



БАКТЕРИАЛЬНАЯ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗА КАК ПЛАСТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ ЗАКРЫТИЯ ДЕФЕКТОВ ТВЕРДОЙ МОЗГОВОЙ ОБОЛОЧКИ: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

А.В. Харченко, В.В. Ступак

Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна, Новосибирск, Россия

Цель исследования. Анализ публикаций, посвященных возможности применения бактериальной наноцеллюлозы в качестве пластического материала при дефектах твердой мозговой оболочки при патологии спинного мозга и позвоночника.

Материал и методы. Проведен поиск в базе научной медицинской периодической литературы PubMed по ключевым словам «bacterial cellulose properties» и «bacterial cellulose». Поиск ограничен статьями, опубликованными в англо- и русскоязычных журналах в 2009–2019 гг. Ограничение вызвано необходимостью современной оценки свойств бактериальной наноцеллюлозы. В результате поиска по ключевому слову «bacterial cellulose properties» обнаружено 963 работы, по «bacterial cellulose» — 3908 работ. Также использовали поисковую систему Google, в которой найдены статьи, отражающие тематику свойств бактериальной наноцеллюлозы, без которых невозможно полное понимание ее картины. На основе анализа выбрали 76 статей, наиболее полно отражающих данную тематику. Более 50 % — статьи последних 10 лет. Уровень доказательности — IV, градация рекомендации — C, но использованы рандомизированные исследования с уровнем доказательности Ib и уровнем рекомендации A.

Результаты. Имплантаты из бактериальной наноцеллюлозы способны выполнять роль межклеточного матрикса с барьерной функцией, создавая условия для циркуляции метаболитов и кислорода и препятствуя избыточной концентрации клеток.

Заключение. Использование бактериальной наноцеллюлозы в качестве имплантатов для закрытия дефектов твердой мозговой оболочки при патологии спинного мозга является перспективным направлением в нейрохирургии, поскольку наноцеллюлоза не вызывает спаечного процесса с нервной тканью и выполняет барьерную функцию.

Ключевые слова: спинной мозг, бактериальная наноцеллюлоза, синтез бактериальной целлюлозы, условия культивирования, свойства бактериальной целлюлозы, пластический материал.

Для цитирования: Харченко А.В., Ступак В.В. Бактериальная наноцеллюлоза как пластический материал для закрытия дефектов твердой мозговой оболочки: обзор литературы // Хирургия позвоночника. 2019. Т. 16. № 3. С. 62–73.

DOI: <http://dx.doi.org/10.14531/ss2019.3.62-73>.

BACTERIAL NANOCELLULOSE AS A PLASTIC MATERIAL FOR CLOSURE OF DEFECTS OF THE DURA MATER: LITERATURE REVIEW

A.V. Kharchenko, V.V. Stupak

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

Objective. To analyze publications devoted to the possibility of using bacterial nanocellulose as a plastic material for defects in the dura mater associated with spine and spinal cord pathology.

Material and Methods. The PubMed database was searched with keywords “bacterial cellulose properties” and “bacterial cellulose”. The search was limited to articles published in English- and Russian-language journals in 2009–2019. The limitation was caused by the need for up-to-date evaluation of the properties of bacterial nanocellulose. The search with keywords “bacterial cellulose properties” returned a list of 963 articles and with key words “bacterial cellulose” — a list of 3908 articles. The Google search engine was also used, in which articles were found actually reflecting properties of bacterial nanocellulose without which complete understanding of its nature is impossible. After assessing the found data, 76 articles were selected that reflect this issue to the fullest extent. More than fifty percent of the reviewed articles were published within the last 10 years. Evidence level: IV; recommendation grade: C, though randomized trials with evidence level Ib and recommendation level A are used.

Results. Implants made of bacterial nanocellulose are able to perform the function of the extracellular matrix by providing a barrier function, creating conditions for the circulation of metabolites and oxygen, and preventing the achievement of excess cell concentration.

Conclusion. The use of bacterial nanocellulose as an implant for closure of the dura mater defects associated with the spinal cord pathology is a promising direction in neurosurgery, since nanocellulose does not cause adhesions to the nervous tissue and performs a barrier function.

Key Words: spinal cord, bacterial nanocellulose, bacterial cellulose synthesis, cultivation conditions, properties of bacterial cellulose, plastic material.

Please cite this paper as: Kharchenko AV, Stupak VV. Bacterial nanocellulose as a plastic material for closure of defects of the dura mater: literature review. Hir. Pozvonoc. 2019;16(3):62–73. In Russian.
DOI: <http://dx.doi.org/10.14531/ss2019.3.62-73>.

По данным Ю.А. Зозули, Ю.В. Кушеля, Itzkovich et al. [1–3], опухоли спинного мозга составляют от 1,4 до 10,0 % всех опухолей центральной нервной системы (ЦНС). Ostrom et al. [4] информировали, что в США в 2007–2011 гг. первичные новообразования спинного мозга и конского хвоста составляли 6,0 % от всех опухолей ЦНС, а Helseth и Mork [5] заявили, что из всех экстрамедуллярных опухолей наиболее часто (25–46 % случаев) встречаются менингиомы.

Нередко после удаления новообразований спинного мозга, особенно менингиом, имеющих большой по площади матрикс, возникает дефект твердой мозговой оболочки (ТМО), который невозможно герметично закрыть собственной ТМО. Возникает необходимость его закрытия пластическим материалом для предотвращения развития вторичной ликвореи и псевдомиелорадикулоцеле, гнойных осложнений со стороны оболочек и спинного мозга. По нашим данным [6], вторичная ликворея и псевдомиелорадикулоцеле встречаются после удаления опухолей спинного мозга в 2,3 % случаев. Аналогичная ситуация может возникать и при операциях у больных с осложненной травмой позвоночника в раннем и позднем периодах позвоночно-спинномозговой травмы при задних доступах к спинному мозгу.

Часто возникает необходимость в пластике дефектов ТМО спинного мозга при врожденных спинно-мозговых грыжах. Исследования Американского центра по контролю и профилактике заболеваний [7] выявили, что врожденные менингомиелоцеле встречаются в 3,5 случаях на 10 тыс. новорожденных, а анализ Orioli et al. [8] – в 1,4 случаях (Бразилия).

Наиболее эффективной является герметизация ликворных пространств спинного мозга путем пластики ТМО с использованием собственных тка-

ней организма (аутотрансплантатов). Но применение для этих целей аутоканей больного ограничено трудоемкостью методики. Кроме того, использование участка фасции бедра является дополнительным травмирующим фактором для пациента, что чревато удлинением времени оперативного вмешательства. В настоящее время запрещено применение аллотрансплантатов (консервированной трупной ТМО) из-за возможности передачи инфекций и вирусов, а также из-за трудностей заготовки и хранения материала.

Широко используют для пластики ТМО синтетические материалы, но применение их далеко от совершенства. Почти за 100 лет усилий не удалось создать искусственных материалов для замены *dura mater* с идеальными свойствами. Основные проблемы использования имплантатов заключаются в следующем:

1) аллогенные ткани, а именно ткань ксенотрансплантата, могут вызывать отторжение имплантата;

2) ТМО и окружающая тканевая адгезия: после пластики имплантаты имеют разную степень адгезии, в основном связанную с воспалительным ответом, физическими и химическими свойствами материала (чем меньше содержание белка и жира в материале, тем ниже степень адгезии и воспалительный ответ);

3) развитие асептического воспаления;

4) применение аллогенных и ксеногенных материалов может привести к распространению среди людей и животных прионов и вирусов;

5) зарождающаяся грануляционная ткань, регенерирующая и покрывающая материал трансплантата, может вызывать кровотечение (возможен разрыв между материалом и некапиллярами, покрывающими матрицу; капилляры хрупкие, поэтому при смещении имплантата возможно кровотечение, в перидуральном простран-

стве может образоваться субдуральная гематома);

6) развитие ликвореи в результате отсутствия надежной герметизации дефекта ТМО;

7) возникновение сириномиелии за счет синдрома фиксированного спинного мозга в результате развития спаечного процесса;

8) слишком большие коллагеновые имплантаты лизируются, а новая неодуральная ткань не успевает образоваться.

В связи с этим по-прежнему актуальным является получение современного материала для пластики ТМО. С этих позиций оптимальным материалом, как нам представляется, является бактериальная наноцеллюлоза (БНЦ) в виде пленки, толщиной, сопоставимой с человеческой ТМО.

Цель исследования – анализ публикаций, посвященных возможности применения БНЦ в качестве пластического материала при дефектах ТМО.

