

НОВЫЙ БИОСОВМЕСТИМЫЙ МАТЕРИАЛ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО ТВЕРДОФАЗНЫМ МЕТОДОМ ХИТОЗАНА ДЛЯ ЛАЗЕРНОЙ СТЕРЕОЛИТОГРАФИИ

УДК 546.824.31:629.74.04

Поступила 21.05.2015 г.



П.С. Тимашев, к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории сверхкритических флюидных технологий¹;
К.Н. Бардакова, научный сотрудник лаборатории лазерной химии и биологии¹;
Т.С. Демина, к.х.н., научный сотрудник лаборатории твердофазных химических реакций²;
Г.И. Пудовкина, научный сотрудник лаборатории лазерной химии и биологии¹;
М.М. Новиков, зав. лабораторией лазерного синтеза объемных изделий³;
М.А. Марков, научный сотрудник лаборатории лазерного синтеза объемных изделий³;
Д.С. Асютин, к.м.н., научный сотрудник отделения спинальной нейрохирургии⁴;
Л.Ф. Пименова, ординатор отделения спинальной нейрохирургии⁴;
Е.А. Свидченко, научный сотрудник лаборатории твердофазных химических реакций²;
А.М. Ермаков, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории энергетики биологических систем⁵;
И.И. Селезнева, к.ф.-м.н., и.о. зав. лабораторией роста клеток и тканей⁵;
В.К. Попов, д.ф.-м.н., зав. лабораторией сверхкритических флюидных технологий¹;
Н.А. Коновалов, д.м.н., профессор, зав. отделением спинальной нейрохирургии⁴;
Т.А. Аколова, д.х.н., ведущий научный сотрудник лаборатории твердофазных химических реакций²;
А.Б. Соловьева, д.х.н., зав. лабораторией модифицированных полимерных систем⁶;
В.Я. Панченко, д.ф.-м.н., профессор, академик РАН, директор³;
В.Н. Баграташвили, д.ф.-м.н., профессор, руководитель отдела лазерной атомно-молекулярной технологии¹

¹Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, Отделение перспективных лазерных технологий, Москва, Троицк, 192148, ул. Пионерская, 2;

²Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва, 117393, ул. Профсоюзная, 70;

³Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, Шатура, Московская область, 140700, ул. Святоозерская, 1;

⁴НИИ нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко, Москва, 125047, ул. 4-я Тверская-Ямская, 16;

⁵Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московская область, 142290, ул. Институтская, 3;

⁶Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, 119991, ул. Косыгина, 4

Цель исследования — разработка нового биodeградируемого материала на основе хитозана, синтезированного твердофазным способом, а также создание на его основе трехмерных биосовместимых матриц-носителей клеток методом лазерной стереолитографии.

Материалы и методы. Реакционно-способные системы создавали на основе хитозана с привитыми твердофазным методом аллильными группами, полиэтиленгликоля диакрилата и фотоинициатора Irgacure 2959. Структуры получали на установке лазерной стереолитографии ЛС-120 (ИПЛИТ РАН, Россия).

Результаты. Установлено, что частичное замещение аминогрупп хитозана аллильными группами (ХТ-А) и введение в качестве сшивающего агента полиэтиленгликоля диакрилата (ПЭГ-ДА) не снижает биосовместимости материала. Определение метаболической активности клеток линии NCTC L929 с использованием МТТ-теста показало, что исследуемые образцы материалов на основе ХТ-А и ХТ-А со сшивающим агентом ПЭГ-ДА не содержат токсичных для клеток млекопитающих водорастворимых компонентов. Они являются биосовместимыми, поддерживают адгезию, расплывание и пролиферативную активность мезенхимальных стволовых клеток человека, но имеют существенные различия в степени и характере активации экспрессии генов-маркеров дифференцировки по остеогенному пути.

Ключевые слова: твердофазный синтез; лазерная стереолитография; хитозан; трехмерные матрицы; биосовместимые материалы; цитотоксичность; мезенхимальные стволовые клетки человека.

Для контактов: Тимашев Петр Сергеевич, e-mail: timashev.peter@gmail.com

Novel Biocompatible Material Based on Solid-State Modified Chitosan for Laser Stereolithography

P.S. Timashev, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Supercritical Fluid Technologies¹;
K.N. Bardakova, Researcher, Laboratory for Laser Chemistry and Biology¹;
T.S. Demina, PhD, Researcher, Laboratory of Solid-State Chemical Reactions²;
G.I. Pudovkina, Researcher, Laboratory for Laser Chemistry and Biology¹;
M.M. Novikov, Head of Laboratory of Laser Synthesis of 3D Products³;
M.A. Markov, Researcher, Laboratory of Laser Synthesis of 3D Products³;
D.S. Asyutin, MD, PhD, Researcher, Spinal Neurosurgery Department⁴;
L.F. Pimenova, Resident Physician, Spinal Neurosurgery Department⁴;
E.A. Svidchenko, Researcher, Laboratory of Solid-State Chemical Reactions²;
A.M. Ermakov, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Biological Systems Energetics⁵;
I.I. Selezneva, PhD, Acting Head of Cell and Tissue Growth Laboratory⁵;
V.K. Popov, DSc, Head of Laboratory of Supercritical Fluid Technologies¹;
N.A. Konovalov, MD, DSc, Professor, Head of Spinal Neurosurgery Department⁴;
T.A. Akopova, DSc, Leading Researcher, Laboratory of Solid-State Chemical Reactions²;
A.B. Solovieva, DSc, Head of Laboratory for Modified Polymer Systems⁶;
V.Ya. Panchenko, DSc, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director³;
V.N. Bagratashvili, DSc, Professor, Head of Laser Atomic and Molecular Technologies Department¹

¹Institute on Laser and Information Technologies, Department of Advanced Laser Technologies, Russian Academy of Sciences, 2 Pionerskaya St., Moscow, Troitsk, 192148, Russian Federation;

²Enikolopov Institute of Synthetic Polymeric Materials, 70 Profsoyuznaya St., Moscow, 117393, Russian Federation;

³Institute on Laser and Information Technologies, Russian Academy of Sciences, 1 Svyatoozerskaya St., Shatura, Moscow region, 140700, Russian Federation;

⁴Academician N.N. Burdenko Research Institute of Neurosurgery, 16, 4th Tverskaya-Yamskaya St., Moscow, 125047, Russian Federation;

⁵Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, 3 Institutskaya St., Pushchino, Moscow region, 142290, Russian Federation;

⁶Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, 4 Kosygina St., Moscow, 119991, Russian Federation

The aim of the investigation was to develop a novel biodegradable material based on chitosan synthesized by solid-state technology, and to create based on biocompatible three dimensional cell-carrying scaffolds using laser stereolithography.

Materials and Methods. Reactive systems were developed based on chitosan grafted with allyl, polyethylene glycol diacrylate, and the photoinitiator Irgacure 2959. The structures were obtained using laser stereolithography setting LS-120 (Institute on Laser and Information Technologies, Russian Academy of Sciences, Russia).

Results. Partial replacement of chitosan amino groups by allyl groups (CT-A) and the introduction of polyethylene glycol diacrylate (PEG-DA) as a crosslinking agent were found not to reduce the material biocompatibility. The metabolic activity determination of NCTC L929 cells using MTT assay showed that the samples under study to contain none water-soluble components toxic to mammalian cells. The samples based on CT-A and CT-A with a crosslinking agent PEG-DA are biocompatible and are able to support adhesion, spreading and proliferative activity of human mesenchymal stromal cells, but have significant differences in the extent and nature of the expression activation of gene markers for osteogenic differentiation path.

Key words: solid-state synthesis; laser stereolithography; chitosan; three-dimensional matrices; biocompatible materials; cytotoxicity; human mesenchymal stromal cells.

