки

Патологии в слоях интимы, меди и адвентиции не обнаружено (бал по полуколичественной шкале составил 0). При окрашивании трихромом по Массону интима и медиа стенки брюшной аорты окрашивалась в бледно-розовый цвет, адвентиция в синий. Микроморфологическая картина стенки брюшной аорты при узловом соединении на 14 и 21 имела нарушение нормальной структуры сосудистой стенки, в отличие от ЛО группы. Также были обнаружены деформация просвета, утолщение стенки сосуда, нарушение целостности эндотелия, дегенерация волокон в мышечном слое. В адвентициальном слое были обнаружены очаги воспаления (бал по полуколичественной шкале составил 8). В группе ЛШ также было обнаружено нарушение нормальной структуры стенки сосуда. Воспаления в адвентициальном слое по сравнению с группой УШ выражено меньше, однако, обращало на себя внимание наличие пигментных включений, которые были расценены как скопления индоцианина зеленого, входящий в состав биологического состава (бал по полуколичественной шкале составил 5). Использование 2% НОЦ как при узловом шве, так и при лазерном соединении с биосоставом в большей степени влияло на адвентицию, снижало воспаление и патологического разрастания соединительной ткани. Бал по полуколичественной шкале для УШ+НОЦ составил – 5, для ЛШ+НОЦ – 3.

При окрашивании трихромом по Массону интенсивность синий окраски преобладала в группах УШ+НОЦ и ЛШ+НОЦ. Что свидетельствует о зрелости соединительной ткани.

## ГЛАВА 5 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С позиции клинической медицины восстановление целостности тканей, качественное и эффективное соединение раневых краев, имеет ключевое значение в настоящее время. Технологическое совершенствование подходов к восстановительной медицине, регенеративной и реконструктивной хирургии позволили совершить прорыв в рассматриваемой области. Однако, доступность высокотехнологической медицинской помощи, широкое распространение раневых процессов в популяции вне зависимости от уровня экономического развития государства диктует необходимость продолжения поиска безопасных и менее затратных способов восстановления органов и тканей.

Наиболее значительных успехов в настоящее время достигла тканевая инженерия, позволяющая бороться с ранами кожи практически любого размера и глубины. Применение широкого спектра биологических материалов, способных к стимуляции регенеративного процесса, открывает самые широкие возможности для современного практикующего хирурга.

В этой связи в последние годы внимание многочисленных исследовательских групп обращено в сторону церия, а именно инновационной формы церия – наночастиц, содержащих диоксид церия (НОЦ), обладающих целым набором уникальных качеств – способностью подавлять воспалительную реакцию, развитие инфекционного процесса, стимулировать антиоксидантную систему и образование новых кровеносных сосудов.

Работы последних лет в основном касались применения НОЦ в составе жидких и мягких топических лекарственных форм, а также тканевой инженерии для разработки скаффолдов и тканевых конструкторов. В то же время, мы не нашли в доступной литературе упоминания об использовании наночастиц диоксида церия в составе биологических припоев, использующихся в технологиях лазерной пайки тканей, главным образом,

кожи и кровеносных сосудов, что и подтолкнуло нас на проведение настоящего диссертационного исследования.

Поскольку поставленная перед нами цель охватывает несколько областей медицинского знания, а именно изучение биофизических закономерностей и природы эффектов и их механизмов новой топической формы НОЦ, получение этой топической формы, с одной стороны, а также экспериментально-хирургическое обоснование инновационных подходов к восстановлению целостности тканевых дефектов, с другой, для решения задач работы применялись методы экспериментальной хирургии, биомедицинской физики, биомеханики и клеточной биологии.

При планировании настоящего диссертационного исследования мы основывались на принципах комплексности методических подходов, единстве замысла и методов его реализации, в связи с чем диссертационная работа методологически включала два больших раздела – *in vitro* исследование в культурах клеток человека и на тканях лабораторных животных, и *in vivo* исследование на лабораторных животных двух видов – лабораторных крысах и кроликах.

Поскольку одним из объектов нашего исследования были выбраны наночастицы диоксида церия, на первом этапе нашей работы стояла задача получить указанные наночастицы в достаточном для исследования количестве с заданными свойствами. Метод получения наночастиц диоксида церия был разработан нами совместно с коллегами из отдела химии технологии синтетических лекарственных средств и аналитического контроля Всесоюзного научного центра по безопасности биологически активных веществ (предприятие АО «Уралбиофарм»).

Получение наночастиц диоксида церия (НОЦ) было выполнено методом гидротермального синтеза. Нитрат церия растворяли в воде, очищенной по технологии NanoPure (Thermo Scientific Life Science, США), имеющей электрическое сопротивление 18 МОм, для получения 0,1м раствора. В полученный водный раствор при постоянном помешивании (с частотой 350 в

минуту) примешивали капельно равный объем 0,5н раствора гидроксида аммония. Полученный раствор нагревали в печи до 110°C для полного испарения воды из смеси. Полученный диоксид церия ( $\text{CeO}_2$ ) прокаляли на протяжении полутора часов при 330°C, после чего продукт оставляли в печи до полного ее остужения.

Образовавшийся порошок загружали в емкость из нержавеющей стали с тефлоновым покрытием, заполненную четыре пятых объема 2,0н раствором едкого натра и нагревали смесь при температуре 125°C в течение суток под обычным давлением. Коллоидную систему остужали при до комнатной температуры и соляной кислотой доводили до нормального рН (7,0), после чего избыточную жидкость выпаривали, а полученные НОЦ.

Структуру и размеры полученных наночастиц диоксида церия определяли на сканирующем электронном микроскопе Philips (Япония). Полученные наночастицы имели размер частиц в диапазоне от 6 до 17 нм, имели структуру приближенную к сферической.

Полученный порошок применяли для получения жидкого спрея в концентрации 1% при его растворении в гликолях различных концентраций [121, 122].

В эксперименте в культуре фибробластов при помощи флюоресцентной метки мы подтвердили известный литературный факт о том, что внутриклеточная проницаемость наночастиц, и, в частности, наночастиц церия, определяется их размером. Так, в нашем случае, наночастицы с размером фракции до 15 нм проникали внутрь клеток беспрепятственно без использования эндоцитоза. В то же время использование более крупных фракций и более безопасных при этом требовало активации эндоцитоза для внутриклеточного поступления наночастиц.

Поскольку в соответствии с целью и задачами настоящей работы нам было необходимо проверить гипотезу о том, что НОЦ повышают эффективность лазерного соединения мягких тканей перед нами встал вопрос о влиянии наночастиц диоксида церия на основные клеточные популяции

кожной раны и кровеносного сосуда. В связи с этим в качестве объекта исследования на данном этапе работы мы выбрали культуры фибробластов и эндотелиальных клеток человека. Помимо выживаемости нам было чрезвычайно важно узнать каким образом различные концентрации наночастиц оксида церия влияют также на продукцию реактивных форм кислорода, активность антиоксидантных систем клетки и иные функциональные свойства.