Материал и методы

Проведен поиск в базе научной медицинской периодической литературы PubMed по ключевым словам «bacterial cellulose properties» и «bacterial cellulose». Поиск ограничен статьями, опубликованными в англо- и русскоязычных журналах в 2009–2019 гг. Ограничение вызвано необходимостью современной оценки свойств БНЦ. В результате поиска по ключевому слову «bacterial cellulose properties» обнаружено 963 работы, по «bacterial cellulose» – 3908 работ. Также использовали поисковую систему Google, в которой найдены статьи, отражающие тематику свойств БНЦ, без которых невозможно полное понимание ее картины. На основе анализа данных выбрали 76 статей. Более 50 % статей в обзоре – статьи последних 10 лет. Уровень доказательности – IV, градация рекомендации – C, но использу-

ются и рандомизированные исследования с уровнем доказательности Ib и уровнем рекомендации A.

Результаты

БНЦ известна уже более века. Она представляет собой линейную цепь полисахарида с той же химической структурой, что у растительной целлюлозы. Род *Acetobacteraceae* – наиболее эффективный производитель бактериальной наноцеллюлозы. *Acetobacter xylinum* был переименован в *Glucosonaacetobacter xylinum* (*G. xylinum*) в 2006 г. По сведениям Brown [9], *G. xylinum* из семейства *Acetobacteraceae* – аэробная грамотрицательная палочкообразная бактерия, которая впервые выделена в 1886 г. для получения уксуса.

В 2012 г. Yamada et al. [10] предложили новую классификацию, а именно выделили отдельный род *Komagataeibacter* и выявили его новые комбинации на основе таксономических и генетических характеристик. Были выделены следующие виды: *Komagataeibacter xylinus*, *Komagataeibacter hansenii*, *Komagataeibacter europaeus*, *Komagataeibacter oboediens*, *Komagataeibacter inter medius*, *Komagataeibacter swingsii*, *Komagataeibacter rhaeticus*, *Komagataeibacter saccharivorans*, *Komagataeibacter nataicola*, *Komagataeibacter sucrofermentans*, *Komagataeibacter kakiaceti*, *Komagataeibacter kombuchae*, *Komagataeibacter maltaceti*, *Komagataeibacter medellinensis*.

Komagataeibacter xylinus – грамотрицательная палочка, продуцирующая уксусную кислоту во время ферментации и наиболее активно вырабатывающая бактериальную наноцеллюлозу. Гипотеза, выдвинутая нами и Williams et al. [11], поясняет, с какой целью продуцируется бактерией БНЦ: 1) для закрепления бактериальных клеток в статической культуре на поверхности среды образуется пленка, для обеспечения достаточного содержания кислорода бактериям; 2) для предотвращения рентгеновского излучения или сильного солнечного света; 3) для предупреждения

попадания ионов тяжелых металлов; 4) для транспортировки питательных веществ посредством диффузии; 5) для удержания влаги; 6) для образования целлюлозы бактериями (механизм защиты от высыхания и других бактерий).

Штамм бактерии является одним из значимых факторов, влияющих на производство БНЦ. Именно от штамма, условий и метода культивирования, а также среды зависят механические свойства БНЦ, пористость и толщина.

Способы продукции БНЦ. Watanabe et al. [12] установили, что БНЦ можно продуцировать двумя способами культивирования: статическим и динамическим, а также с помощью биореакторов. В статических условиях пленка продуцируется в виде пласта, растет утолщающимся периферическим валиком у стенки контейнера, а центр ее тоньше, так как бактерии прикрепляются к стенкам контейнеров и продуцируют в этом месте больше целлюлозы.

БНЦ в динамических условиях растет в виде гранул, имеющих сферическую форму. Hu et al. [13] доказали, что целлюлозные шарики, полученные при 200 об./мин, были полыми, в то время как шарики, полученные при 150 об./мин, не были полыми. Целлюлоза, культивированная методом перемешивания, обладает меньшей механической прочностью по сравнению с целлюлозой, полученной в результате статического культивирования. По мнению Ruka et al. [14], способ культивирования с перемешиванием приводит к более низким выходам по сравнению со статической культурой и, вероятно, высшей мутацией в микроорганизмах, которая может влиять на продукцию БНЦ. Статический способ культивирования требует большей площади, чем динамический способ.

Условия культивирования. Castro et al. [15] установили, что бактерия *Komagataeibacter xylinum*, используя различные источники углеводов, способна продуцировать целлюлозу внеклеточно при температу-

рах между 25 и 30 °C и pH от 3 до 7. Эти данные подтверждают Gromet et al. [16], по мнению которых оптимальный синтез целлюлозы происходит в статических условиях между 28 и 30 °C при pH от 4 до 6. Бактерия *Komagataeibacter xylinus* способна эффективно синтезировать целлюлозу из множества углеводных субстратов. Mikkelsen et al. [17] показали, что наиболее эффективное производство достигается при применении глюкозы, сахарозы и глицерина, являющихся основными источниками углеводов. Keshk et al. [18] считают, что метаболизм глюкозы приводит к накоплению глюконовой кислоты (ГК) и одновременному снижению pH. Синтез целлюлозы снижается вследствие накопления ГК при pH культуры менее 4. Когда вся глюкоза при pH 4–6 в среде окислится, бактерии начинают метаболизировать ГК. При потреблении бактериями ГК наблюдается постепенное увеличение в культуре pH. По данным Hwang et al. [19], синтез целлюлозы и деление клеток возобновятся только после того, как уровень pH поднимется выше 4. Эта тенденция наблюдалась в условиях перемешивания среды, когда уровень кислорода в среде повышался, так как бактерия является облигатным аэробом. Растворенный в среде кислород и его концентрация могут в значительной степени влиять на скорость целлюлозного синтеза. По исследованиям Tantratian et al. [20], культуры, содержащие малое количество кислорода, не способны вырастить значительное количество целлюлозы.

По мнению Mohammadkazemi et al. [21], на производство БНЦ и выход продукции влияют различные важные параметры: метод культивирования, источник углеводов, штамм бактерий, кислотность и температура, тип, количество и состав среды.

Процесс и механизм формирования волокон БНЦ. Молекулы целлюлозы синтезируются внутри бактерий. El-Saied et al. [22] доказали, что БНЦ образуется в результате экстрацеллюлярной секреции нановолокон, продуцируемых различными видами бак-

терий. Основной единицей микрофибриллы является протофибрилла. Из исследований Lee et al. [23] следует, что протофибриллы выходят через маленькие поры (50–80 пор на поверхности бактерии) как тонкие лентообразные оси по одной из поры и вплетаются друг в друга. После экстракции протофибриллы под действием β -1-4-глюкановых связей кристаллизуются и объединяются в микрофибриллы. Протофибрилла имеет определенную кристаллическую форму, которая зависит от генома бактерий и условий синтеза. По мнению Brown et al. [24], бактерия управляет сборкой протофибрилл при выстраивании вдоль мембраны клетки бактерии терминальных целлюлозных синтезирующих комплексов, происходит протофибриллярная кристаллизация. Ross et al. [25] выявили, что микрофибриллы (полоски шириной 20–50 нм) свободно формируются из лентообразных протофибрилл, которые в точной иерархической последовательности состоят из 1000 глюкановых цепей. Benzman et al. [26] считают, что взаимная ориентация связанных глюкановых цепей и ориентация последовательных связей цепей есть результат взаимосвязанной кристаллизации и полимеризации *in vivo*, что объясняет свойство менее стабильной структуры кристаллической модификации целлюлозы I. Одна клетка бактерии производит микрофибриллу целлюлозы из 10–100 протофибрилл. По данным Brown et al. [27], каждая протофибрилла собирается в линейном терминальном комплексе, который состоит из трех субъединиц (сайтов, синтезирующих целлюлозу), каждая субъединица содержит, по меньшей мере, 16 каталитических субъединиц целлюлоз-синтаз. Микрофибриллы объединяются в ленты, а переплетенные ленты формируют пленку. В своем нативном состоянии пленка БНЦ представляет собой сеть из набухших переплетенных лент.

Таким образом, протофибриллы за счет своих наноразмерных свойств образуют магистрали для клеточного роста и образования тканей и на микро-

скопическом и клеточном уровнях обеспечивают каркасную и полужесткую наноструктуру, схожую с собственными тканями организма.

Отличия БНЦ от растительной целлюлозы и ее чистота. Ультратонкая БНЦ отличается от растительной целлюлозы высокой чистотой и степенью кристалличности, большей способностью к адсорбции жидкости, прочностью структуры волокон, а также их наноразмерностью. Исследования Jonas et al. [28] подтверждают, что химически идентичная, она отличается от растительной целлюлозы степенью полимеризации, которая у БНЦ 2000–6000, а у растительной целлюлозы – от 13000 до 14000. Krassig et al. [29] в своем исследовании определили, что степень полимеризации бактериальной наноцеллюлозы 2700.

Основная химическая формула целлюлозы:

$$C_6^nH_{10}P + 2O_{5p} + 1 \approx (C_6H_{10}O_5)_P$$

или $(C_6H_{10}O_5)_n$,
где p – степень полимеризации; n – число звеньев в цепи.