В последние годы активно развиваются исследования и разработки в области биомедицинского материаловедения, направленные на решение задач регенеративной медицины. Их актуальность, по данным статистики ВОЗ, обусловлена ростом числа травм и повреждений, чья терапия связана с использованием замещающих имплантатов. Известно, что восстановление нормальных функций живой системы посредством

стимулирования роста ткани значительно эффективнее подходов, связанных с применением замещающих структур (протезирование и др.) [1]. Для формирования трехмерных структур, содержащих биоактивные компоненты, используют несколько различных методов, в том числе метод трехмерной печати [2] и метод селективного лазерного спекания [3]. Весьма перспективным для этих целей является метод лазерной стереолито-

графии, основанный на иницировании локальных пространственных сшивок между реакционно-способными звеньями макромолекул под действием лазерного излучения в УФ-области спектра. Этот метод позволяет создавать структуры заданной архитектоники на базе трехмерной компьютерной модели, которая может быть разработана с использованием как специального программного обеспечения, так и данных, полученных методами анализа пространственной структуры объекта *in vivo* (например, МРТ-данных дефектов тканей при создании соответствующих полимерных имплантатов) [4]. Методом лазерной стереолитографии уже были получены разнообразные трехмерные матрицы-носители (скаффолды) на основе желатина [5], гиалуроновой кислоты [6], фибрина [7]. Для успешного применения указанного метода в регенеративной медицине необходима разработка широкой номенклатуры новых биосовместимых фотополимеризующихся композиций.

Цель исследования — разработка нового биодеградируемого материала на основе хитозана, синтезированного твердофазным способом, а также создание на его основе биосовместимых трехмерных матриц-носителей клеток методом лазерной стереолитографии.

Материалы и методы

Твердофазное модифицирование хитозана. Твердофазный синтез неопределенного простого эфира хитозана — аллилхитозана (ХТ-А) — осуществляли действием на хитозан бромистого аллила (99%; Sigma-Aldrich, Германия) в отсутствие жидкой дисперсионной среды в условиях сдвигового деформирования в двухшнековом экструдере BerstorffZE40 (Германия). Экструдер оснащен однонаправленно вращающимися силовыми элементами шнеков, которые обеспечивают сжатие и сдвиг материала в тонком слое. Химическое взаимодействие компонентов в состоянии вынужденного пластического течения в этих условиях приводит к образованию продуктов с высоким выходом [8]. В соответствии с работой [9] использовали хитозан, полученный методом твердофазного синтеза путем щелочного деацетилирования хитина панцирей краба («ВОСТОК-БОР», Россия). Содержание остаточных ацетамидных (хитиновых) звеньев в образце исходного хитозана составляло 10%, средняя степень полимеризации звеньев хитозана в макромолекуле была 360 ($M_w=60$ кДа). На одно звено хитозана брали 0,5 моля алкилирующего агента и проводили обработку реакционных смесей при температуре -5°C . Продукты промывали изопропанолом и сушили в вакуумном шкафу при 50°C для полного удаления непрореагировавшего мономера.

Приготовление фотоотверждаемой композиции. Для получения фоточувствительной композиции готовили 5% раствор ХТ-А в 4% уксусной кислоте. Нерастворимую фракцию (немодифицированный хитин с высокой степенью кристалличности) отделяли центрифугированием (40 мин, 14 500 об./мин), после чего раствор фильтровали через мембрану с размером пор 0,45 мкм. Далее 120 мл раствора помещали на

1 ч в испарительный бюкс (35°C ; 0,2 МПа) для удаления части растворителя, после чего вносили диакрилат полиэтиленгликоля (ПЭГ-ДА, Sigma-Aldrich, Германия) 15% мас. и перемешивали при комнатной температуре 30 мин. В полученный гидрогель вносили фотоинициатор Irgacure 2959, 1% мас. (BASF Kaisten AG, Германия). Перемешивание системы проводили при комнатной температуре в течение 2 ч до получения гомогенного раствора.

Подготовка образцов для клеточных испытаний. Приготовленную композицию наносили на поверхность покровных стекол диаметром 12 мм (площадь поверхности образцов — 1,13 см²). Покровные стекла перед нанесением гидрогеля промывали водой, помещали на 6 ч в 5% водный раствор соляной кислоты, затем в течение 20 мин отмывали в ультразвуковой бане дистиллированной водой. УФ-индуцированную сшивку гидрогелей производили в течение 120 мин при воздействии УФ-ртутной лампы ДРШ-100 (Россия). Были приготовлены материалы двух типов — чистый ХТ-А и ХТ-А со сшивающим агентом ПЭГ-ДА.

Клеточные испытания. Все образцы материалов перед проведением тестов стерилизовали 70% спиртом в течение 3 мин, после чего промывали стерильной культуральной средой DMEM/F-12 с добавлением 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Исследование биосовместимости в условиях *in vitro* проводили с использованием вытяжек и путем культивирования клеток на поверхности самих материалов.

Модельной средой для приготовления вытяжек являлась культуральная среда DMEM/F-12 с добавлением 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Вытяжки получали с соблюдением асептики в течение 3 сут при 37°C , на каждый материал делали три пробы. Соотношение площади поверхности материала и объема модельной среды составляло 1,13 см²/1 мл среды. Цитотоксическое действие растворимых примесей, содержащихся в вытяжках материалов, на фибробласты линии NCTC L929 оценивали с помощью МТТ-теста согласно описанной процедуре [10].

Для определения адгезионных характеристик материалов и их взаимодействия с субстратзависимыми клетками были использованы мезенхимальные стволовые клетки (МСК), выделенные из абортного аутопсийного материала плодов человека по методике, разработанной ранее [11]. Культивирование клеток проводили в среде DMEM/F-12 (1:1, Life technologies, США), содержащей также: 10% FBS (Fetal Bovine Serum, HyClone, США), 2 ммоль L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, раствор витаминов («ПанЭко», Россия) при 37°C в атмосфере 5% CO₂. По мере роста и достижения субконфлюэнтного состояния клетки обрабатывали 0,25% раствором трипсин-ЭДТА и производили их пересев (пассаж) в новые флаконы (клеточную массу одного флакона разделяли на два флакона). Для проведения исследований использовали клетки на 4-м пассаже.

Клетки высевали на поверхность исследуемых образцов с плотностью 50 тыс./см² и культивировали в те-

чение 7 и 23 дней. Оценку морфологии и жизнеспособности клеток проводили на микроскопе Axiovert 200 (Karl Zeiss, Германия) с использованием флуоресцентного окрашивания набором красителей L-7007 LIVE/DEAD Bac Light Bacterial Viability Kit (Invitrogen, США).

По завершении культивирования проводили подготовку образцов для исследования с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), для чего образцы промывали в 0,1 М фосфатно-солевом буфере (pH=7,4) и фиксировали 12 ч при температуре 5°C в 2,5% забуференном растворе глутарового альдегида. После фиксации образцы геля промывали фосфатным буферным раствором (PBS) и дегидратировали при 4°C последовательно в батарее водного раствора этанола возрастающей концентрации: 50, 75, 80, 90% и в абсолютном этаноле на заключительном этапе. На каждой стадии образцы дважды погружали на 5 мин в соответствующий раствор этилового спирта. Для удаления спирта образцы переносили на 30 мин в гексаметилдисилазан (HMDS), после чего высушивали на воздухе.