Цитотоксичность в культуре фибробластов оценивали при 24-часовой инкубации клеток в присутствии НОЦ, растворенных в среде культивирования в диапазоне концентраций 0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 и 100,0 мг/мл. В указанном диапазоне концентраций до концентрации 10,0 мг/мл наночастицы диоксида церия не вызывают статистически значимых изменений доли выживших клеток в культуре фибробластов по сравнению с культурой, не подвергавшейся воздействию НОЦ. Увеличение концентрации до 100,0 мг/мл приводит к небольшому росту цитотоксичности со снижением доли выживших клеток до  $95 \pm 1\%$ , однако имеющему статистическую значимость при сравнении как с интактной культурой, так и с точками 0,001 и 10,0 мг/мл.

Воздействия лазерного излучения на жидкие среды на основе углеродных нанотрубок в культуре клеток фибробластов не только не снижает количество живых фиброюластов, но и приводит к их активной пролиферации к 2 и 3 суткам

Ведущую роль в НОЦ-опосредованной цитотоксичности, по мнению ряда авторов играют избыточные уровни реактивных форм кислорода [124, 125]. При этом природным ферментом-антиоксидантом, способным компенсировать чрезмерную активацию гидроперекисных реакций, является СОД. Для определения активности фермента в культуре фибробластов человека под действием наночастиц диоксида церия применяли специфический диагностический набор SOD assay kit (Merck Sigma Aldrich, Германия). Результаты оценивали фотометрически при длине волны 455 нм.

Добавление в инкубационную среду НОЦ в концентрациях от 0,001 до 10,0 мг/мл сопровождалось статистически значимым ростом активности СОД на участке концентраций от 1,0 до 10,0 мкг/мл, что свидетельствовало о том, что в указанных концентрациях наночастицы диоксида церия, хотя и вызывали избыточную продукцию реактивных форм кислорода, но при этом внутриклеточные механизмы за счет компенсаторного повышения активности СОД – фермента, нейтрализовывали такие формы кислорода. Повышение концентрации НОЦ до 100,0 приводило к статистически значимой депрессии внутриклеточной активности супероксиддисмутазы до  $28 \pm 8\%$ . Это может означать, что повышение объема наночастиц с высокой поверхностной активностью сопровождается срывом компенсаторного механизма образования активных форм кислорода и вызывает депрессию СОД, что может рассматриваться как механизм токсического воздействия НОЦ на клетки.

Для оценки влияния наночастиц диоксида церия на токсичность эндотелиоцитов использовали культуру эндотелиальных клеток пупочной вены человека (АТСС, США). Также, как и в культуре фибробластов, в диапазоне концентраций от минимальной использованной 0,001 мг/мл до 1,0 мг/мл НОЦ не вызывают статистически значимых изменений доли выживших клеток в культуре эндотелиоцитов эмбриональной пупочной вены человека по сравнению с культурой, не подвергавшейся воздействию наночастицами диоксида церия. Увеличение концентрации до 10,0 мг/мл, а затем и 100,0 мг/мл приводит к прогрессирующему росту цитотоксичности со снижением доли выживших клеток до  $82 \pm 1\%$ , имеющему при этом статистическую значимость при сравнении как с интактной культурой, так и с точками 0,001 – 1,0 мг/мл.

Определяли влияние инкубации клеток эндотелия в присутствии НОЦ на внутриклеточную продукцию реактивных форм кислорода в виде пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) и супероксид-аниона ( $O_2^-$ ). Рост концентрации наночастиц диоксида церия в среде культивации до 10,0 и выше – до 100,0 мг/кг приводил к повышению продукции пероксида водорода на 23 и 45% по

сравнению с контрольными значениями соответственно ( $p < 0,05$  при сравнении с группой без воздействия НОЦ). Подобные результаты были получены нами и при регистрации флюоресценции дигидроэтидия, свидетельствующей о росте концентрации синглетного кислорода. Нами установлена прямая средней силы корреляционная зависимость между активностью СОД в культуре фибробластов и активностью реактивных форм кислорода в культуре эндотелиоцитов в сопоставимых концентрациях: коэффициент корреляции Спирмена составил 0,64 ( $p = 0,02$ ). Как показали результаты наших измерений, в диапазоне концентраций от минимальной использованной 0,001 мг/мл до 0,1 мг/мл наночастицы диоксида церия вызывают тенденцию к росту функциональной активности эндотелиоцитов, которая достигает статистической значимости при достижении концентрации НОЦ в среде культивирования 1,0%. Увеличение концентрации до 10,0 мг/мл, а затем и 100,0 мг/мл приводит к прогрессирующему снижению концентрации внутри клеток оксида азота до  $87 \pm 10\%$ , а затем и  $69 \pm 8\%$ , имеющему статистическую значимость при сравнении как с интактной культурой ( $p < 0,05$  при сравнении с группой без воздействия НОЦ).

Таким образом, подводя итоги раздела нашего исследования, посвященного изучению влияния различных концентраций наночастиц диоксида церия на выживаемость и функциональную активность основных популяций клеток – фибробластов и эндотелиоцитов, вовлеченных в регенерацию кожной раны и сосудистого дефекта, можно сделать следующие обобщения: НОЦ не обладают цитотоксическими свойствами в широком диапазоне концентраций от 0,001 до 1,0 мг/мл, снижение выживаемости клеточных популяций наблюдается при увеличении присутствия наночастиц диоксида церия в среде культивирования до 10,0 – для эндотелиоцитов и 100,0 мг/мл – для фибробластов. Рост концентрации НОЦ сопровождается повышением активности свободнорадикальных реакций и продукции пероксида водорода и синглетного кислорода, подавлению функциональной активности эндотелиоцитов (в концентрации 10,0 мг/мл), что приводит к

компенсаторному росту экспрессии фермента – антиоксиданта СОД, сдерживающего негативные последствия внутриклеточной стресс-реакции с последующим угнетением этого механизма клеточной защиты. Лазерного излучения на жидкие среды на основе углеродных нанотрубок в культуре клеток фибробластов не только не снижает количество живых фиброюластов, но и приводит к их активной пролиферации к 2 и 3 суткам

Экспериментально-хирургическое изучение качества тканевого соединения на моделях кожной раны лабораторных крыс, что использования 1 %НОЦ приводит к повышению прочности послеоперационного рубца при узловом соединении, а сочетанное применение лазера с БС и локального воздействия НОЦ на область лазерного соединения, по силе на разрыв сопоставимо с узловым швом на 21 сутки наблюдения. При этом патоморфологически в области соединения воспалительный компонент выражен в меньшей степени, а явления регенерации и миграции прокератиноцитов начинаются раньше и более активно, чем в случае использования БС без локального применения НОЦ.