По мнению Krassig et al. [29], целлюлоза представляет собой полисахарид с прямой цепью, состоящий из молекул D-глюкозы (является элементарным звеном целлюлозы), соединенных β -1,4-связями. Молекулярная масса (m_0) базовой единицы глюкозы составляет 162 ммоль/л, молекулярная масса полимера целлюлозы – $M_r = m_0P + 18 \approx 162P$, где P – степень полимеризации. По исследованиям Klemm et al. [30], элементный состав среднего слоя БНЦ состоит из 44,71 % С, 6,68 % Н и 1,47 % О, а после очистки раствором NaOH – 44,16 % С, 6,56 % Н и 0,25 % О.

Yamanaka [31] пояснил, что одним из преимуществ БНЦ является то, что она лишена лигнина, пектина, гемицеллюлозы и других биогенных продуктов, которые обычно связаны с клеточными стенками растений. После химической и термической очистки от бактериального полисахарида БНЦ уже на 100 % состоит из чистой целлюлозы и становится прозрачной.

Микробная целлюлоза идентична растительной по молекулярной формуле и полимерной структуре, но две формы отличаются расположением гликозильных единиц в элементарных ячейках кристаллитов, что приводит к более высокой кристалличности бактериальной целлюлозы.

Размеры волокна и пор. Haigler [32] доказал, что размер протофибриллы составляет приблизительно 0,0015 мкм в диаметре. Iguchi et al. [33] определили, что протофибриллы имеют диаметр приблизительно 0,002–0,004 мкм. Из этих протофибрилл собрана ленточная микрофибрилла длиной около 0,08 мкм. Микрофибриллы объединяются в ленты. Нановолокна БНЦ представляют собой лентообразные структуры диаметром около 0,1 мкм и длиной около 100 мкм. Волокна объединяются в сеть. Сеть БНЦ – пористый материал с наноразмерными порами. При наложении лент друг на друга увеличивается площадь пор и толщина БНЦ. Grande et al. [34] определили, что в высушенной БНЦ средний размер поры (ячейки) составляет $0,523 \pm 0,273$ мкм, а ориентация (средний угол, образованный сегментами и осью x) нановолокон – $85,64^\circ \pm 0,56^\circ$.

В исследовании Favi et al. [35] изучалась морфология лиофилизированной и полностью высушенной БНЦ. Диаметр волокна лиофилизированной БНЦ – 0,032 мкм со стандартным отклонением 0,01085. Диаметр волокна высушенной в критической точке БНЦ – 0,029 мкм со стандартным отклонением 0,00828. Размер пор лиофилизированной БНЦ составил 0,254 мкм со стандартным отклонением 0,07665 мкм. При гидратации размер пор существенно уменьшается за счет набухания волокон и дополнительной гидратной оболочки вокруг волокон. Таким образом, вопрос о пористости бактериальной целлюлозы, имплантированной в организм человека, остается на сегодняшний день нерешенным. Например, диаметр эритроцита – 7 мкм, размеры человеческого фибробласта находятся в пределах 10–40 мкм. Клеткам проблематично

проникать в поры нативной БНЦ, которые меньше размера клеток. По мнению Uraki et al. [36], из-за своей нанопористой структуры БНЦ препятствует пенетрации как клеток организма, так и бактерий. Данное свойство очень важно, так как имплантаты из БНЦ являются барьером для патогенных бактерий.

Формирование нативной целлюлозы начинается снизу вверх, а именно к верхнему слою примыкает лежащий ниже. С точки зрения Klemm et al. [37], нижняя поверхность более пористая, позволяет хондроцитам человека проникать до 70 мкм вглубь мембраны, а верхняя поверхность – плотная и компактная, полностью ограничивает миграцию клеток внутри сети. Tang et al. [38] отмечают, что из-за чрезвычайно небольшой объемной доли нановолокон целлюлозы пористость БНЦ колеблется от 92 до 94 % (объем пустот по отношению к общему объему). Это свойство обеспечивает высокий уровень инертности и биосовместимости (так как содержание в имплантатах из БНЦ каких-либо веществ, помимо воды, незначительно, зависит от чистоты целлюлозы). Пористость является важным моментом при доставке питательных веществ и кислорода, так как они необходимы для пролиферации клеток. Важна она и в тканевой инженерии, так как размер пор не позволяет клеткам проникать вглубь скаффолда. Хорошо проходят через поры низкомолекулярные белки, углеводы, вода и кислород.

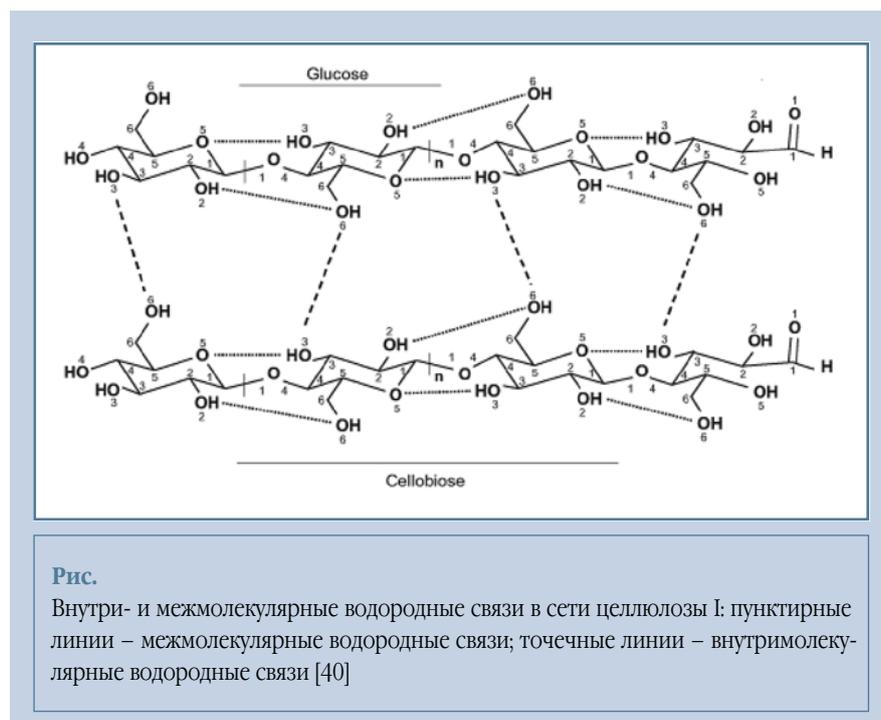
На сегодняшний день недостаточно изучен вопрос поведения белков, молекулярных агрегатов в пористых структурах, включая БНЦ. Весьма вероятно, что формирование агрегатов внутри БНЦ приведет к накоплению отдельных видов белковых молекул, липидов, полисахаридов, следовательно, белковый и липидный состав имплантата на основе БНЦ могут отличаться от состава плазмы крови, ликвора или тканевой жидкости.

Гидрофильность БНЦ. Из-за гидрофильной природы БНЦ вода обильно удерживается внутри сети нановолокон, материал ведет себя как гидро-

гель. Klemm et al. [39] указывают, что в природном гидратированном состоянии БНЦ состоит из более чем 99 % воды и менее чем 1 % цельной целлюлозы. Гидрофильность влажной пленки объясняется структурой пор и туннелей и зависит от общей площади внутренней и наружной поверхностей пор нативной целлюлозы. С точки зрения Klemm et al. [30], влагоудержание нативной бактериальной целлюлозы приближается к 1000 %. Для сравнения, высушенная на воздухе бактериальная целлюлоза может содержать 106 % воды, лиофилизированная бактериальная целлюлоза – 629 %, хлопковые волокна – 60 %. Контроль пористости может быть использован для изменения потенциала удерживания воды и скорости высвобождения воды из БНЦ. Оба параметра (потенциал удерживания воды и скорость высвобождения воды) определяют полезность БНЦ как перевязочного материала. Содержание влаги в перевязочном материале ускоряет процессы заживления ран, так как клетки лучше растут и регенерируют во влажных условиях.

Прочность БНЦ. Характерной особенностью бактериальной целлюлозы является ее механическая прочность. Для этого полимера известны три типа

межмолекулярного взаимодействия: водородные связи – силы с малой энергией взаимодействия, силы Ван-дер-Ваальса, ковалентные связи. В целлюлозе β (1 \rightarrow 4) ковалентные прочные связи возникают между глюкозными мономерными фрагментами, определяют линейное выравнивание, что способствует образованию двух внутримолекулярных водородных связей в каждом остатке глюкозы. Festucci-Buselli et al. [40] описали внутри- и межмолекулярные водородные связи: одна водородная связь связывает гидроксильную группу в положении 6 глюкозного фрагмента с гидроксильной группой в положении 2 следующего фрагмента глюкозы. Другая водородная связь связывает гидроксильную группу в положении 3 с гидроксильной группой в положении 5. Межмолекулярные водородные связи объединяют различные цепи целлюлозы через взаимодействие гидроксильных групп в положениях 3 и 6 (рис.). Небольшая энергия водородных связей компенсируется их огромным количеством за счет высокой степени полимеризации целлюлозы, в суммарном виде она может превосходить энергию ковалентных связей в макромолекуле. Силы Ван-дер-Ваальса действуют



на значительно больших расстояниях, чем водородные связи, но их энергия значительно меньше. Водородные связи, силы Ван-дер-Ваальса, ковалентные связи в БНЦ имеют важное значение. Они определяют физическую структуру целлюлозы (форму макромолекул, фазовые и релаксационные состояния, надмолекулярную структуру) и оказывают влияние на все свойства целлюлозы – физические, физико-химические и химические.