Методика проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Для выделения общей матричной РНК из клеток использовали набор «Выделение полноразмерной поли(А) мРНК на магнитных частицах» («Силекс», Москва). Полученную мРНК применяли для синтеза комплементарной ДНК с помощью набора «Синтез первой цепи кДНК (олиго(дТ)15)» («Силекс», Москва), а кДНК, полученную в результате реакции обратной транскрипции, — в качестве матрицы для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

Реакцию ПЦР выполняли на приборе ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, США) в присутствии интеркалирующего красителя SybrGreen и референсного красителя ROX. Исследовали экспрессию 22 генов-маркеров, отображающих процесс дифференцировки по остеогенному пути (см. таблицу). Маркерные гены были выбраны из базы данных для PCR Arrays QIAGEN (Германия) для определения остеогенеза (<http://www.sabiosciences.com>, «human osteogenesis PCR Array» PAHS-026Z), а также базы данных Gene Ontology (ID: 000164) [12, 13]. Праймеры для каждого маркерного гена подбирали с помощью программы PrimerEpress (Applied Biosystems, США).

Концентрация праймеров в реакциях по оптимизации составляла 0,05 пмоль/мкл, концентрация ионов Mg²⁺ — от 1,5 ммоль, концентрация фермента — 0,2 ед. на 20 мкл реакции. Длина праймеров составляла в среднем 24 нуклеотида. Температура отжига — 60°C, длина амплифицируемого фрагмента — 94–100 пар нуклеотидов. Для проверки специфичности реакции продукты амплификации проверяли электрофорезом в 2% агарозе, а также по кривым температурной диссоциации ампликонов.

Гены, использовавшиеся для оценки уровня дифференцировки по остеогенному типу

Символ	Описание	Номер в банке генов
BGLAP	Bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein	NM_199173
BMP1	Bone morphogenetic protein 1	NM_006129
BMPRI1A	Bone morphogenetic protein receptor, type IA	NM_004329
BMP7	Bone morphogenetic protein 7	NM_001719
FGF-2	Fibroblast growth factor 2 (basic)	NM_002006
FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1	NM_015850
IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	NM_000618
IGF2	Insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	NM_000612
EGFR	Epidermal growth factor receptor	NM_005228
IGFR1	Insulin-like growth factor 1 receptor	NM_000875
COL1A1	Collagen, type I, alpha 1	NM_000088
COL3A1	Collagen, type III, alpha 1	NM_000090
ALPL	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	NM_000478
SPP1	Secreted phosphoprotein 1	NM_000582
RUNX2	Runt-related transcription factor 2	NM_004348
SMAD2	SMAD family member 2	NM_005901
SMAD4	SMAD family member 4	NM_005359
SMAD5	SMAD family member 5	NM_005903
TWIST1	Twist homolog 1 (Drosophila)	NM_000474
VDR	Vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D3) receptor	NM_000376
TGFBR1	Transforming growth factor, beta receptor 1	NM_004612
TNF	Tumor necrosis factor	NM_000594
ACT	Actin, beta (house keeping)	NM_001101
RPLP0	Ribosomal protein, large, P0 (house keeping)	NM_001002
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_002046

Анализ данных, полученных с помощью ПЦР в режиме реального времени, производили по пороговой флуоресценции методом $\Delta\Delta C(T)$ с помощью web-ресурса для анализа данных PCR Arrays QIAGEN (<http://www.sabiosciences.com>).

В качестве референса использовали экспрессию генов актина (ACT), большой субъединицы рибосомального белка (RPLP0) и глицеальдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH).

Обработка данных. Статистическую обработку результатов клеточных испытаний и набухания проводили с помощью программы Origin, за ошибку принимали среднеквадратичное отклонение от среднего значения, за достоверные данные принимали различия по U-критерию Манна–Уитни при $p < 0,05$.

Лазерная стереолитография. Все образцы были изготовлены на экспериментальном макете лазерного стереолитографа ЛС-120 (ИПЛИТ РАН, Россия) с использованием HeCd-лазера (длина волны — 325 нм, мощность излучения — 15 мВт). Толщина слоя при выращивании образцов составляла 200 мкм. Скорость формирования слоя определяли исходя из мощности лазера и экспериментально установленными технологическими параметрами отверждения композиции:

$E_c=50$ мДж/см² (параметр, характеризующий пороговое значение экспозиционной дозы облучения для начала формирования твердой полимерной пленки) и $D_p=0,15$ мм (параметр, характеризующий критическую толщину пленки).

Определение характеристик набухания. Характеристики набухания трехмерных структур изучали в соответствии с разработанным алгоритмом. Полученные трехмерные структуры (без предварительной сушки) по описанной выше методике помещали на 2 ч в этиловый спирт (ректификат) или 25% водный раствор аммиака. После этого образцы помещали в дистиллированную воду или PBS, в которых их выдерживали в течение 9 дней. За это время происходило набухание скаффолда до максимального значения содержания воды. В процессе набухания растворитель меняли каждые 48 ч для моделирования поведения структур *in vivo*. Перед взвешиванием структуры на 10 мин помещали на нетканый материал для удаления излишней влаги. Процедуру повторяли для трех идентичных образцов до постоянного значения массы. Степень набухания (SWR) определяли по формуле:

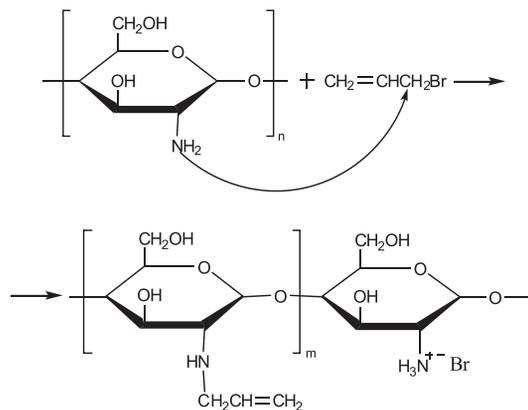
$$SWR (\%) = \frac{W_s - W_d}{W_d} \cdot 100,$$

где W_d — масса матрицы после проведения процесса лиофильной сушки; W_s — масса набухшей матрицы.

Набухание также измеряли в фосфатно-солевом буфере и дистиллированной воде без использования дополнительных растворителей.

Результаты и обсуждение

Синтез реакционно-способных полимерных систем на основе хитозана. Хитозан — катионный полисахарид, имеющий практически в каждом элементарном звене свободную первичную аминогруппу. Это определяет биологическую активность, а также делает его наиболее интересным объектом в ряду полисахаридов для проведения химического модифицирования. Для того чтобы повысить реакционную способность функциональных групп хитозана в процессах сшивания при воздействии лазерного излучения, в его структуру были введены непрелетельные группы путем взаимодействия с бромистым аллилом в условиях сдвиговых деформаций в экструдере. Твердофазный синтез, позволяющий проводить процессы химического модифицирования полимеров в отсутствие жидких дисперсионных сред, катализаторов и инициаторов процессов, был выбран как наиболее приемлемый метод для решения проблемы термодинамической несовместимости гидрофильного хитозана и гидрофобного модификатора. Аминогруппы хитозана намного реакционно-способнее его гидроксильных групп в некатализируемых реакциях нуклеофильного замещения, тогда как реакция в щелочной среде приводит к образованию смешанных O- и N-замещенных аллилпроизводных [14, 15]. В выбранных условиях проведения синтеза, по данным ядерно-магнитно-резонансной и ИК-Фурье спектроскопии, замещение происходит в основном по аминогруппам хитозана согласно приведенной ниже схеме:



Анализ спектра протонного магнитного резонанса образца аллилхитозана в растворе D₂O с добавлением 1% HCl (полученного на спектрометре Bruker Avance II 300, Германия) показал, что содержание звеньев с аллильными фрагментами составляет 8–10%. Химический сдвиг углерода аллильной метиленовой группы (при 53 м.д.) в ¹³C-¹H} APT (75,5 МГц) спектре образца свидетельствует о его связи с атомом азота и указывает на преимущественное N-алкилирование субстрата. При этом модифицированный гидрофобными ненасыщенными заместителями хитозан сохранил характерную для исходного полимера растворимость в кислых водных средах. Электронные спектры поглощения 1% растворов образцов исходного хитозана и аллилхитозана в 0,1 М HCl регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV 2501 PC (Япония) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см. Для полученных спектров было проведено математическое разделение полос, относящихся к поглощению и рэлеевскому рассеянию, а затем выполнено разложение спектров поглощения на отдельные полосы. Спектры поглощения аллилхитозана лежат в области 200–420 нм и содержат три интенсивные полосы с максимумами 264, 301 и 351 нм, соотношение высот которых составляет 0,3/1/0,1 (в спектре исходного хитозана присутствуют полосы 252, 299 и 346 нм с соотношением высот 1/1/0,4). Таким образом, в спектре продукта аллилирования преобладает компонент с максимумом 301 нм, причем его интенсивность увеличена в 2 раза по сравнению с исходным хитозаном, а интенсивность двух других полос значительно снижена. При разбавлении растворов хитозана и аллилхитозана форма спектров электронного поглощения не меняется, что свидетельствует об отсутствии агрегации в растворах обоих полимеров в диапазоне концентраций 0,125–1%.