Лазерное соединение полнослойного дефекта брюшной аорты с биологическим составом как с НОЦ, так и без него не приводит к тромбообразованию, деформации и сужению просвета сосуда, увеличению скорости кровотока в сравнении с узловым швом. Топическое использование НОЦ позволяет снижать воспаление в области сосудистого соединения и развитие спаечного процесса в области оперативного вмешательства.

## **5.1 Итоги выполнения диссертационного исследования**

Впервые в отечественной науке проведено комплексное изучение биофизических феноменов и хирургической применимости комбинированного использования наночастиц диоксида церия и биологического состава, содержащего углеродные нанотрубки в повышении

эффективности лазерных технологий соединения живых тканей – кожи и кровеносного сосуда.

В опытах *in vitro*, посвященных изучению влияния различных концентраций наночастиц диоксида церия на выживаемость и функциональную активность основных популяций клеток – фибробластов и эндотелиоцитов, вовлеченных в регенерацию кожной раны и сосудистого дефекта, были получены следующие принципиально новые данные: проникновение внутрь клеток НОЦ с низким размером фракции происходит без участия специальных мембранно-ассоциированных механизмов, тогда как для внутриклеточного проникновения НОЦ размером более 15 нм требуется механизм эндоцитоза; НОЦ не обладают цитотоксическими свойствами в широком диапазоне концентраций от 0,001 до 1,0 мг/мл, снижение выживаемости клеточных популяций наблюдается при увеличении присутствия наночастиц диоксида церия в среде культивирования до 10,0 – для эндотелиоцитов и 100,0 мг/мл – для фибробластов. Рост концентрации НОЦ сопровождается повышением активности свободнорадикальных реакций и продукции пероксида водорода и синглетного кислорода, подавлению функциональной активности эндотелиоцитов (в концентрации 100,0 мг/мл), что приводит к компенсаторному росту экспрессии фермента – антиоксиданта СОД, сдерживающего негативные последствия внутриклеточной стресс-реакции.

Экспериментально-хирургическое изучение качества тканевого соединения на моделях кожной раны лабораторных крыс и полнослойного дефекта брюшной аорты кролика показало, что применение лазера с БС в комбинации с НОЦ, сопоставимо с узловым швом на 21 сутки наблюдения в экспериментах на крысах при местном применении спрея НОЦ на область раны в течение 10 суток (для кожной раны), либо при нанесении НОЦ на область лазерного воздействия (в случае соединения краев сосудистого дефекта). При этом морфологически в области соединения воспалительный компонент выражен в меньшей степени, а явления регенерации и миграции

прокератиноцитов начинаются раньше и более активно, чем в случае использования биоприпоя без НОЦ.

## **5.2 Перспективы дальнейшего развития темы диссертационного исследования**

Полученные результаты открывают самые широкие перспективы для продолжения научного поиска как в прикладной, так и в фундаментальной плоскостях. Большой научный интерес представляет изучение зависимости фармакологических эффектов НОЦ в отношении тканей и отдельных клеточных популяций в зависимости от размера самих наночастиц и способа их получения. Это касается и токсикологического профиля различных лекарственных форм, содержащих наночастицы диоксида церия – гидрогель, спреи других концентраций, специальные повязки с НОЦ.

Большую важность имеют и требующие разрешения вопросы относительно оптимальных режимах воздействия лазерного излучения для получения удовлетворительных результатов прочности соединения тканей в зависимости от глубины повреждения с учетом требований к минимальному дополнительному повреждающему действию физических факторов

## ВЫВОДЫ

1. В диапазоне концентраций от 0,001 до 10,0 мг/мл наночастицы диоксида церия не оказывают цитотоксического эффекта на культуру фибробластов человека; повышение концентрации до 100,0 мг/мл приводит к снижению выживаемости клеток.

2. Рост цитотоксичности НОЦ в культуре эндотелиоцитов эмбриональной пупочной вены при повышении концентраций до 10,0 – 100,0 мг/мл сопровождается нарастающим повышением продукции пероксида водорода и активных форм кислорода. Установлена прямая средней силы корреляционная зависимость между активностью СОД в культуре фибробластов и активностью реактивных форм кислорода в культуре эндотелиоцитов в сопоставимых концентрациях: коэффициент корреляции Спирмена составил 0,64.

3. Использование биологического состава, содержащего углеродные нанотрубки в концентрации 0,1 масс.% при лазерном воздействии в комбинации с 1% НОЦ приводит к повышению прочности соединения кожи к 21 суткам, сопоставимой со значениями показателя узлового шва. Топическое применение спрея НОЦ повышает прочность традиционного узлового шва кожи.

4. В области лазерного соединения НОЦ приводит к сдерживанию воспалительно-деструктивных изменений тканей, активизирует клеточную регенерацию, а также сопровождается формированием более плотного контакта краев раны, повышает гомогенность шовного соединения

5. Биологический состав, содержащий углеродные нанотрубки, сывороточный альбумин, индоцианин зелёный, воду при лазерном обеспечивает формирование надежного тканевого соединения, не деформирующего просвет сосуда и не нарушающего гемодинамику в сосудах, но уступающего по прочности интактному сосуду. Топическое использование

1% НОЦ снижает воспаление в области сосудистого соединения и развитие спаечного процесса в области оперативного вмешательства, не приводит к термическому повреждению тканей, не вызывает тромбообразование.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При доклиническом исследовании биофизических свойств наночастиц диоксида церия целесообразно проводить оценку внутриклеточной концентрации перекиси водорода и активных форм кислорода с одновременной регистрацией активности супероксиддисмутазы и оксида азота в культурах фибробластов и эндотелиоцитов.

2. Для повышения эффективности и безопасности соединения краев кожной раны с помощью метода лазерной пайки локально на область соединения следует наносить наночастицы диоксида церия размером 7-16 нм в виде 1% спрея.

## **СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ**

БС – биологический состав, включающий сывороточный альбумин 25 масс.%, индоцианин зелёный 0,1 масс.%, одностенные углеродные нанотрубки 0,1 масс.%, воду