Более высокие механические свойства БНЦ по сравнению с растительной целлюлозой объясняются более выраженной микроструктурой. Sugiyama et al. [41] считают, что микрофибриллы связаны также и через межфибрилярные водородные связи, как и в растительной целлюлозе. Тем не менее плотность межфибрилярных водородных связей выше, так как микрофибриллы гораздо тоньше, что приводит к большей площади контакта. По мнению Klemm et al. [39], одиночные волокна БНЦ имеют механическую прочность стали или кевлара. Механические свойства гидрогеля частично определяются содержанием воды и выделением воды во время сжатия. Водоудерживающая способность гидрогеля БНЦ зависит от структурного состава сети волокон.

Таким образом, механические свойства БНЦ определяются многочисленными межволоконными связями, возникающими в результате образования Н-связей, ковалентных связей, и Ван-дер-Ваальсовыми силами между макромолекулами целлюлозы на поверхностях фибрилл и волокон. Отсюда и высокая прочность БНЦ.

Биодеградация. Биодеградация (гидролитическое разложение целлюлозы) может быть катализирована химически (например, действием кислот) или ферментативно. Целлюлозодеградирующие ферменты, называемые целлюлазами, встречаются у некоторых видов грибов и бактерий, позволяют им превращать целлюлозу в низкомолекулярные соединения, вплоть до мономеров. Дegradация происходит гидролазной атакой на β (1 → 4) связи. Поэтому очень

важно при производстве изделий из БНЦ, чтобы эти грибы и бактерии не попали в изделие.

Martson et al. [42] изучали биодеградацию вискозной целлюлозы в изделии Cellspont. В процессе производства изделие обрабатывали разбавленной серной кислотой и раствором гипохлорита натрия. Микропоры увеличивались внутри стенок пор через 16 недель после имплантации. Этот материал не полностью деградировал после 60 недель имплантации в крысах. Этот способ может использоваться и для БНЦ.

В своей нативной форме целлюлоза состоит из аморфных и кристаллических частей. Beguin [43] доказал, что в кристаллических частях водородные связи удерживают отдельные молекулы, а физическая природа БНЦ уменьшает доступность гидролитических ферментов. По исследованиям Miyamoto et al. [44], целлюлоза с более высокой степенью кристалличности более устойчива в тканях.

В клетках млекопитающих нет фермента целлюлазы, необходимого для деградации целлюлозы. По данным Mendes et al. [45], не обнаружено изменений в структуре нативной БНЦ после имплантации в швейцарских мышей-альбиносов в течение 90 дней. На основании этого эксперимента можно сделать вывод, что каркасы-имплантаты на основе БНЦ не разрушаются в нормальной культуре клеток, что делает их перспективными в качестве каркасов для долгосрочных трехмерных клеточных культур. Li et al. [46] писали о повышенной деградации БНЦ *in vitro* путем окисления периодатом. После этой обработки БНЦ приобретает способность к распаду в воде, фосфатно-солевом буфере при 37 °С, в то время как оригинальная структура сети БНЦ остается интактной. В физиологическом растворе нативная целлюлоза не растворяется.

Стерилизация. Varud et al. [47] подтвердили, что БНЦ термостабильна до 200 °С. Термическая деградация начинается в диапазоне 200–400 °С. БНЦ стерилизуют сухим теплом (>140 °С) или автоклавированием

(121 °С). Стерилизация БНЦ в нативном или лиофилизированном состоянии происходит без изменения структуры сети. Последний аспект кажется очень важным для долговременного хранения и стабильности материалов БНЦ. Гамма-стерилизация, проводимая в стандартизированных условиях (≥ 25 кГр), не вызывает макроскопически обнаруживаемых изменений целостности БНЦ. Именно стерилизация как метод борьбы с микро- и грибковой флорой позволяет длительно хранить медицинские изделия.

Биоактивность клеток БНЦ. Биоактивность означает, что биоматериал оказывает прямое влияние на физиологию и морфологию живых клеток, контролируя их адгезию, миграцию, пролиферацию, дифференцировку и высвобождение внеклеточного матрикса, ведущих к образованию новой ткани. Исследования Petersen et al. [48] подтверждают, что с клеточной точки зрения важной особенностью БНЦ является строение ее нанофибрилл, напоминающее структуру внеклеточных матричных компонентов, а именно коллагена. БНЦ и коллаген имеют одинаковый диаметр (менее 0,1 мкм), оба являются полимерами, функционирующими, в основном, как механические опорные структуры.

Vodin et al. [49] доказывают, что БНЦ имитирует собственную ткань организма, обеспечивает хорошую матрицу для *in vitro* посева клеток и последующего применения в тканевой инженерии. Из-за увеличения площади поверхности и возможности трехмерного посева БНЦ поддерживает эффективную адгезию клеток и предотвращает дедифференциацию. Пористая структура БНЦ позволяет обеспечить массовый перенос питательных веществ и кислорода, поддерживая выживание клеток. Нановолокна БНЦ могут участвовать в ориентации молекул внеклеточного экстрацеллюлярного матрикса, осаждаемого клетками. При добавлении химических веществ, усиливающих адгезию клеток, пролиферация этих клеток может и не увеличиваться. БНЦ может

поддерживать рост эндотелиальных, гладкомышечных клеток, хондроцитов и не вызывает токсического влияния на них. Svensson et al. [50] в исследованиях БНЦ в качестве заменителя хрящевой ткани показали, что она превзошла альгинат, пластик и способствует миграции и пролиферации хондроцитов. Zahedmanesh et al. [51] определили, что пористые трубки БНЦ могут иметь потенциал для использования в качестве тканевых каркасов кровеносных сосудов. Трубки были засеяны гладкомышечными клетками бычьей аорты и эндотелиальными клетками крупного рогатого скота, которые культивировались в просвете БНЦ и пролиферировали в конфлюирующем слое клеток. Andersson et al. [52] засеяли пористые каркасы БНЦ суставными хондроцитами от взрослых пациентов, а также неонатальными суставными хондроцитами. Проведенные анализы показали, что хондроциты размножаются в пористой БНЦ. Таким образом, этот новый биоматериал может быть использован для регенерации хрящевой ткани.

Kim et al. [53] обнаружили, что композит БНЦ с желатином показал хорошую адгезию фибробластов и пролиферацию. Биосовместимость была улучшена по сравнению с чистой БНЦ, а созданные скаффолды биоактивны.

Для получения большей пористости и площади поверхности БНЦ Gao et al. [54] использовали сублимационную сушку. БНЦ подтвердила отличную биосовместимость с мезенхимальными стволовыми клетками, полученными из синовиальных фибробластов.

Souza et al. [55] использовали стволовые клетки, полученные из жировой ткани, с включением в целлюлозную мембрану. Они определили, что интеграция между стволовыми клетками из жировой ткани и БНЦ-мембраной была удовлетворительной, композит выполнял доставку клеток в поврежденную ткань. Принимаемые стволовые клетки участвовали в процессе регенерации раны и, в зависимости от состава клеток, способствовали клеточному росту и заживлению ран.

Krontiras et al. [56] изготовили из композита БНЦ-альгинат 2D- и 3D-пористые скаффолды. Для получения пористой структуры под действием сублимационной сушки смеси альгината и БНЦ происходит поперечная сшивка соседних молекул. Исследования показали, что на двухмерных поверхностях клетки были чуть заметны. Клетки, выращенные в макропористых 3D-каркасах, содержали больше клеток, растущих в кластерах. Скаффолды с более низким относительным содержанием альгината имеют большую пористость и гидрофильность. Исследование показало, что трехмерное культивирование адипоцитов в макропористых каркасах БНЦ является перспективным методом для изготовления жировой ткани в качестве модели *in vitro* для биологии жиров и метаболических заболеваний. Favi et al. [55] доказали, что БНЦ является цитосовместимой с лошадиными мезенхимальными стволовыми клетками костного мозга, поддерживает адгезию, пролиферацию, остеогенную и хондрогенную дифференциацию, а сами клетки являются жизнеспособными и метаболически активными.

Многочисленные примеры биоактивности различных клеток на БНЦ подтверждают многообещающую перспективу дальнейшего использования БНЦ в качестве скаффолда.

Бактериальная целлюлоза и клеточная адгезия. Клеточная адгезия не может быть достигнута с нативной БНЦ. Chu et al. [57] показали, что обработка плазмой улучшает биосовместимость клеток, их физико-химические свойства и оптимизирует биофункциональность. Экспериментальные данные Pertile et al. [58] подтверждают, что обработка поверхности БНЦ плазмой улучшает адгезию микрососудистых и нейробластных клеток, но не оказывает никакого влияния на фибробласты.