Биосовместимость и биологическая активность композиции на основе хитозана. Исследование метаболической активности клеток линии NCTC L929 в присутствии вытяжек из материалов ХТ-А и ХТ-А с ПЭГ-ДА было проведено с использованием МТТ-теста, который основан на способности митохондриальных дегидрогеназ конвертировать водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразо-

Рис. 1. Метаболическая активность клеток линии NCTC L929 по результатам МТТ-теста при инкубации 48 ч с трехсуточными вытяжками из материалов: 1 — аллилхитозан; 2 — аллилхитозан + ПЭГ-ДА; 3 — на поверхности покровного стекла

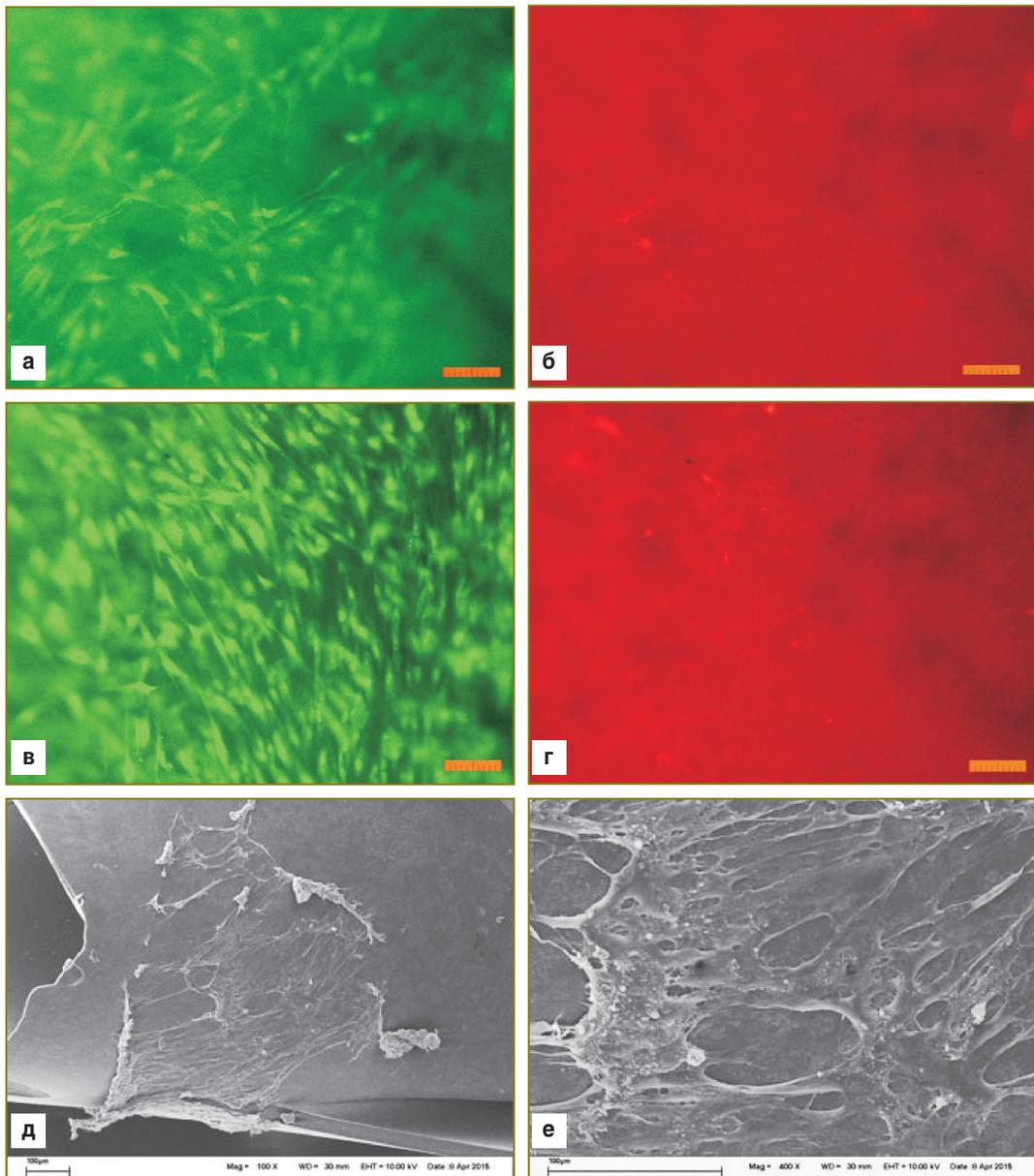
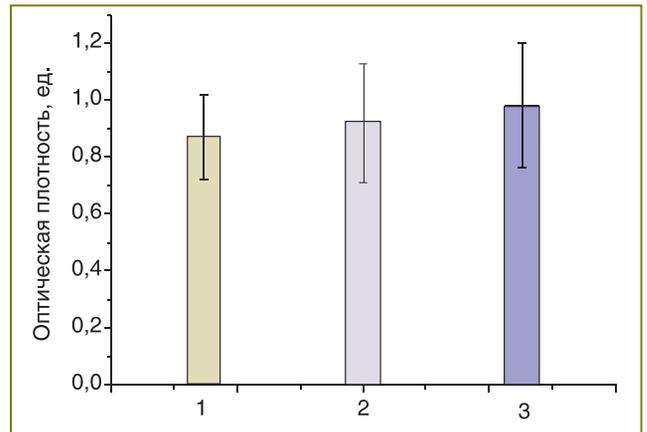


Рис. 2. Внешний вид мезенхимальных стволовых клеток человека при инкубации на поверхности аллилхитозана: 1-е сутки инкубации (а, б); 7-е сутки инкубации (в–е). Окраска клеток Syto 9 (а, в); окраска ядер мертвых клеток пропидий йодом (б, г); микрофотографии сканирующей электронной микроскопии (д, е)

лиум бромид (МТТ) в формазаин, количество которого определяется фотометрически по оптической плотности раствора при облучении источником света с длиной волны 540 нм. Исследование показало отсутствие значимых различий с контролем у трехсуточных вытяжек из образцов, что свидетельствует об отсутствии водорастворимых токсических компонентов в разработанных композициях (рис. 1).