ИГХ – иммуногистохимия,

МПа – мегапаскаль,

НОЦ – наночастицы диоксида церия,

СОД – супероксиддисмутаза,

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hydrogel scaffolds to deliver cell therapies for wound healing / D. Sivaraj, K. Chen, A. Chattopadhyay, et al. // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2021. – Vol. 9. – ID: 660145.
2. Inhalation phage therapy as a new approach to preventing secondary bacterial pneumonia in patients with moderate to severe COVID-19: a double-blind clinical trial study / H.R. Samaee, G. Eslami, G. Rahimzadeh, et al. // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* – 2023. – Vol. 84. – ID: 104486.
3. Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment / D.S. Masson-Meyers, T.A.M. Andrade, G.F. Caetano, et al. // *Int. J. Exp. Pathol.* – 2020. – Vol. 101. – No. 1-2. – P. 21-37.
4. An economic evaluation of the impact, cost, and medicare policy implications of chronic nonhealing wounds / S.R. Nussbaum, M.J. Carter, C.E. Fife, et al. // *Value Health.* – 2018. – Vol. 21. – No. 1. – P. 27-32.
5. Nanomaterials for angiogenesis in skin tissue engineering / L. Cui, J. Liang, H. Liu, et al. // *Tissue Eng. Part B Rev.* – 2020. – Vol. 26. – No. 3. – P. 203-216.
6. Regeneration of functional, full-thickness skin with minimal donor site contribution using autologous homologous skin construct / K. Isbester, C. Wee, A. Kumar, et al. // *Plast. Surg. Case Stud.* – Vol. 6. – No. 2. – ID: 2513826X1989881.
7. The role of adipose-derived stem cells, dermal regenerative templates, and platelet-rich plasma in tissue engineering-based treatments of chronic skin wounds / M. Conese, L. Annacontini, A. Carbone, et al. // *Stem Cells Int.* – 2020. – Vol. 2020. – ID: 7056261.
8. Velnar, T. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms / *J. Int. Med. Res.* – 2009. – Vol. 37. – No. 5. – P. 1528-1542.

9. Boyce, S.T. Tissue engineering of skin and regenerative medicine for wound care / S.T. Boyce, A.L. Lalley // *Burns Trauma*. – 2018. – Vol. 6. – ID: 4.
10. Role of growth factors and biomaterials in wound healing / F. Zarei, M. Soleimanejad // *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* – 2018. – Vol. 46. – Sup. 1. – P. 906-911.
11. Nanocomposite scaffolds for accelerating chronic wound healing by enhancing angiogenesis / H. Nosrati, R. Aramideh Khouy, A. Nosrati, et al. // *J. Nanobiotechnology*. – 2021. – Vol. 19. – No. 1. – ID: 1.
12. Nanotechnology approaches in chronic wound healing / B. Blanco-Fernandez, O. Castaño, M.A. Mateos-Timoneda, et al. // *Adv. Wound Care (New Rochelle)*. – 2021. – Vol. 10. – No. 5. – P. 234-256.
13. Structure-property-toxicity relationships of graphene oxide: role of surface chemistry on the mechanisms of interaction with bacteria / A.C. Barrios, Y. Wang, L.M. Gilbertson, F. Perreault // *Environ. Sci. Technol.* – 2019. – Vol. 53. – No. 24. – P. 14679-14687.
14. Green-synthesized CeO<sub>2</sub> nanoparticles for photocatalytic, antimicrobial, antioxidant and cytotoxicity activities / S.N. Naidi, M.H. Harunsani, A.L. Tan, M.M. Khan // *J. Mater. Chem. B*. – 2021. – Vol. 9. – No. 28. – P. 5599-5620.
15. Biomedical applications of nanocerium: new roles for an old player / S. Kargozar, F. Baino, S.J. Hoseini, et al. // *Nanomedicine (Lond)*. – 2018. – Vol. 13. – No. 23. – P. 3051-3069.
16. Nosrati, H. Cerium oxide nanoparticles: synthesis methods and applications in wound healing / H. Nosrati, M. Heydari, M. Khodaei // *Mater. Today Bio*. – 2023. – Vol. 23. – ID: 100823.
17. Миронов, М.А. Экспериментальное обоснование топического применения солей N-ацетил-6-аминогексановой кислоты при неосложненных и инфицированных кожных ранах : дис. ... канд. мед. наук, 14.03.06, 14.01.17: Миронов Михаил Анатольевич. – Пенза, 2019. – 124 с.

18. Пахомов, Д.В. Фармакологические подходы к активации регенерации мягких тканей при сахарном диабете : дис. ... канд. мед. наук, 3.3.6: Пахомов Дмитрий Владимирович. – Саранск, 2022. – 132 с.
19. Соколов, А.И. Проллиферативный потенциал фибробластов в структуре клеточно-инженерных конструкций и лазерных технологий в хирургии (экспериментальное исследование) : дис. ... канд. мед. наук, 1.5.22, 3.1.9: Соколов Алексей Ильясович. – Саранск, 2023. – 133 с.
20. Алхататнех, Б.А.С. Регенеративные и косметические эффекты топических лекарственных форм солей ацексамовой кислоты при ожоговом поражении кожи (экспериментальное исследование) : дис. ... канд. мед. наук, 3.3.6.: Алхататнех Башар Абед Салам. – Саранск, 2023. – 129 с.
21. Piras, C.C. Ball milling: a green technology for the preparation and functionalisation of nanocellulose derivatives / C.C. Piras, S. Fernández-Prieto, W.M. De Borggraeve // *Nanoscale Adv.* – 2019. – Vol. 1. – No. 3. – P. 937-947.
22. Thambiliyagodage, C. Ball milling - a green and sustainable technique for the preparation of titanium based materials from ilmenite / C. Thambiliyagodage, R. Wijesekera // *Curr. Res. Green Sustain. Chem.* – 2022. – Vol. 5. – ID: 100236.
23. Yadav, T.P. Synthesis of nanocrystalline cerium oxide by high energy ball milling / T.P. Yadav, O.N. Srivastava // *Ceram. Int.* – Vol. 38. – No. 7. – P. 5783-5789.
24. Hadi, A. Mechanochemical synthesis of nanocrystalline CeO<sub>2</sub>: the effect of annealing temperatures on the particle size / A. Hadi, I.I. Yaacob, L.S. Ling // *Mater. Sci. Forum.* – 2006. – Vol. 517. – P. 252-256.
25. Thakur, N. Synthesis and biomedical applications of nanocerium, a redox active nanoparticle / N. Thakur, P. Manna, J. Das // *J. Nanobiotechnology.* – 2019. – Vol. 17. – No. 1. – ID: 84.

26. Suresh, R. Effect of annealing temperature on the microstructural, optical and electrical properties of CeO<sub>2</sub> nanoparticles by chemical precipitation method / R. Suresh, V. Ponnuswamy, R. Mariappan // *Appl. Surf. Sci.* – 2013. – Vol. 273. – P. 457-464.
27. Nanoparticle delivery of curcumin induces cellular hypoxia and ROS-mediated apoptosis via modulation of Bcl-2/Bax in human neuroblastoma / I. Kalashnikova, J. Mazar, C.J. Neal, et al. // *Nanoscale.* – 2017. – Vol. 9. – No. 29. – P. 10375-10387.
28. Tsai, M.S. Powder synthesis of nano grade cerium oxide via homogenous precipitation and its polishing performance / M.S. Tsai // *Mater. Sci. Eng. B.* – 2004. – Vol. 110. – No. 2. – P. 132-134.
29. Renuka, N.K. Structural characteristics of quantum-size ceria nano particles synthesized via simple ammonia precipitation / N.K. Renuka // *J. Alloys Compd.* – 2012. – Vol. 513. – P. 230-235.
30. Farahmandjou, M. Synthesis of Cerium Oxide (CeO<sub>2</sub>) nanoparticles using simple co-precipitation method / M. Farahmandjou, M. Zarinkamar, T. Firoozabadi // *Rev. Mex. Fis.* – 2016. – Vol. 62. – No. 5. – P. 496-499.
31. Diverse particle carriers prepared by co-precipitation and phase separation: formation and applications / Z. Sun, B. Wu, Y. Ren, et al. // *Chempluschem.* – 2021. – Vol. 86. – No. 1. – P. 49-58.
32. Petcharoen, K. Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method / K. Petcharoen, A. Sirivat // *Mater. Sci. Eng. B.* – 2012. – Vol. 177. – No. 5. – P. 421-427.
33. Synthesis and characterization of tin oxide nanoparticles via the co-precipitation method / S. Tazikeh, A. Akbari, A. Talebi, E. Talebi // *Mat. Sci. Pol.* – 2014. – Vol. 32. – P. 98-101.
34. Li, J. Synthesis of nanoparticles via solvothermal and hydrothermal methods / J. Li, Q. Wu, J. Wu. // *Handbook of Nanoparticles.* – Cham.: Springer International Publishing AG, 2016. – P. 295-328.