Pertile et al. [59] использовали некоторые из малых пептидов, найденных в сигнальных белках внеклеточного матрикса, таких как интегрин-лиганд со следующей последовательностью: изолейцин-лизин-валин-аланин-

валин, слитых с целлюлозосвязывающим модулем, с целью улучшения адгезии клеток к поверхности БНЦ. Эти рекомбинантные белки были адсорбированы на БНЦ, тем самым они повысили адгезию нейрональных и мезенхимальных клеток.

Andrade et al. [60] улучшили сцепление фибробластов с БНЦ. Им удалось обволочить нановолокна БНЦ целлюлозосвязывающим модулем, соединяющимся с последовательностью аминокислот глицин-тирозин (образуется комплекс глицин-аргинин-глицин-аспарагин-тирозин). Результаты показали, что фибробласты проявляют эффективное взаимодействие с БНЦ за счет данного комплекса.

Вышеуказанные исследования доказывают, что различные пептиды улучшают клеточную адгезию.

Биосовместимость бактериальной целлюлозы. Биосовместимость БНЦ заключается в способности находиться в контакте с живыми тканями, не вызывая каких-либо токсических или иммунологических побочных эффектов. Хорошая биосовместимость была описана Klemm et al. [30] для трубчатых полых БНЦ-трансплантатов, применяемых в качестве протезов для кровеносных сосудов. Демонстрировались отличные результаты биосовместимости БНЦ у крыс путем ее подкожной имплантации в течение 12 недель. Микроскопически выявлено полное отсутствие фиброзных капсул и макрофагов, что указывает на отсутствие реакции организма при коротких и при длительных имплантациях.

Mendes et al. [45] оценивали тканевую реакцию в присутствии мембраны БНЦ после подкожной имплантации у мышей. Они провели анализ гистологических участков мембраны и окружающих тканей на 7, 15, 30, 60 и 90-й день после операции, при этом не обнаружили признаков реакции отторжения организма на протяжении всего периода исследования. Полиморфно-ядерные лейкоциты и лимфоциты, наблюдаемые на 7, 15 и 30-й день после операции, подтверждали умеренную воспалительную реакцию.

Но на 60-й и 90-й день после операции никакой воспалительной реакции не наблюдалось.

Mormino et al. [61] выявили, что биосовместимость может быть улучшена путем изменения размера пор БНЦ. Для этого использовали порогены, которые увеличивают пористость сети БНЦ. Backdahl et al. [62] в качестве порообразователей использовали крахмал и парафин, которые давали возможность контролировать размер пор и взаимосвязь с БНЦ. При химическом удалении крахмала или парафина образовались площадки для прикрепления различных клеток. Исследования Backdahl et al. [62] показали, что мышечные клетки в состоянии прикрепляться внутрь поры, а также сокращаться.

Применение БНЦ в нейрохирургии на экспериментальных моделях и в клинической практике. Особое внимание привлекают исследования по пластике ТМО БНЦ. Mello et al. [63] указали на низкую реакцию БНЦ как имплантата для ТМО у собак. Xu et al. [64] применяли БНЦ для восстановления целостности ТМО кроликов. На основании гистологических исследований они показали, что на 30-й день БНЦ покрывалась соединительной тканью, а формирование периостальной новой костной ткани было видно на 360-й день. Новая кость была трудноотделима от окружающих тканей. В этом исследовании сравнивали БНЦ с бесклеточным бычьим перикардиальным графтом Normal GEN. Результаты показали, что при имплантации БНЦ дает менее выраженную воспалительную реакцию организма. Об этом свидетельствовали низкие уровни экспрессии IL-1 β , IL-6, ФНО- α , индуцибельной синтазы оксида азота и циклооксигеназы-2, показатели которых на 7-й–14-й день были достоверно ниже, чем в группе с Normal GEN ($P < 0,05$). Данное исследование подтверждает, что БНЦ может использоваться для восстановления дефектов ТМО у кроликов, при этом она не образует спаек с мозговой тканью.

Lima et al. [65] выполнили пластику ТМО БНЦ 40 крысам линии Wistar, разделенным на две группы: контрольную, в которой использовали синтетический заменитель ТМО из инертного вспененного политетрафторэтилена под названием Preclud, и основную, где применяли БНЦ. Животных наблюдали 120 дней. У них не было зафиксировано инфекционных осложнений, ликвореи, отсроченных кровоизлияний, нарушения поведения, судорог и параличей. Отмечена хорошая биосовместимость БНЦ и отсутствие иммунных реакций организма на ее трансплантацию.

Sanchez e Oliveira Rde et al. [66] на 74–77-й день беременности у овечьих плодов создали внутриутробную модель менингомиелоцеле. Все животные были разделены на три группы: контрольную, в которой животных не оперировали, и две группы, в которых оперировали с использованием бесклеточного дермального матрикса AlloDerm (группа А) и с БНЦ (группа В).

В группе А было 4 животных, в группе В – 6. Закрывтие дефекта производили на 100-й день беременности имплантатом, в дальнейшем плоды содержались в утробе. Овец выводили из эксперимента на 140-й день беременности. Позвоночник плода подвергали макро- и микроскопическому исследованию. При микроскопии анализировали адгезию материала к коже и нервной ткани.

Во всех случаях в группе А отмечалось вращение кровеносных сосудов из ткани реципиента в AlloDerm. Имплантат был интегрирован в кожу без четкой границы. Также не было четкой грани между имплантатом и мозгом, что подтверждает спаечный процесс.

В группе В имплантат Nexfill был покрыт фибробластами и соединительной тканью на гистологическом срезе. При этом фибробласты формировали новый клеточный слой, напоминающий новую ТМО. Соединительная ткань или коллаген не проникают в слой Nexfill. Кроме того, не наблюдали пролиферации кровеносных сосу-

дов, вращаясь клеток и адгезии к поверхности Nexfill. Эти характеристики, описанные для Nexfill, заметно отличались от характеристик, наблюдаемых в группе А, и были статистически значимыми ($P = 0,029$; критерий Фишера). Авторы наблюдали адгезию, множественную клеточную миграцию и пролиферацию сосудов в AlloDerm во всех срезах. При этом все эти признаки не наблюдали у животных в группе с БНЦ ($P < 0,05$).

Таким образом, исследование Sanchez e Oliveira Rde et al. [66] показало, что БНЦ предотвращала адгезию мозгового вещества, в то время как при использовании кожного матрикса этого не происходило. На данном основании авторы считают, что БНЦ за счет отсутствия спаечного процесса снижает риск образования синдрома фиксированного спинного мозга.

После экспериментальных работ с использованием БНЦ для закрытия миеломиелоцеле на кроличьих [67, 68] и овечьих [69–73] моделях ученые приступили к клиническим исследованиям.

По патологии спинного мозга в виде менингомиелоцеле имеются два исследования: MOMS и CECAM. MOMS проводили Adzick et al. [74], оно зарегистрировано на сайте ClinicalTrials.gov под номером NCT00060606. В его рамках с февраля 2003 по декабрь 2010 г. года проведено рандомизированное исследование на 158 пациентах с диагностированной антенатальной патологией плода в виде менингомиелоцеле: 80 родившимся детям произведены операции при данной патологии в постнатальном периоде, 78 – в пренатальном.

Открытая фетальная хирургия начиналась с выделения нервной плакоды от окружающей ткани. Идентифицировалась ТМО, которая отделялась от плакоды, а затем дефект ТМО устранялся непрерывным швом. Duragen использовался для пластики ТМО при недостатке материала. При невозможности закрытия кожи делали послабляющие разрезы или использовали AllodDerm.

Пренатальная хирургия приводила к улучшению совокупного показателя психического развития и двигательной функции через 30 мес. ($P = 0,007$), а также некоторых вторичных исходов и передвижения оперированного ребенка через 30 мес. Доля проперированных младенцев в возрасте 12 мес., у которых не было признаков спинно-мозговой грыжи, была выше в группе антенатальной хирургии (36 %), чем в группе постнатальной хирургии (4 %).

У детей в группе пренатальной хирургии был более высокий уровень восстановления функции нижних конечностей: на два или более уровня выше, чем ожидалось (32 % против 12 %; $P = 0,005$). Дети в группе с пренатальной хирургией имели больше шансов ходить без ортопедических приспособлений, чем из постнатальной группы (42 % против 21 %; $P = 0,01$).

Pedreira et al. [75] осуществили фазу I клинического исследования СЕСАМ при спинно-мозговых грыжах у плодов человека на уровне с L_1 по S_5 позвонков, где дефект ТМО покрывали без наложения швов БНЦ. При этом плакода освобождалась эндоскопическими ножницами круговым разрезом по переходной зоне. Кожу разрезали, чтобы подложить под нее БНЦ и провести ушивание. Для этого использовали БНЦ. На кожу накладывали единичные наводящие швы нитью 2.0 (нерассасывающийся полипропилен). Оценку неврологического статуса и МРТ-контроль проводили на 3, 6 и 12-й мес. после оперативного лечения.