Для определения адгезионных характеристик материалов и их взаимодействия с субстратзависимыми клетками были использованы МСК человека. Исследование морфологических особенностей и жизнеспособности МСК человека, культивируемых на поверх-

ности ХТ-А и ХТ-А с ПЭГ-ДА, показало, что клеточная гибель не превышает 1–2%. Клетки распластываются и пролиферируют на поверхности обоих исследуемых материалов. Морфология клеток не имеет существенных различий с контролем, однако плотность клеточного монослоя на покровном стекле на 7-е сутки значительно выше, чем на полимерных пленках (рис. 2–4). Для оценки влияния физико-химических характеристик материалов на дифференцировочную активность МСК человека был определен фенотипический профиль клеток на разных этапах культивирования. Поскольку для отображения процесса дифференцировки по остеогенному пути обычно используют анализ 22 основных

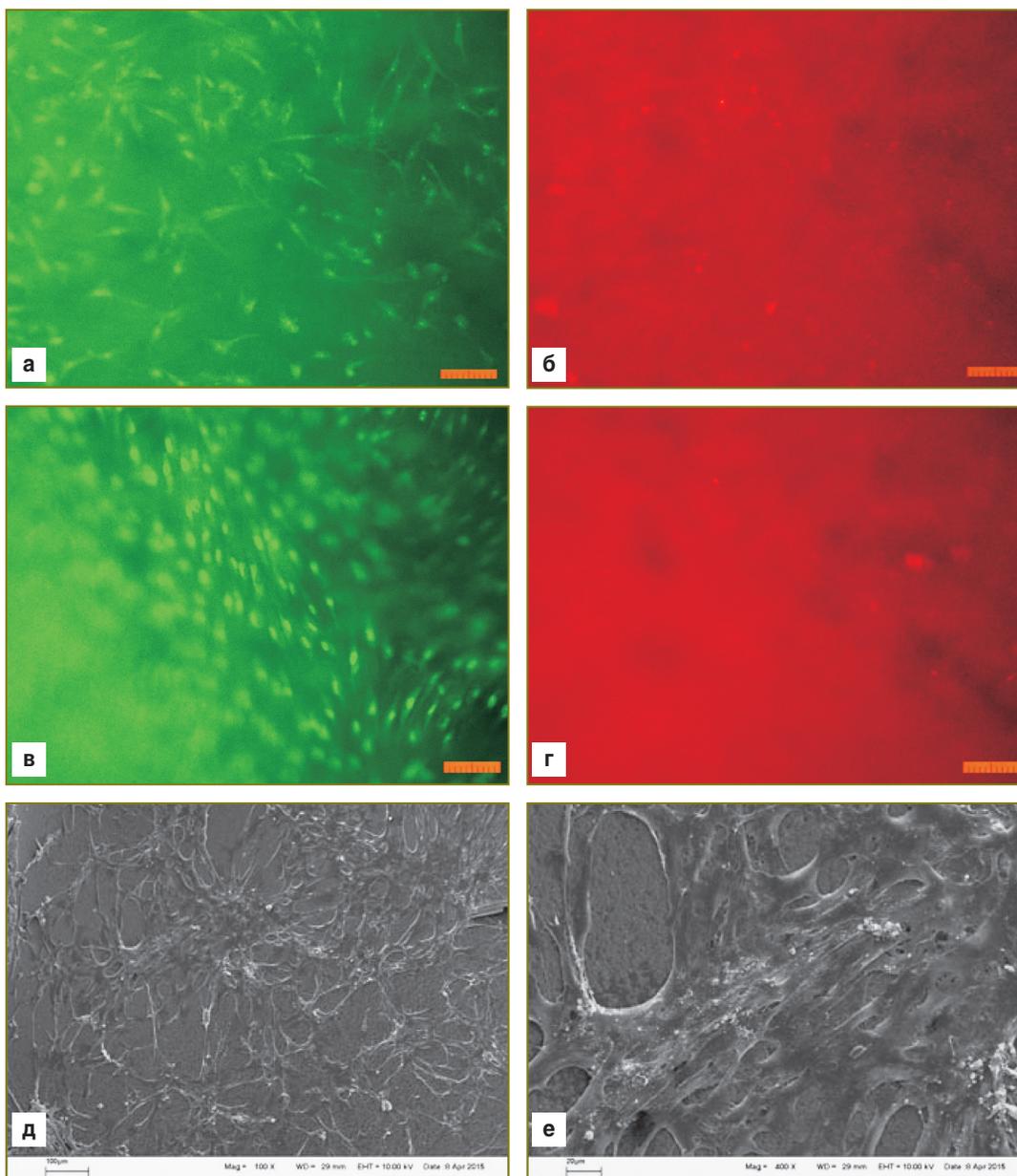


Рис. 3. Внешний вид мезенхимальных стволовых клеток человека при инкубации на поверхности пленки аллилхитозана + ПЭГ-ДА: 1-е сутки инкубации (а, б); 7-е сутки инкубации (в–е). Окраска клеток Syto 9 (а, в); окраска ядер мертвых клеток пропидий йодом (б, г); микрофотографии сканирующей электронной микроскопии (д, е)

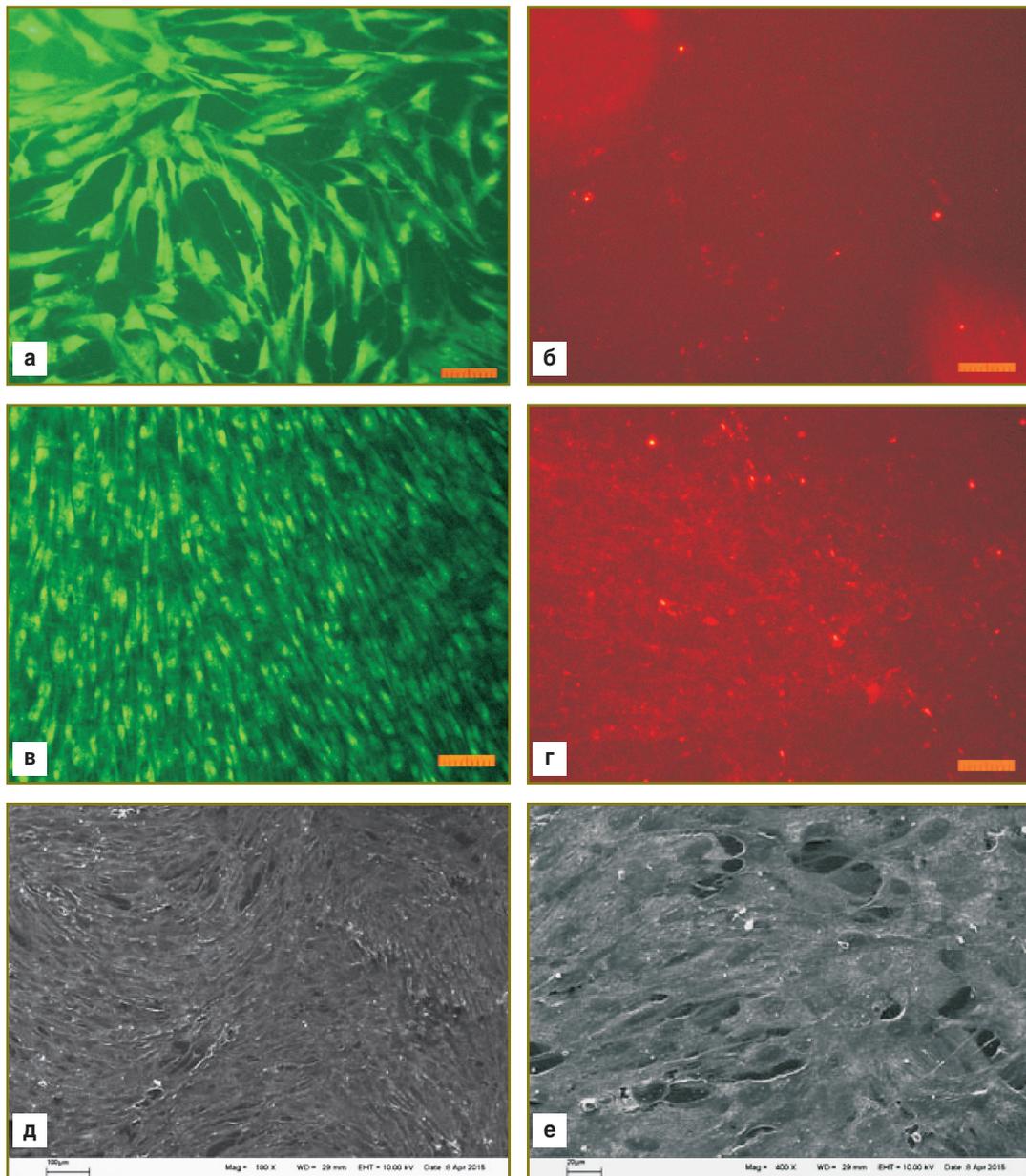


Рис. 4. Внешний вид мезенхимальных стволовых клеток человека при инкубации на поверхности покровного стекла (контроль): 1-е сутки инкубации (а, б); 7-е сутки инкубации (в–е). Окраска клеток Syto 9 (а, в); окраска ядер мертвых клеток пропидий йодом (б, г); микрофотографии сканирующей электронной микроскопии (д, е)