35. Zhou, Y.C. Hydrothermal synthesis and sintering of ultrafine CeO<sub>2</sub> powders / Y.C. Zhou, M.N. Rahaman // *J. Mater. Res.* – 1993. – Vol. 8. – No. 7. – P. 1680-1686.
36. Development of cerium oxide nanoparticles and its cytotoxicity in prostate cancer cells / G. Renu, V.V.D. Rani, S.V. Nair, et al. // *Adv. Sci. Lett.* – 2012. – Vol. 6. – No. 1. – P. 17-25.
37. Synthesis of cerium oxide nanoparticles by hydrothermal crystallization with citric acid / T. Masui, H. Hirai, N. Imanaka, et al. // *J. Mater. Sci. Lett.* – 2002. – Vol. 21. – No. 6. – P. 489-491.
38. Rajput, N. Methods of preparation of nanoparticles - a review / N. Rajput // *Int. J. Adv. Eng. Technol.* – 2015. – Vol. 7. – No. 4. – P. 1806-1811.
39. Photoluminescence properties of CeO<sub>2</sub>:Eu<sup>3+</sup> nanoparticles synthesized by a Sol-Gel method / L. Li, H.K. Yang, B.K. Moon, et al. // *J. Phys. Chem. C.* – 2009. – Vol. 113. – No. 2. – P. 610-617.
40. Sol-Gel synthesis, physico-chemical and biological characterization of cerium oxide/polyallylamine nanoparticles / M. Hosseini, I. Amjadi, M. Mohajeri, M. Mozafari // *Polymers (Basel).* – 2020. – Vol. 12. – No. 7. – ID: 1444.
41. Parashar, M. Metal oxides nanoparticles via Sol-Gel method: a review on synthesis, characterization and applications / M. Parashar, V.K. Shukla, R. Singh // *J. Mater. Sci.: Mater. Electron.* – 2020. – Vol. 31. – No. 5. – P. 3729-3749.
42. Synthesis, characterization and applications of iron oxide nanoparticles-a short review / E.A. Campos, D.V.B.S. Pinto, J.I.S. de Oliveira, et al. // *JATM.* – 2015. – Vol. 7. – No. 3. – P. 267-276.
43. Synthesis and characterization of cerium oxide nanoparticles: effect of cerium precursor to gelatin ratio / M.E. Ioannou, G.K. Pouroutzidou, I. Chatzimentor, et al. // *Appl. Sci.* – 2023. – Vol. 13. – No. 4. – ID: 2676.
44. A facile aqueous Sol-Gel method for high surface area nanocrystalline CeO<sub>2</sub> / P. Periyat, F. Laffir, S.A.M. Tofaila, E. Magner // *RSC Adv.* – 2011. – Vol. 1. – No. 9. – P. 1794-1798.

45. Pierre, A.C. Introduction to Sol-Gel processing / A.C. Pierre. – Cham.: Springer Nature Switzerland AG, 2020.
46. Solution combustion synthesis of nanoscale materials / A. Varma, A.S. Mukasyan, A.S. Rogachev, K.V. Manukyan // Chem. Rev. – 2016. – Vol. 116. – No. 23. – P. 14493-14586.
47. Solution combustion synthesis of cerium oxide nanoparticles as corrosion inhibitor / Z. Ghahramani, A.M. Arabi, M. Shafiee Afarani, M. Mahdavian // Int. J. Appl. Ceram. Technol. – 2020. – Vol. 17. – No. 3. – P. 1514-1521.
48. Fabrication of cerium oxide nanoparticles by solution combustion synthesis and their cytotoxicity evaluation / M. Zarezadeh Mehrizi, S. Ahmadi, R. Beygi, M. Asadi // Russ. J. Non-Ferr. Met. – 2018. – Vol. 59. – No. 1. – P. 111-116.
49. Review of recent studies on solution combustion synthesis of nanostructured catalysts / O. Thoda, G. Xanthopoulou, G. Vekinis, A. Chroneos // Adv. Eng. Mater. – 2018. – Vol. 20. – No. 8. – ID: 1800047.
50. Savun-Hekimoğlu, B. A review on sonochemistry and its environmental applications / B. Savun-Hekimoğlu // Acoustics. – 2020. – Vol. 2. – No. 4. – P. 766-775.
51. Gedanken, A. Using sonochemistry for the fabrication of nanomaterials / A. Gedanken // Ultrason. Sonochem. – 2004. – Vol.11. – No. 2. – P. 47-55.
52. Photocatalytic degradation of Methylene Blue and electrochemical sensing of paracetamol using Cerium oxide nanoparticles synthesized via sonochemical route / K.B. Kusuma, M. Manju, C.R. Ravikumar, et al. // Appl. Surf. Sci. Adv. – 2022. – Vol. 11. – ID: 100304.
53. Sonochemical synthesis of cerium oxide nanoparticles - effect of additives and quantum size effect / L. Yin, Y. Wang, G. Pang, et al. // J. Colloid Interface Sci. – 2002. – Vol. 246. – No. 1. – P. 78-84.
54. Qiao, S.Z. Synthetic chemistry of nanomaterials / S.Z. Qiao, J. Liu, G.Q. Max Lu // Modern Inorganic Synthetic Chemistry. – Amsterdam.: Elsevier, 2017. – P. 613-640.