В данной работе отмечено уменьшение числа рецидивов спинно-мозговой грыжи и постнатального моторного дефицита. У 86 % пациентов после эндоскопического оперативного лечения ни в одном случае не было повторного возникновения спинно-мозговой грыжи и ликвореи. Двигательные функции больных в этом исследовании были такими же или лучше у 85 % (6 из 7) оперированных, по сравнению с постнатальной хирургией исследования MOMS (67 % случаев пролеченных внутри-

тробно, 46 % в группе постнатальной хирургии).

Исследование Pedreira et al. [75] показало, что антенатальное хирургическое лечение спинно-мозговых грыж может проводиться через кожный эндоскопический доступ с использованием трансплантата из БНЦ и однослойного ушивания кожи. Авторы считают, что хирургическая техника и БНЦ может привести к герметичному закрытию ТМО, исключить рецидив грыжи и улучшить моторные функции пациента.

Особое внимание заслуживает проспективное, рандомизированное, двойное слепое контролируемое клиническое исследование, проведенное по пластике дефектов ТМО, зарегистрированное на сайте ClinicalTrials.gov под номером NCT00859508. В исследование входили 99 пациентов. У 62 из них во время операции использовали БНЦ, у 37 (контрольная группа) – 15 имплантатов Duraform из коллагена бычьих сухожилий, 8 дуральных регенеративных матрицосов DuraGen II из коллагена бычьих сухожилий, 10 дуральных графтовых матрицосов DuraGen из коллагена бычьих сухожилий, 2 дуральных регенеративных матрикса Durepair из коллагена фетальной бычьей кожи, 1 синтетический материал (дуральный заменитель Preclude) и 1 регенеративный матрикс из бычьего коллагена сухожилий DuraGen Plus. Исследования проводили с февраля 2006 по январь 2009 г. БНЦ использовали в виде изделия SyntheCel, зарегистрированного в США и одобренного FDA.

Интраоперационные данные не показали никаких существенных различий между пациентами с имплантированными БНЦ и пациентами из контрольной группы в отношении времени проведения операции, объема кровопотери и интраоперационных осложнений или продолжительности пребывания в стационаре ($P \geq 1,260$).

В работе показано, что в течение 6 мес. имплантат БНЦ не уступал имплантатам контрольной группы ($P = 0,206$). Инфекционный процесс

зоны оперативного вмешательства составлял 6,5 % в группе БНЦ и 5,4 % в контрольной группе ($P = 1,0000$). Ликворные свищи и псевдоменингецеле отсутствовали через 6 мес. у 96,6 % (57/59) пациентов с имплантированной БНЦ и 97,1 % (33/34) контрольной группы.

Заклучение

Наиболее важными свойствами БНЦ являются следующие:

- сверхтонкая структура сети, являющаяся эффектом высококристаллической ориентации протофибрилл целлюлозы;
- нерастворимость нативной БНЦ;
- высокая эластичность и прозрачность (после очистки) в результате нанотропности волокон;
- гидрофильные свойства, объясняемые наличием многочисленных пор;
- гидрогелеподобные свойства, так как, по меньшей мере, 95 % веса составляет вода, большая часть которой не связана с полимером и может быть выжата путем мягкого прессования;
- исключительная химическая чистота как следствие отсутствия каких-либо гемицеллюлоз, пектинов и лигнина, которые связаны с растительной целлюлозой;
- биосовместимость, обусловленная высокой чистотой материала и отсутствием токсического воздействия на живые ткани;
- необычно высокая прочность на растяжение, возникающая из ультратонкой структуры сети и отображаемая в высоких значениях модуля Юнга.

Имплантаты из БНЦ, способные выполнять функцию межклеточного матрикса, создавая условия для циркуляции метаболитов и кислорода и одновременно препятствуя достижению избыточной концентрации клеток, могут быть активно использованы в различных областях медицины.

Из проведенного анализа следует, что БНЦ необходима для пластики ТМО. Существующие на сегодня доклинические и клинические исследова-

ния подтверждают перспективность изучения БНЦ в нейрохирургии в качестве имплантатов для закрытия дефектов ТМО при патологии спинного мозга и его облочек. Дальнейшие исследования в этой области будут способствовать улучшению понимания в вопросе о пластике ТМО, а также помогут получить

и изучить композитные материалы на основе БНЦ, оценить их использование, что позволит выбирать материалы при различных ситуациях (гиперпродукции ликвора, больших дефектах ТМО, инфекционных осложнениях и т.д.), которые повысят эффективность пластики ТМО и снизят количество осложнений.

Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Зозуля Ю.А., Слынько Е.И., Шамаев М.И., Чеботарева Л.Л., Чепкий Л.П. Опухоли спинного мозга и позвоночника / Под ред. Ю.А. Зозули. Киев, 2010. [Zozulya YuA, Slynko EI, Shamaev MI, Chebotareva LL, Chepkiy LP. Tumors of the Spinal Cord and Spine. Ed. by Yu.A. Zozulya. Kiev, 2010. In Russian].
2. Кушель Ю.В. Интрамедуллярные опухоли спинного мозга. Часть I (эпидемиология, диагностика, принципы лечения) // Нейрохирургия. 2008. № 3. С. 9–17. [Kushel YuV. Intramedullary spinal cord neoplasms (epidemiology, diagnosis and therapeutic approaches). Neyrohirurgiya. 2008;(3):9–17. In Russian].
3. Itzkovich M, Gelernter I, Biering-Sorensen F, Weeks C, Laramée MT, Craven BC, Tonack M, Hitzig SL, Glaser E, Zeilig G, Aito S, Scivoletto G, Mecci M, Chadwick RJ, El Masry WS, Osman A, Glass CA, Silva P, Soni BM, Gardner BP, Savic G, Bergstrom EM, Bluvshstein V, Ronen J, Catz A. The Spinal Cord Independence Measure (SCIM) version III: reliability and validity in a multi-center international study. Disabil Rehabil. 2007;29:1926–1933. DOI: 10.1080/09638280601046302.
4. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan J. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007–2011. Neuro Oncol. 2014;16 Suppl 4:iv1–iv63. DOI: 10.1093/neuonc/nou223.
5. Helseth A, Mork SJ. Primary intraspinal neoplasms in Norway, 1955 to 1986. A population-based survey of 467 patients. J Neurosurg. 1989;71:842–845. DOI: 10.3171/jns.1989.71.6.0842.
6. Ступак В.В., Пендюрин И.В., Мишинов С.В., Васильев И.А. Осложнения хирургического удаления опухолей спинного мозга // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2016. № 7. С. 210–216. [Stupak VV, Pendyurin IV, Mishinov SV, Vasilyev IA. Complications of surgical removal of spinal cord tumors. International Journal of Applied and Fundamental Research. 2016;(7):210–216. In Russian].
7. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Notes from the field: investigation of a cluster of neural tube defects – central Washington, 2010–2013. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2013;62:728.
8. Orioli IM, Lima do Nascimento R, Lopez-Camelo JS, Castilla EE. Effects of folic acid fortification on spina bifida prevalence in Brazil. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 2011;91:183–835. DOI: 10.1002/bdra.20830.
9. Brown AJ. On an acetic ferment which forms cellulose. J Chem Soc Trans. 1886;49:432–439. DOI: 10.1039/CT8864900432.
10. Yamada Y, Yukphan P, Lan Vu HT, Muramatsu Y, Ochaikul D, Tanasupawat S, Nakagawa Y. Description of Komagataibacter gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae). J Gen Appl Microbiol. 2012;58:397–404. DOI: 10.2323/jgam.58.397.
11. Williams WS, Cannon RE. Alternative environmental roles for cellulose produced by Acetobacter xylinum. Appl Environ Microbiol. 1989;55:2448–2452.
12. Watanabe K, Tabuchi M, Morinaga Y, Yoshinaga F. Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. Cellulose. 1998;5:187–200. DOI: 10.1023/A:1009272904582.
13. Hu Y, Catchmark JM. Formation and characterization of spherelike bacterial cellulose particles produced by Acetobacter xylinum JCM 9730 strain. Biomacromolecules. 2010;11:1727–1734. DOI: 10.1021/bm100060v.
14. Ruka DR, Simon G, Dean KM. Altering the growth conditions of Gluconacetobacter xylinus to maximize the yield of bacterial cellulose. Carbohydr Polym. 2012;89:613–622. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.03.059.
15. Castro C, Zuluaga R, Alvarez C, Putaux JL, Caro G, Rojas OJ, Mondragon I, Ganán P. Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of Gluconacetobacter genus. J Carbohydr Polym. 2012;89:1033–1037. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.03.045.
16. Gromet Z, Schramm M, Hestrin S. Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum. 4. Enzyme systems present in a crude extract of glucose-grown cells. Biochem J. 1957;67:679–689. DOI: 10.1042/bj0670679.
17. Mikkelsen D, Flanagan BM, Dykes GA, Gidley MJ. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by Gluconacetobacter xylinus strain ATCC 53524. J Appl Microbiol. 2009;107:576–583. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04226.x.
18. Keshk S, Sameshima K. Influence of lignosulfonate on crystal structure and productivity of bacterial cellulose in a static culture. Enzyme Microb Technol. 2006;40:4–8. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2006.07.037.
19. Hwang JW, Yang YK, Hwang JK, Pyun YR, Kim YS. Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by Acetobacter xylinum BRC5 in agitated culture. J Biosci Bioeng. 1999;88:183–188. DOI: 10.1016/S1389-1723(99)80199-6.
20. Tantratian S, Tammurate P, Krusong W, Bhattarakosol P, Phunsi A. Effect of dissolved oxygen on cellulose production by Acetobacter sp. J Sci Res Chula Univ. 2005;30:179–186.
21. Mohammadkazemi F, Doosthoseini K, Azin M. Effect of ethanol and medium on bacterial cellulose (BC) production by Gluconacetobacter xylinus (PTCC 1734). Cellul Chem Technol. 2015;49:455–462.
22. El-Saied H, Basta AH, Gobran RH. Research progress in friendly environmental technology for the production of cellulose products (bacterial cellulose and its application). Polym Plast Technol Eng. 2004;43:797–820. DOI: 10.1081/PPT-120038065.
23. Lee KY, Buldum G, Mantalaris A, Bismarck A. More than meets the eye in BC: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. Macromol Biosci. 2014;14:10–32. DOI: 10.1002/mabi.201300298.
24. Brown MR, Saxena IM. Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers. Plant Physiol Biochem. 2000;38:57–67. DOI: 10.1016/S0981-9428(00)00168-6.
25. Ross P, Mayer R, Benziman M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. Microbiol Rev. 1991;55:35–58.