генов-маркеров (см. таблицу) [12, 13], то в настоящей работе методом ПЦР в режиме реального времени изучали их экспрессию.

Уже на 7-е сутки культивирования клеток на стекле и исследуемых полимерах наблюдаются различия в степени активации экспрессии генов-маркеров дифференцировки по остеогенному пути (рис. 5, а). В контроле (культивирование на стекле) и на материале аллилхитозан происходит активация экспрессии и наблюдается повышенный уровень мРНК генов ALPL, FGFR1, TWIST, BMP1, IGFR1, VDR и TGFBR1. В то же время клетки, культивируемые на материале ХТ-А с ПЭГ-ДА, слабо экспрессируют исследуемые гены, в

них только повышен уровень BGLAP и SMAD 5. На этом этапе культивирования на всех материалах в клетках не обнаруживается транскрипции гена BMP7.

Более длительное культивирование (23 дня) клеток на исследуемых материалах несколько меняет картину уровня транскрипции генов (рис. 5, б). У клеток на всех материалах исчезает экспрессия TNF. На образцах ХТ-А сохраняется высокий уровень экспрессии лишь небольшого числа генов, по сравнению с клетками, культивируемыми на стекле. В контрольной группе в целом сохраняется прежний паттерн транскрипции маркерных генов, но большинство генов его значительно усиливают. При этом количество мРНК генов IGFR1,

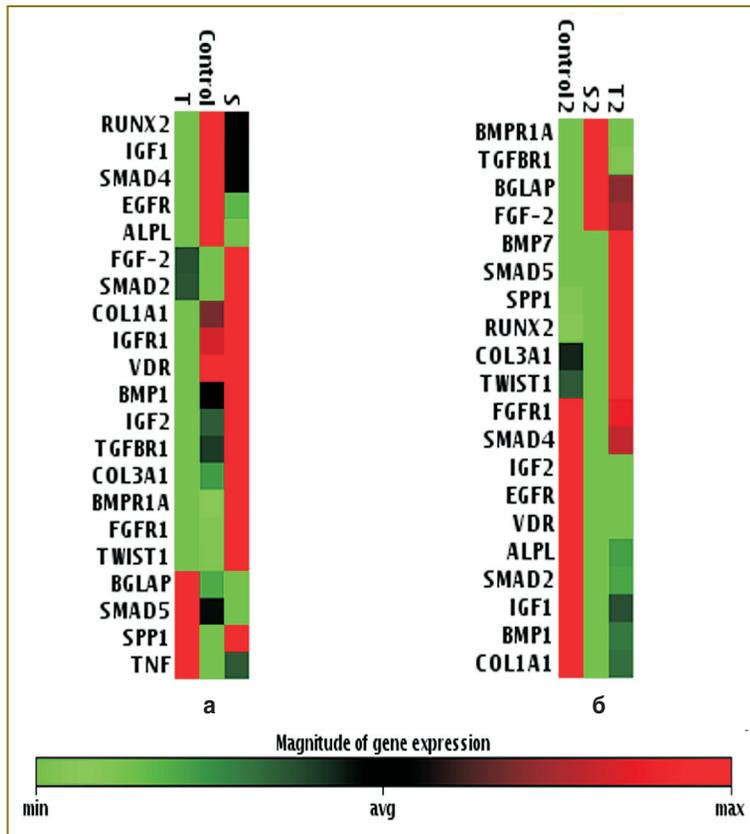


Рис. 5. Уровни экспрессии генов в мезенхимальных стволовых клетках человека, культивируемых в течение 7 сут (а) и 23 сут (б) на поверхности материалов: S и S2 — ХТ-А; T и T2 — ХТ-А с ПЭГ-ДА; контроль — покровное стекло

VDR и TGFB1 снижается. Культивирование клеток на образцах ХТ-А с ПЭГ-ДА стимулирует транскрипцию генов с несколько другим паттерном, нежели в контроле. В этих клетках повышен уровень экспрессии BGLAP, FGF-2, SPP1, SMAD5, COL3A, TWIST1, появляется BMP7, а транскрипция генов IGF2, EGFR и VDR выражена слабо.

Таким образом, аллилхитозан уже на начальных

этапах культивирования клеток индуцирует гены дифференцировки в остеогенном направлении, тогда как материал ХТ-А с ПЭГ-ДА проявляет это свойство только при длительном культивировании клеток.

Матрицы, полученные методом лазерной стереолитографии. Полученные методом лазерной стереолитографии матрицы на основе ХТ-А представляют собой структурно-однородный материал, образцы выполнены в виде скрещенных между собой спиралей (рис. 6) или двух наложенных друг на друга окружностей с лучами, направленными в центр, и отверстием (форма колеса). При слабых недлительных механических воздействиях исходные матрицы полностью восстанавливают свою прежнюю форму. При высыхании прочность образцов возрастает, однако уменьшается упругость и увеличивается хрупкость материала.

Метод регулирования степени набухания разработанных трехмерных структур. Важной задачей при создании материалов для биомедицинских трехмерных структур является разработка композиций, позволяющих регулировать степень набухания матриц на их основе при использовании *in vivo* [16]. Проведение заместительной терапии при введении таких структур в поврежденные ткани при выполнении хирургической операции может не только стимулировать процесс заживления, но и снижать отечность, забирая из места травмы излишнюю биожидкость [17]. Для представленных в настоящей работе материалов и структур на их основе был разработан подход, позволяющий регулировать степень набухания скаффолдов в пределах от 490 до 630% мас.

Алгоритм исследования набухания представлен в разделе «Материалы и методы». Высокие значения степеней набухания (до 630%) были получены для матриц, предварительно выдержанных в аммиаке

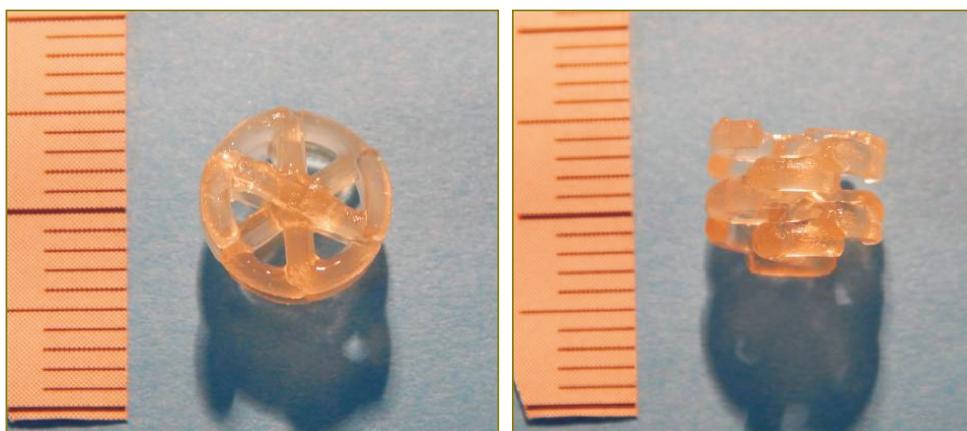


Рис. 6. Внешний вид структурированных матриц; 1 деление линейки = 1 мм

Рис. 7. Степень набухания полимерных матриц в различных растворителях: дистиллированной воде (1), воде после выдерживания в этаноле (2), воде после выдерживания в аммиаке (3), PBS (4), PBS после выдерживания в этаноле (5), PBS после выдерживания в аммиаке (6)