55. Bumajdad, A. Cerium oxide nanoparticles prepared in self-assembled systems / A. Bumajdad, J. Eastoe, A. Mathew // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2009. – Vol. 147-148. – P. 56-66.
56. Microemulsion microstructure(s): a tutorial review / G. Tartaro, H. Mateos, D. Schirone, et al. // *Nanomaterials (Basel)*. – 2020. – Vol. 10. – No. 9. – ID: 1657.
57. Instability of emulsions made with surfactant-oil-water systems at optimum formulation with ultralow interfacial tension / R. Marquez, A.M. Forgiarini, D. Langevin, J.L. Salager // *Langmuir*. – 2018. – Vol. 34. – No. 31. – P. 9252-9263.
58. Malik, M.A. Microemulsion method: a novel route to synthesize organic and inorganic nanomaterials: 1st nano update / M.A. Malik, M.Y. Wani, M.A. Hashim // *Arab. J. Chem.* – 2012. – Vol. 5. – No. 4. – P. 397-417.
59. Characterization of cerium (IV) oxide ultrafine particles prepared using reversed micelles / T. Masui, K. Fujiwara, K. Machida, et al. // *Chem. Mater.* – 1997. – Vol. 9. – No. 10. – P. 2197-2204.
60. Structural characteristics of cerium oxide nanocrystals prepared by the microemulsion method / J. Zhang, X. Ju, Z.Y. Wu, et al. // *Chem. Mater.* – 2001. – Vol. 13. – No. 11. – P. 4192-4197.
61. ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells / A.V. Snezhkina, A.V. Kudryavtseva, O.L. Kardymon, et al. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2019. – Vol. 2019. – ID: 6175804.
62. Short overview of ROS as cell function regulators and their implications in therapy concepts / L. Milkovic, A. Cipak Gasparovic, M. Cindric, et al. // *Cells*. – 2019. – Vol. 8. – No. 8. – ID: 793.
63. Paiva, C.N. Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens? / C.N. Paiva, M.T. Bozza // *Antioxid. Redox Signal.* – 2014. – Vol. 20. – No. 6. – P.1000-1037.

64. Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis / L.J. Su, J.H. Zhang, H. Gomez, et al. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2019. – Vol. 2019. – ID: 5080843.
65. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health / V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, N. Chandra // *Pharmacogn. Rev.* – 2010. – Vol. 4. – No. 8. – P. 118-126.
66. Poljsak, B. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants / B. Poljsak, D. Šuput, I. Milisav // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2013. – Vol. 2013. – ID: 956792.
67. Therapeutic potential of nanoceria in regenerative medicine / D. Das, S. Chigurupati, J. Dowding, et al. // *MRS Bull.* – 2014. – Vol. 39. – No. 8. – P. 976-983.
68. Catalytic properties and biomedical applications of cerium oxide nanoparticles / C. Walkey, S. Das, S. Seal, et al. // *Environ. Sci. Nano.* – 2015. – Vol. 2. – No. 1. – P. 33-53.
69. Sprayable hydrogel dressing accelerates wound healing with combined reactive oxygen species-scavenging and antibacterial abilities / H. Cheng, Z. Shi, K. Yue, et al. // *Acta Biomater.* – 2021. – Vol. 124. – P. 219-232.
70. Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles / S.M. Hirst, A.S. Karakoti, R.D. Tyler // *Small.* – 2009. – Vol. 5. – No. 24. – P. 2848-2856.
71. Effect of cerium oxide nanoparticles on inflammation in vascular endothelial cells / A. Gojova, J.T. Lee, H.S. Jung, et al. // *Inhal. Toxicol.* – 2009. – Vol. 21 Suppl. 1. – Suppl.1. – P. 123-130.
72. Domala, A. Protective effects of nanoceria in imiquimod induced psoriasis by inhibiting the inflammatory responses / A. Domala, S. Bale, C. Godugu // *Nanomedicine (Lond).* – 2020. – Vol. 15. – No. 1. – P. 5-22.
73. Cerium and its oxidant-based nanomaterials for antibacterial applications: a state-of-the-art review / M. Qi, W. Li, X. Zheng // *Front. Mater.* – 2020. – Vol. 7. – ID: 220548666.

74. Cytotoxicity of CeO<sub>2</sub> nanoparticles for Escherichia coli. Physico-chemical insight of the cytotoxicity mechanism / A. Thill, O. Zeyons, O. Spalla, et al. // *Environ. Sci. Technol.* – 2006. – Vol. 40. – No. 19. – P. 6151-6156.
75. Cerium oxide nanoparticles (nanoceria): hopes in soft tissue engineering / H. Sadidi, S. Hooshmand, A. Ahmadabadi, et al. // *Molecules.* – 2020. – Vol. 25. – No. 19. – ID: 4559.
76. Effects of engineered cerium oxide nanoparticles on bacterial growth and viability / D.A. Pelletier, A.K. Suresh, G.A. Holton, et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2010. – Vol. 76. – No. 24. – P. 7981-7989.
77. Direct and indirect CeO<sub>2</sub> nanoparticles toxicity for Escherichia coli and Synechocystis / O. Zeyons, A. Thill, F. Chauvat, et al. // *Nanotoxicology.* – 2009. – Vol. 3. – No. 4. – P. 284-295.
78. Antibacterial mechanism and activity of cerium oxide nanoparticles / M. Zhang, C. Zhang, X. Zhai, et al. // *Sci. China Mater.* – 2019. – Vol. 62. – No. 11. – P. 1727-1739.
79. Zholobak, N.M. Interaction of nanoceria with microorganisms / N.M. Zholobak, V.K. Ivanov, A.B. Shcherbakov // *Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy.* – Norwich (NY): William Andrew Publishing, 2016. – P. 419-450.
80. Polydopamine and ammonium bicarbonate coated and doxorubicin loaded hollow cerium oxide nanoparticles for synergistic tumor therapy / K. Xu, Y. Cheng, J. Yan, et al. // *Nano Res.* – 2019. – Vol. 12. – No. 12. – P. 2947-2953.
81. Biogenic synthesis of cerium oxide nanoparticles using petals of *Cassia glauca* and evaluation of antimicrobial, enzyme inhibition, antioxidant, and nanozyme activities / A. Butt, J.S. Ali, A. Sajjad, et al. // *Biochem. Syst. Ecol.* – 2022. – Vol. 104. – ID: 104462.
82. The induction of angiogenesis by cerium oxide nanoparticles through the modulation of oxygen in intracellular environments / S. Das, S. Singh, J.M. Dowding, et al. // *Biomaterials.* – 2012. – Vol. 33. – No. 31. – P. 7746-7755.