26. **Benziman M, Haigler CH, Brown RM, White AR, Cooper KM.** Cellulose biogenesis: polymerization and crystallization are coupled processes in *Acetobacter xylinum*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1980;77:6678–6682. DOI: 10.1073/pnas.77.11.6678.
27. **Brown RM Jr.** The Biosynthesis of cellulose. *J Macromol Sci A Pure Appl Chem.* 1996;33:1345–1373. DOI: 10.1080/10601329608014912.
28. **Jonas R, Farah LF.** Production and application of microbial cellulose. *Polym Degradation Stab.* 1998;59:101–106. DOI: 10.1016/S0141-3910(97)00197-3.
29. **Krassig H, Schurz J, Steadman RG, Schliefer K, Albrecht W, Mohring M, Schlosser H.** Cellulose. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004. DOI: 10.1002/14356007.a05_375.pub2.
30. **Klemm D, Schumann D, Udhardt U, Marsch S.** Bacterial synthesized cellulose – artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in polymer science.* 2001;26:1561–1603. DOI: 10.1016/S0079-6700(01)00021-1.
31. **Yamanaka S, Watanabe K, Kitamura N, Iguchi M, Mitsuhashi S, Nishi Y, Uryu M.** The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. *J Mater Sci.* 1989;24:3141–3145. DOI: 10.1007/BF01139032.
32. **Haigler CH.** The functions and biogenesis of native cellulose. In: *Nevell R.P., Zerovian S.H. (eds). Cellulose Chemistry and Its Applications.* Horwood, Chichester. 1985:31–83.
33. **Iguchi M, Yamanaka S, Budhiono A.** Bacterial cellulose – a masterpiece of nature's arts. *J Mater Sci.* 2000;35:261–270. DOI: 10.1023/A:1004775229149.
34. **Grande CJ, Torres FG, Gomez CM, Troncoso Heros OP, Canet-Ferrer J, Martinez-Pastor J.** Morphological characterisation of bacterial Cellulose-Starch nanocomposites. *Polym Compos.* 2008;16:181–185. DOI: 10.1177/096739110801600302.
35. **Favi PM, Benson RS, Neilsen NR, Hammonds RL, Bates CC, Stephens CP, Dhar MS.** Cell proliferation, viability, and in vitro differentiation of equine mesenchymal stem cells seeded on bacterial cellulose hydrogel scaffolds. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;33:1935–1944. DOI: 10.1016/j.msec.2012.12.100.
36. **Uraki Y, Nemoto J, Otsuka H, Tamai Y.** Honeycomb-like architecture produced by living bacteria, *Glucanacetobacter xylinus*. *J Carbohydr Polym.* 2007;69:1–6. DOI: 10.1016/j.carbpol.2006.08.021.
37. **Klemm D, Ahrem H, Kramer F, Fried W, Wippermann J, Kinne RW.** Bacterial nanocellulose hydrogels designed as bioartificial medical implants. In: *Gama M, Gatenholm P, Klemm D, eds. Bacterial Nanocellulose: A Sophisticated Multifunctional Material.* Boca Raton, CRC Press, 2012;175–196.
38. **Tang W, Jia S, Jia Y, Yang H.** The influence of fermentation conditions and post-treatment methods on porosity of bacterial cellulose membrane. *World J Microbiol Biotechnol.* 2010;26:125–131. DOI: 10.1007/s11274-009-0151-y.
39. **Klemm D, Kramer F, Moritz S, Lindstroem T, Ankerfors M, Gray D, Dorris A.** Nanocelluloses: a new family of nature-based materials. *Angewandte Chemie International Edition.* 2011;50:5438–5466. DOI: 10.1002/anie.201001273.
40. **Festucci-Buselli RA, Otoni WC, Joshi CP.** Structure, organization and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Braz J Plant Physiol.* 2007;19(1):1–13. DOI: 10.1590/S1677-04202007000100001.
41. **Sugiyama J, Vuong R, Chanzy H.** Electron diffraction study on the two crystalline phases occurring in native cellulose from an algal cell wall. *Macromolecules.* 1991;24:4168–4175. DOI: 10.1021/ma00014a033.
42. **Martson M, Viljanto J, Hurme T, Laippala P, Saukko P.** Is cellulose sponge degradable or stable as implantation material? An in vivo subcutaneous study in the rat. *Biomaterials.* 1999;20:1989–1995. DOI: 10.1016/S0142-9612(99)00094-0.
43. **Beguín P.** Molecular biology of cellulose degradation. *Annu Rev Microbiol.* 1990;44:219–248. DOI: 10.1146/annurev.mi.44.100190.001251.
44. **Miyamoto T, Takahashi S, Ito H, Inagaki H, Noishiki Y.** Tissue biocompatibility of cellulose and its derivatives. *J Biomed Mater Res.* 1989;23:125–133. DOI: 10.1002/jbm.820230110.
45. **Mendes PN, Rahal SC, Pereira-Junior OC, Fabris VE, Lenharo SL, de Lima-Neto JF, da Cruz Landim-Alvarenga F.** In vivo and in vitro evaluation of an acetobacter xylinum synthesized microbial cellulose membrane intended for guided tissue repair. *Acta Vet Scand.* 2009;51:12. DOI: 10.1186/1751-0147-51-12.
46. **Li J, Wan Y, Li L, Liang H.** Preparation and characterization of 2,3-dialdehyde bacterial cellulose for potential biodegradable tissue engineering scaffolds. *Materials Science and Engineering: C.* 2009;29:1635–1642. DOI: 10.1016/j.msec.2009.01.006.
47. **Barud HS, Ribeiro CA, Crespi MS, Martines MA, Dexpert-Ghys J, Marques RFC, Mes-saddeq Y, Ribeiro SJL.** Thermal characterization of bacterial cellulose-phosphate composite membranes. *J Therm Anal Calorim.* 2007;87:815–818. DOI: 10.1007/s10973-006-8170-5.
48. **Petersen N, Gatenholm P.** Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;91:1277–1286. DOI: 10.1007/s00253-011-3432-y.
49. **Bodin A, Bharadwaj S, Wu S, Gatenholm P, Atala A, Zhang Y.** Tissue-engineered conduit using urine-derived stem cell seeded bacterial cellulose polymer in urinary reconstruction and diversion. *Biomaterials.* 2010;31:8889–8901. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.108.
50. **Svensson A, Nicklasson E, Harrah T, Panilaitis B, Kaplan DL, Brittberg M, Gatenholm P.** Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials.* 2005;26:419–431. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.02.049.
51. **Zahedmanesh H, Mackle JN, Sellborn A, Drott K, Bodin A, Gatenholm P, Lally C.** Bacterial cellulose as a potential vascular graft: Mechanical characterization and constitutive model development. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2011;97:105–113. DOI: 10.1002/jbm.b.31791.
52. **Andersson J, Stenhamre H, Backdahl H, Gatenholm P.** Behavior of human chondrocytes in engineered porous bacterial cellulose scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 2010;94:1124–1132. DOI: 10.1002/jbm.a.32784.
53. **Kim J, Cai Z, Lee HS, Choi GS, Lee DH, Jo C.** Preparation and characterization of a bacterial cellulose/chitosan composite for potential biomedical application. *J Polym Res.* 2011;18:739–744. DOI: 10.1007/s10965-010-9470-9.
54. **Gao C, Wan Y, Yang C, Dai K, Tang T, Luo H, Wang J.** Preparation and characterization of bacterial cellulose sponge with hierarchical pore structure as tissue engineering scaffold. *J Porous Mater.* 2011;18:139–145. DOI: 10.1007/s10934-010-9364-6.
55. **Souza CM, Mesquita LA, Souza D, Irioda AC, Francisco JC, Souza CF, Guarita-Souza LC, Sierakowski MR, Carvalho KA.** Regeneration of skin tissue promoted by mesenchymal stem cells seeded in nanostructured membrane. *Transplant Proc.* 2014;46:1882–1886. DOI: 10.1016/j.transproceed.2014.05.066.
56. **Krontiras P, Gatenholm P, Hagg D.** Adipogenic differentiation of stem cells in three-dimensional porous bacterial nanocellulose scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2015;103:195–203. DOI: 10.1002/jbm.b.33198.
57. **Chu P, Chen J, Wang L, Huang L.** Plasma-surface modification of biomaterials. *Materials Science and Engineering: R: Reports.* 2002;36:143–206. DOI: 10.1016/S0927-796X(02)00004-9.
58. **Pertile RAN, Andrade FK, Alves C, Gama M.** Surface modification of bacterial cellulose by nitrogen-containing plasma for improved interaction with cells. *Carbohydr Polym.* 2010;82:692–698. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.05.037.
59. **Pertile R, Moreira S, Andrade F, Domingues L, Gama M.** Bacterial cellulose modified using recombinant proteins to improve neuronal and mesenchymal cell adhesion. *Biotechnol Prog.* 2012;28:526–532. DOI: 10.1002/btpr.1501.
60. **Andrade FK, Moreira SM, Domingues L, Gama FM.** Improving the affinity of fibroblasts for bacterial cellulose using carbohydrate-binding modules fused to RGD. *J Biomed Mater Res A.* 2010;92:9–17. DOI: 10.1002/jbm.a.32284.
61. **Mormino R, Bungay H.** Composites of bacterial cellulose and paper made with a rotating disk bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003;62:503–506. DOI: 10.1007/s00253-003-1377-5.