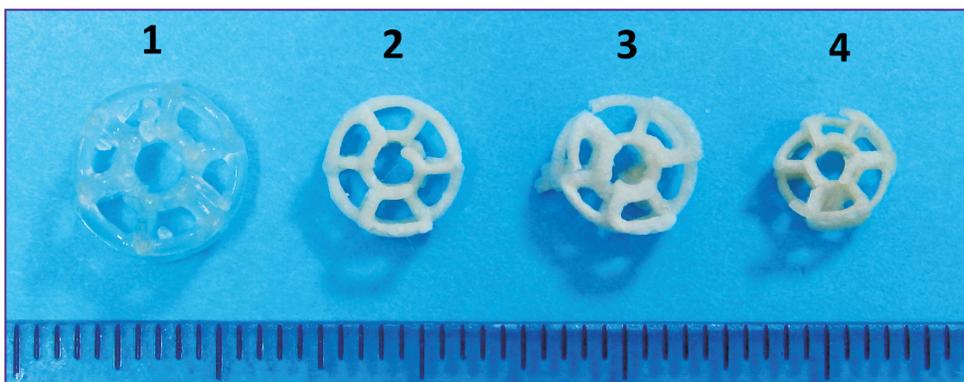
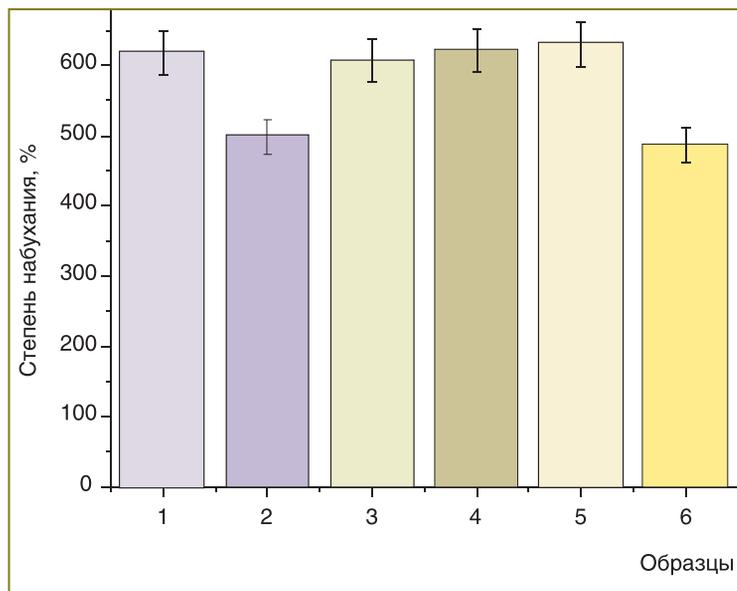


Рис. 8. Трехмерные структуры, полученные на основе модифицированного хитозана, в том числе: исходный образец (1), образцы после лиофильной сушки и предварительного выдерживания в PBS (2), NH_4OH и PBS (3), $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ и PBS (4); 1 деление линейки = 1 мм

и потом помещенных в дистиллированную воду. При использовании в качестве растворителя PBS для образцов, выдержанных 2 ч в этаноле, среднее значение степени набухания составляло 630%. Статистическая обработка результатов показывает, что эмпирические значения $U_{\text{эмп}}$ данных образцов находятся в зоне незначимости (рис. 7, столбцы 1, 3, 4 соответственно).

Для снижения степени набухания в буфере образец предварительно обрабатывали аммиаком. При этом хитозан переходил в основную форму. Отсутствие ацетатного противоиона на аминогруппе снижает сорбционную способность матриц относительно жидкости, помогая тем самым убрать излишнее набухание.

Аналогичное значение SWR было получено для матриц, набухших в дистиллированной воде после предварительной выдержки в этиловом спирте (рис. 7, столбцы 2 и 5), которая приводила к незначительному сжатию структуры (в сравнении с обработкой аммиаком). Это происходит вследствие вытеснения из поли-

мера молекул «связанной» воды молекулами этанола. Трехмерные структуры, полученные на основе модифицированного хитозана, в том числе исходный образец, а также образцы после лиофильной сушки и предварительного выдерживания в PBS и NH_4OH представлены на рис. 8.

Заключение. Созданы реакционно-способные производные хитозана в результате его взаимодействия с бромистым аллилом в условиях сдвиговых деформаций в экструдере при отсутствии растворителей. На основе полученных соединений в ходе проведения УФ-индуцированной сшивки в присутствии фотоинициатора и сшивающего агента сформирован ряд пленок. Исследование метаболической активности клеток линии NCTC L929 с использованием МТТ-теста показало, что рассматриваемые образцы не содержат токсичных для клеток млекопитающих водорастворимых компонентов. Новые материалы аллилхитозан и аллилхитозан с диакрилатом полиэтиленгликоля являются

биосовместимыми, в равной степени поддерживают адгезию, распластывание и пролиферативную активность мезенхимальных стволовых клеток человека, но имеют существенные различия в степени и характере активации экспрессии генов-маркеров дифференцировки по остеогенному пути. На основе разработанного материала методом лазерной стереолитографии получены трехмерные матрицы с контролируемой степенью набухания в физиологическом растворе.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда — проект №15-13-00140 (в части лазерной стереолитографии и исследований цитотоксичности скаффолдов) и Российского фонда фундаментальных исследований — проект №14-29-07234-офи_м (в части синтеза модифицированного хитозана).