83. Effects of cerium oxide nanoparticles on the growth of keratinocytes, fibroblasts and vascular endothelial cells in cutaneous wound healing / S. Chigurupati, M.R. Mughal, E. Okun, et al. // *Biomaterials*. – 2013. – Vol. 34. – No. 9. – P. 2194-2201.
84. Hierarchical acceleration of wound healing through intelligent nanosystem to promote multiple stages / Y. Cheng, Y. Chang, Y. Feng, et al. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. – 2019. – Vol. 11. – No. 37. – P. 33725-33733.
85. Hollow, rough, and nitric oxide-releasing cerium oxide nanoparticles for promoting multiple stages of wound healing / X. Ma, Y. Cheng, H. Jian, et al. // *Adv. Healthc. Mater.* – 2019. – Vol. 8. – No. 16. – ID: 1900256.
86. Electrospinning for tissue engineering applications / M. Rahmati, D.K. Mills, A.M. Urbanska, et al. // *Prog. Mater. Sci.* – 2021. – Vol. 117. – ID: 100721.
87. The history of electrospinning: past, present, and future developments / A. Keirouz, Z. Wang, V.S. Reddy, et al. // *Adv. Mater. Technol.* – 2023. – Vol. 8. – No. 11. – ID: 2201723.
88. Electrospun nanofibers for wound healing / M. Liu, X.P. Duan, Y.M. Li, et al. // *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* – 2017. – Vol. 76. – P. 1413-1423.
89. Incorporation of inorganic bioceramics into electrospun scaffolds for tissue engineering applications: a review / E. Bahremandi-Toloue, Z. Mohammadalizadeh, S. Mukherjee, S. Karbasi // *Ceram. Int.* – 2022. – Vol. 48. – No. 7. – P. 8803-8837.
90. Lu, T. Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering / T. Lu, Y. Li, T. Chen // *Int. J. Nanomedicine*. – 2013. – Vol. 8. – P. 337-350.
91. Recent progress on polymer scaffolds production: methods, main results, advantages and disadvantages / T.L. do Amaral Montanheiro, V. Schatkoski, B. Menezes, et al. // *Express Polym. Lett.* – 2022. – Vol. 16. – No. 2. – P. 197-219.
92. Advances in the scaffolds fabrication techniques using biocompatible polymers and their biomedical application: a technical and statistical review

- / A. Haider, S. Haider, M.R. Kummara, et al. // J. Saudi Chem. Soc. – 2020. – Vol. 24. – No. 2. – P. 186-215.
93. Siemann, U. Solvent cast technology - a versatile tool for thin film production / U. Siemann // Scattering Methods and the Properties of Polymer Materials. – Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005. – P. 1-14.
94. Mabrouk, M. Recent progress in the fabrication techniques of 3D scaffolds for tissue engineering / Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. – 2020. – Vol. 110. – ID: 110716.
95. Uchida, D.T. 3D printing as a technological strategy for the personalized treatment of wound healing / D.T. Uchida, M.L. Bruschi // AAPS PharmSciTech. – 2023. – Vol. 24. – No. 1. – ID: 41.
96. Bozkurt, Y. 3D printing technology; methods, biomedical applications, future opportunities and trends / Y. Bozkurt, E. Karayel // J. Mater. Res. Technol. – 2021. – Vol. 14. – P. 1430-1450.
97. Additive manufacturing of biodegradable magnesium-based materials: design strategies, properties, and biomedical applications / F. Badkoobeh, H. Mostaan, M. Rafiei, et al. // J. Magnes. Alloy. – 2023. – Vol. 11. – No. 3. – P. 801-839.
98. Fabrication and characterization of 3D-printed bone-like  $\beta$ -tricalcium phosphate/polycaprolactone scaffolds for dental tissue engineering / J. Park, S.J. Lee, H.H. Jo, et al. // JIEC. – 2017. – Vol. 46. – P. 175-181.
99. 3D printing of extremely viscous materials using ultrasonic vibrations / I.E. Gunduz, M.S. McClain, P. Cattani, et al. // Addit. Manuf. – 2018. – Vol. 22. – P. 98-103.
100. Garg, K. Electrospinning jets and nanofibrous structures / K. Garg, G.L. Bowlin // Biomicrofluidics. – 2011. – Vol. 5. – No. 1. – ID: 13403.
101. Recent advances in electrospun nanofibers for some biomedical applications / S. Sabra, D.M. Ragab, M.M. Agwa, S. Rohani // Eur. J. Pharm. Sci. – 2020. – Vol. 144. – ID: 105224.

102. Titanium nanorods loaded PCL meshes with enhanced blood vessel formation and cell migration for wound dressing applications / R. Augustine, A. Hasan, N.K. Patan, et al. // *Macromol. Biosci.* – 2019. – Vol. 19. – ID: 7.
103. Coaxial fibers of poly(styrene-co-maleic anhydride)@poly(vinyl alcohol) for wound dressing applications: dual and sustained delivery of bioactive agents promoting fibroblast proliferation with reduced cell adherence / L. Tamayo, P. Santana, J.C. Forero, et al. // *Int. J. Pharm.* – 2022. – Vol. 611. – ID: 121292.
104. Cerium oxide nanoparticle incorporated electrospun poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) membranes for diabetic wound healing applications / R. Augustine, A. Hasan, N.K. Patan, et al. // *ACS Biomater. Sci. Eng.* – 2020. – Vol. 6. – No. 1. – P. 58-70.
105. Technological aspects and evaluation methods for polymer matrices as dental drug carriers / D. Kida, T. Konopka, K. Jurczyszyn, B. Karolewicz // *Biomedicines.* – 2023. – Vol. 11. – No. 5. – ID: 1274.
106. Devi, N. Preparation and characterization of chitosan-bentonite nanocomposite films for wound healing application / N. Devi, J. Dutta // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2017. – Vol. 104. – No. Pt B. – P. 1897-1904.
107. Calendula flower extract loaded collagen film exhibits superior wound healing potential: preparation, evaluation, in-vitro & in-vivo wound healing study / L. Rathod, S. Bhowmick, P. Patel, K. Sawant // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* – 2022. – Vol. 72. – ID: 103363.
108. Antioxidant and antibacterial lignin nanoparticles in polyvinyl alcohol/chitosan films for active packaging / W. Yang, J.S. Owczarek, E. Fortunati, et al. // *Ind. Crop. Prod.* – 2016. – Vol. 94. – P. 800-811.
109. Antibacterial nano cerium oxide/chitosan/cellulose acetate composite films as potential wound dressing / Z. Kalaycıoğlu, N. Kahya, V. Adımcılar, et al. // *Eur. Polym. J.* – 2020. – Vol. 133. – ID: 109777.
110. Lipopeptide and zinc oxide nanoparticles blended polyvinyl alcohol-based nanocomposite films as antimicrobial coating for biomedical applications / A.