62. **Backdahl H, Esguerra M, Delbro D, Risberg B, Gatenholm P.** Engineering microporosity in bacterial cellulose scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med.* 2008;2:320–330. DOI: 10.1002/term.97.
63. **Mello LR, Feltrin LT, Fontes Neto PT, Ferraz FA.** Duraplasty with biosynthetic cellulose: an experimental study. *J Neurosurg.* 1997;86:143–150. DOI: 10.3171/jns.1997.86.1.0143.
64. **Xu C, Ma X, Chen S, Tao M, Yuan L, Jing Y.** Bacterial cellulose membranes used as artificial substitutes for dural deflection in rabbits. *Int J Mol Sci.* 2014;15:10855–10867. DOI: 10.3390/ijms150610855.
65. **Lima F, Pinto FC, Andrade-da-Costa BL, Silva JG, Campos Jnior O, Aguiar JL.** Biocompatible bacterial cellulose membrane in dural defect repair of rat. *J Mater Sci Mater Med.* 2017;28:37. DOI: 10.1007/s10856-016-5828-9.
66. **Sanchez e Oliveira Rde C, Valente PR, Abou-Jamra RC, Araujo A, Saldiva PH, Pedreira DA.** Biosynthetic cellulose induces the formation of a neoduramater following pre-natal correction of meningocele in fetal sheep. *Acta Cir Bras.* 2007;22:174–181. DOI: 10.1590/S0102-86502007000300004.
67. **Pedreira DA, Valente PR, Abou-Jamra RC, Pelarigo CL, Silva LM, Goldenberg S.** A different technique to create a “myelomeningocele-like” defect in the fetal rabbit. *Fetal Diagn Ther.* 2002;17:372–376. DOI: 10.1159/000065388.
68. **Pedreira DA, Valente PR, Abou-Jamra RC, Pelarigo CL, Silva LM, Goldenberg S.** Successful fetal surgery for the repair of a “myelomeningocele-like” defect created in the fetal rabbit. *Fetal Diagn Ther.* 2003;18:201–206. DOI: 10.1159/000069378.
69. **Pedreira DA, Sanchez e Oliveira Rde C, Valente PR, Abou-Jamra RC, Araujo A, Saldiva PH.** Validation of the ovine fetus as an experimental model for the human myelomeningocele defect. *Acta Cir Bras.* 2007;22:168–173. DOI: 10.1590/S0102-86502007000300003.
70. **Pedreira DA, Oliveira RC, Valente PR, Abou-Jamra RC, Araujo A, Saldiva PH.** Gasless fetoscopy: a new approach to endoscopic closure of a lumbar skin defect in fetal sheep. *Fetal Diagn Ther.* 2008;23:293–298. DOI: 10.1159/000123616.
71. **Pedreira DA, Quintero RA, Acacio GL, Caldini ET, Saldiva PH.** Neoskin development in the fetus with the use of a three-layer graft: an animal model for in utero closure of large skin defects. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011;24:1243–1248. DOI: 10.3109/14767058.2011.564486.
72. **Abou-Jamra RC, Valente PR, Araujo A, Sanchez e Oliveira Rde C, Saldiva PH, Pedreira DA.** Simplified correction of a meningocele-like defect in the ovine fetus. *Acta Cir Bras.* 2009;24:239–244. DOI: 10.1590/S0102-86502009000300014.
73. **Herrera SR, Leme RJ, Valente PR, Caldini EG, Saldiva PH, Pedreira DA.** Comparison between two surgical techniques for prenatal correction of meningocele in sheep. *Einstein (Sao Paulo).* 2012;10:455–461. DOI: 10.1590/S1679-45082012000400011.
74. **Adzick NS, Thom EA, Spang CY, Brock JW 3rd, Burrows PK, Johnson MP, Howell LJ, Farrell JA, Dabrowiak ME, Sutton LN, Gupta N, Tulipan NB, D'Alton ME, Farmer DL.** A randomized trial of prenatal versus postnatal repair of myelomeningocele. *N Engl J Med.* 2011;364:993–1004. DOI: 10.1056/NEJMoa1014379.
75. **Pedreira DA, Zanon N, Nishikuni K, Moreira de Sa RA, Acacio GL, Chmait RH, Kontopoulos EV, Quintero RA.** Endoscopic surgery for the antenatal treatment of myelomeningocele: the CECAM trial. *Am J Obstet Gynecol.* 2016;214:111.e11–111.e11. DOI: 10.1016/j.ajog.2015.09.065.
76. **Rosen CL, Steinberg GK, DeMonte F, Delashaw JB Jr, Lewis SB, Shaffrey ME, Aziz K, Hantel J, Marciano FF.** Results of the prospective, randomized, multicenter clinical trial evaluating a biosynthesized cellulose graft for repair of dural defects. *Neurosurgery.* 2011;69:1093–1104. DOI: 10.1227/NEU.0b013e3182284aca.

Адрес для переписки:

Харченко Алексей Валерьевич
630091, Россия, Новосибирск, ул. Фрунзе, 17,
Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии
им. Я.Л. Цивьяна,
alexdok2000@gmail.com

Address correspondence to:

Kharchenko Alexey Valerjevich
Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics
n.a. Ya.L. Tsivyan,
Frunze str., 17, Novosibirsk 630091, Russia,
alexdok2000@gmail.com

Статья поступила в редакцию 27.02.2019

Рецензирование пройдено 03.06.2019

Подписано в печать 10.06.2019

Received 27.02.2019

Review completed 03.06.2019

Passed for printing 10.06.2019

Алексей Валерьевич Харченко, врач-нейрохирург, аспирант нейрохирургического отделения № 1, Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна, Россия, 630091, Новосибирск, ул. Фрунзе, 17, ORCID: 0000-0001-7931-5811, alexdok2000@gmail.com;

Вячеслав Владимирович Ступак, д-р мед. наук, проф., начальник научно-исследовательского отделения нейрохирургии, Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна, Россия, 630091, Новосибирск, ул. Фрунзе, 17, ORCID: 0000-0003-3222-4837, VStupak@niito.ru.

Alexey Valerjevich Kharchenko, neurosurgeon, postgraduate student, Neurosurgical Department No. 1, Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n.a. Ya.L. Tsivyan, Frunze str., 17, Novosibirsk, 630091, Russia, ORCID: 0000-0001-7931-5811, alexdok2000@gmail.com;
Vyacheslav Vladimirovich Stupak, DMSc, Prof., Head of the Research Department of Neurosurgery, Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n.a. Ya.L. Tsivyan, Frunze str., 17, Novosibirsk, 630091, Russia, ORCID: 0000-0003-3222-4837, VStupak@niito.ru.