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература

1. Regenerative Medicine. Editor by Steinhoff G. Springer Science+Business Media B.V.; 2011; 1032 p., <http://dx.doi.org/10.1007/978-90-481-9075-1>.
2. Lam C.X.F., Moa X.M., Teoh S.H., Hutmacher D.W. Scaffold development using 3D printing with a starch-based polymer. *Materials Science and Engineering: C* 2002 May; 20(1–2): 49–56, [http://dx.doi.org/10.1016/S0928-4931\(02\)00012-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0928-4931(02)00012-7).
3. Chumnanklang R., Panyathanmaporn T., Sitthiseripatip K., Suwanprateeb J. 3D printing of hydroxyapatite: effect of binder concentration in pre-coated particle on part strength. *Materials Science and Engineering: C* 2007 May; 27(4): 914–921, <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2006.11.004>.
4. Mankovich N.J., Samson D., Pratt W., Lew D., Beumer J. Surgical planning using three-dimensional imaging and computer modeling. *Otolaryng Clin North Am* 1994 Oct; 27(5): 875–889.
5. Koroleva A., Kufelt O., Schlie-Wolter S., Hinze U., Chichkov B. Laser microstructured biodegradable scaffolds. *Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering* 2013 Oct; 58(5): 399–405, <http://dx.doi.org/10.1515/bmt-2013-0036>.
6. Leach J.B., Bivens K.A., Collins C.N., Schmidt C.E. Development of photocrosslinkable hyaluronic acid polyethylene glycol-peptide composite hydrogels for soft tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2004 Jul; 70A(1): 74–82, <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.30063>.
7. Koroleva A., Gittard S., Schlie S., Deiwick A., Jockenhoevel S., Chichkov B. Fabrication of fibrin scaffolds with controlled microscale architecture by a two-photon polymerization–micromolding technique. *Biofabrication* 2012 Mar; 4(1): 015001, <http://dx.doi.org/10.1088/1758-5082/4/1/015001>.
8. Prut E.V., Zelenetskii A.N. Chemical modification and blending of polymers in an extruder reactor. *Russian Chemical Reviews* 2001; 70(1): 65–79, <http://dx.doi.org/10.1070/RC2001v070n01ABEH000624>.
9. Аколова Т.А., Роговина С.З., Вихорева Г.А., Зеленецкий С.Н., Гальбрайт Л.С., Ениколопов Н.С. Образование хитозана из хитина в условиях сдвиговых деформаций. Высокомолекулярные соединения. Серия Б 1991; 32(10): 735–737.
10. Filippov Ya.Yu., Larionov D.S., Putlyaev V.I., Sokolov A.V., Koval'kov V.K., Agakhi K.A., Selezneva I.I., Nikonova Yu.A. Reaction-associated resorbable phosphate materials: production and testing in vitro. *Glass & Ceramics* 2013 Nov; 70(7–8): 306–310, <http://dx.doi.org/10.1007/s10717-013-9568-8>.
11. Селезнева И.И., Савинцева И.В., Вихлянцова Е.Ф., Давыдова Г.А., Гаврилюк Б.К. Имобилизация и длительное культивирование эмбриональных стволовых клеток мыши в матриксе коллаген-хитозанового геля. *Клеточные технологии в биологии и медицине* 2006; 3: 135–140.
12. Twine N.A., Chen L., Pang C.N., Wilkins M.R., Kassem M. Identification of differentiation-stage specific markers that define the ex vivo osteoblastic phenotype. *Bone* 2014 Oct; 67: 23–32, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2014.06.027>.
13. Ho N.C., Jia L., Driscoll C.C., Gutter E.M., Francomano C.A. A skeletal gene database. *J Bone Miner Res* 2000 Nov; 15(11): 2095–2122, <http://dx.doi.org/10.1359/jbmr.2000.15.11.2095>.
14. Нудьга Л.А., Петрова В.А., Денисов В.М., Петропавловский Г.А. Алкилирование хитозана. *Журнал прикладной химии* 1991; 64(1): 229–232.
15. Xia Y., Guo T., Zhao H., Song M., Zhang B., Zhang B. A novel solid phase for selective separation of flavonoid compounds. *J Sep Sci* 2007 Jun; 30(9): 1300–1306, <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200600376>.
16. Kerker J.T., Leo A.J., Sgaglione N.A. Cartilage repair: synthetics and scaffolds: basic science, surgical techniques, and clinical outcomes. *Sports Med Arthrosc* 2008; 16(4): 208–216, <http://dx.doi.org/10.1097/JSA.0b013e31818cdbaa>.
17. Tollar M., Stöl M., Kliment K. Surgical suture materials coated with a layer of hydrophilic Hydrion gel. *J Biomed Mater Res* 1969 Jun; 3(2): 305–313, <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.820030210>.

References

1. *Regenerative Medicine*. Editor by Steinhoff G. Springer Science+Business Media B.V.; 2011; 1032 p., <http://dx.doi.org/10.1007/978-90-481-9075-1>.
2. Lam C.X.F., Moa X.M., Teoh S.H., Hutmacher D.W. Scaffold development using 3D printing with a starch-based polymer. *Materials Science and Engineering: C* 2002 May; 20(1–2): 49–56, [http://dx.doi.org/10.1016/S0928-4931\(02\)00012-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0928-4931(02)00012-7).
3. Chumnanklang R., Panyathanmaporn T., Sitthiseripatip K., Suwanprateeb J. 3D printing of hydroxyapatite: effect of binder concentration in pre-coated particle on part strength. *Materials Science and Engineering: C* 2007 May; 27(4): 914–921, <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2006.11.004>.
4. Mankovich N.J., Samson D., Pratt W., Lew D., Beumer J. Surgical planning using three-dimensional imaging and computer modeling. *Otolaryng Clin North Am* 1994 Oct; 27(5): 875–889.
5. Koroleva A., Kufelt O., Schlie-Wolter S., Hinze U., Chichkov B. Laser microstructured biodegradable scaffolds. *Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering* 2013 Oct; 58(5): 399–405, <http://dx.doi.org/10.1515/bmt-2013-0036>.
6. Leach J.B., Bivens K.A., Collins C.N., Schmidt C.E. Development of photocrosslinkable hyaluronic acid polyethylene glycol-peptide composite hydrogels for soft tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2004 Jul; 70A(1): 74–82, <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.30063>.
7. Koroleva A., Gittard S., Schlie S., Deiwick A., Jockenhoevel S., Chichkov B. Fabrication of fibrin scaffolds with controlled microscale architecture by a two-photon polymerization–micromolding technique. *Biofabrication*

2012 Mar; 4(1): 015001, <http://dx.doi.org/10.1088/1758-5082/4/1/015001>.

8. Prut E.V., Zelenetskii A.N. Chemical modification and blending of polymers in an extruder reactor. *Russian Chemical Reviews* 2001; 70(1): 65–79, <http://dx.doi.org/10.1070/RC2001v070n01ABEH000624>.

9. Akopova T.A., Rogovina S.Z., Vikhoreva G.A., Zelenetskiy S.N., Gal'braykh L.S., Enikolopov N.S. Formation of chitosan from chitin under shearing strain. *Vysokomolekulyarnye soedineniya. Seriya B* 1991; 32(10): 735–737.

10. Filippov Ya.Yu., Larionov D.S., Putlyaev V.I., Sokolov A.V., Koval'kov V.K., Agakhi K.A., Selezneva I.I., Nikonova Yu.A. Reaction-associated resorbable phosphate materials: production and testing in vitro. *Glass & Ceramics* 2013 Nov; 70(7–8): 306–310, <http://dx.doi.org/10.1007/s10717-013-9568-8>.

11. Selezneva I.I., Savintseva I.V., Vikhlyantseva E.F., Davydova G.A., Gavrilyuk B.K. Immobilization and long-term culture of murine embryonic stem cell in collagen-chitosan gel matrix. *Kletochnye tekhnologii v biologii i meditsine* 2006; 3: 135–140.

12. Twine N.A., Chen L., Pang C.N., Wilkins M.R., Kassem M.

Identification of differentiation-stage specific markers that define the ex vivo osteoblastic phenotype. *Bone* 2014 Oct; 67: 23–32, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2014.06.027>.

13. Ho N.C., Jia L., Driscoll C.C., Gutter E.M., Francomano C.A. A skeletal gene database. *J Bone Miner Res* 2000 Nov; 15(11): 2095–2122, <http://dx.doi.org/10.1359/jbmr.2000.15.11.2095>.

14. Nud'ga L.A., Petrova V.A., Denisov V.M., Petropavlovskiy G.A. Chitosan alkylation. *Zhurnal prikladnoy khimii* 1991; 64(1): 229–232.

15. Xia Y., Guo T., Zhao H., Song M., Zhang B., Zhang B. A novel solid phase for selective separation of flavonoid compounds. *J Sep Sci* 2007 Jun; 30(9): 1300–1306, <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200600376>.

16. Kerker J.T., Leo A.J., Sgaglione N.A. Cartilage repair: synthetics and scaffolds: basic science, surgical techniques, and clinical outcomes. *Sports Med Arthrosc* 2008; 16(4): 208–216, <http://dx.doi.org/10.1097/JSA.0b013e31818cdbaa>.

17. Tollar M., Štol M., Kliment K. Surgical suture materials coated with a layer of hydrophilic Hydron gel. *J Biomed Mater Res* 1969 Jun; 3(2): 305–313, <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.820030210>.