- Jayakumar, S. Radoor, I.C. Nair, et al. // *Process Biochem.* – 2021. – Vol. 102. – P. 220-228.
111. 3D printing of versatile reactionware for chemical synthesis / P.J. Kitson, S. Glatzel, W. Chen, et al. // *Nat. Protoc.* – 2016. – Vol. 11. – No. 5. – P. 920-936.
112. A review on 3D printing in tissue engineering applications / M.P. Mani, M. Sadia, S.K. Jaganathan, et al. // *J. Polym. Eng.* – 2022. – Vol. 42. – No. 3. – P. 243-265.
113. Advances in translational 3D printing for cartilage, bone, and osteochondral tissue engineering / S. Wan, S. Zhao, J. Yu, et al. // *Small.* – 2022. – Vol. 18. – No. 36. – ID: 2201869.
114. A gelatin-sulfonated silk composite scaffold based on 3D printing technology enhances skin regeneration by stimulating epidermal growth and dermal neovascularization / S. Xiong, X. Zhang, P. Lu, et al. // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7. – No. 1. – ID: 4288.
115. Development of *Satureja cuneifolia*-loaded sodium alginate/polyethylene glycol scaffolds produced by 3D-printing technology as a diabetic wound dressing material / E. Ilhan, S. Cesur, E. Guler, et al. // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2020. – Vol. 161. – P. 1040-1054.
116. Light-controlled growth factors release on tetrapodal ZnO-incorporated 3D-printed hydrogels for developing smart wound scaffold / L. Siebert, E. Luna-Cerón, L.E. García-Rivera, et al. // *Adv. Funct. Mater.* – 2021. – Vol. 31. – No. 22. – ID: 2007555.
117. N-halamine modified ceria nanoparticles: antibacterial response and accelerated wound healing application via a 3D printed scaffold / Z. Yang, X. Ren, Y. Liu // *Compos. B Eng.* – 2021. – Vol. 227. – ID: 109390.
118. Chitosan/PVA hydrogels incorporated with green synthesized cerium oxide nanoparticles for wound healing applications / K. Kalantari, E. Mostafavi, B. Saleh, et al. // *Eur. Polym. J.* – 2020. – Vol. 134. – ID: 109853.

119. Injectable, self-healable zwitterionic cryogels with sustained microRNA - cerium oxide nanoparticle release promote accelerated wound healing / G. Sener, S.A. Hilton, M.J. Osmond, et al. // *Acta Biomater.* – 2020. – Vol. 101. – P. 262-272.
120. Balakrishnan, S.B. Cerium oxide and peppermint oil loaded polyethylene oxide/graphene oxide electrospun nanofibrous mats as antibacterial wound dressings / S.B. Balakrishnan, S. Thambusamy // *Mater. Today Commun.* – 2019. – Vol. 21. – ID: 100664.
121. Biomimetic cerium oxide loaded gelatin PCL nanosystems for wound dressing on cutaneous care management of multidrug-resistant bacterial wound healing / Y. Fei, Q. Huang, Z. Hu, et al. // *J. Clust. Sci.* – 2021. – Vol. 32. – No. 5. – P. 1289-1298.
122. Cerium-containing N-acetyl-6-aminohexanoic acid formulation accelerates wound reparation in diabetic animals / E. Blinova, D. Pakhomov, D. Shimanovsky, et al. // *Biomolecules.* – 2021. – Vol. 11. – No. 6. – ID: 834.
123. Reconstruction of soft biological tissues using laser soldering technology with temperature control and biopolymer nanocomposites / A. Yu. Gerasimenko, E.A. Morozova, D.I. Ryabkin, et al. // *Bioengineering (Basel).* – 2022. – Vol. 9. – No. 6. – ID: 238.
124. Akhtar, M.J. CeO<sub>2</sub>-Zn nanocomposite induced superoxide, autophagy and a non-apoptotic mode of cell death in human umbilical-vein-derived endothelial (HUVE) cells / M.J. Akhtar, M. Ahamed, H. Alhadlaq // *Toxics.* – 2022. – Vol. 10. – No. 5. – ID: 250.
125. The distinct effect of titanium dioxide nanoparticles in primary and immortalized cell lines / L. Fayer, R.S.S. Zanette, J.T.C. Siqueira, et al. // *Toxicol. Res. (Camb).* – 2021. – Vol. 10. – No. 3. – P. 511-522.
126. Development of novel effective agents from 1#-indolylammonium trifluoroacetates effective against conditionally pathogenic microorganisms / Stepanenko I.S., Yamashkin S.A., Platkova T.N., Kiryutina A.I., Sorokvasha I.N. // *Research Results in Pharmacology.* 2022. T. 8. № 1. C. 43-50.

127. Изучение процессов заживления послеоперационной раны при z-образной пластике кожи в эксперименте на фоне применения церийсодержащего соединения n-ацетил-6-аминогексановой кислоты / Галиченко К.А., Блинова Е.В., Симакина Е.А., Сухов А.В., Шимановский Д.Н., Гилевская Ю.С., Скачилова С.Я., Тимошкин С.П., Кытько О.В., Сорокваша И.Н., Богоявленская Т.А. // Оперативная хирургия и клиническая анатомия (Пироговский научный журнал). 2022. Т. 6. № 3. С. 5-11.
128. Изучение ранозаживляющего действия наночастиц серебра и церия при лечении неосложненных кожных ран в эксперименте / Зинченко И.А., Струц И.С., Миронцев А.В., Климентов С.М., Дыдыкин С.С., Сорокваша И.Н., Романов М.Д., Елдырева М.В., Блинова Е.В., Тимошкин С.П. // Оперативная хирургия и клиническая анатомия (Пироговский научный журнал). 2024. Т. 8. № 4. С. 18-24.
129. Сравнительная оценка эффективности соединения тканей при лоскутной пластике с применением лазера (экспериментальное исследование) / Галиченко К.А., Рябкин Д.И., Сучкова В.В., Блинов К.Д., Дыдыкин С.С., Истранов А.Л., Герасименко Е.А., Игрункова А.В., Тимошкин С.П., Сорокваша И.Н., Герасименко А.Ю., Блинова Е.В. // Оперативная хирургия и клиническая анатомия (Пироговский научный журнал). 2024. Т. 8. № 2. С. 5-11.
130. Изучение эффективности лазерного соединения в комплексе с биологическими составами для восстановления кожного дефекта в лоскутной пластике в остром эксперименте / Галиченко К.А., Покидько У.А., Тимошкин С.П., Сорокваша И.Н., Сучкова В.В., Герасименко А.Ю., Блинова Е.В. // Медико-фармацевтический журнал Пульс. 2025. Т. 27. № 4. С. 42-47.
131. Спрей для лечения инфицированных и неинфицированных ран при сахарном диабете I типа / Скачилова С.Я., Ермакова Г.А., Блинова Е.В., Блинов Д.С., Алешина В.А., Симакина Е.А., Либерман Е.Ю.,

Кильмяшкина М.Ф., Мазов Ян.А., Соколов А.И., Пахомов Д.В., Шматок Д.О., Сухов А.В., Коваленко П.С., Сорокваша И.Н., Проскурина О.В., Шилова Е.В., Желтухин Н.К. // Патент на изобретение RU 2790837 С2, 28.02.2023. Заявка № 2021115803 от 02.06.2021.

132. Способ получения коллоидных наноразмерных частиц церия методом фемтосекундной лазерной абляции / Созаев И.В., Лунёв И.В., Целиков Д.И., Лактионов А.А., Блинова Е.В., Сорокваша И.Н., Щербаков К.А., Мамонов Д.Н., Попов А.А., Климентов С.М. // Патент на изобретение RU 2848812 С1, 21.10.2025. Заявка № 2025111022 от 28.04.2025.