

DOI: 10.15825/1995-1191-2016-3-85-93

СВЕРХКРИТИЧЕСКАЯ ФЛЮИДНАЯ ОБРАБОТКА ТРЕХМЕРНЫХ ГИДРОГЕЛЕВЫХ МАТРИКСОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ПРОИЗВОДНЫХ ХИТОЗАНА

П.С. Тимашев^{1, 2}, К.Н. Бардакова¹, С.Н. Чурбанов¹, Л.И. Кротова¹, А.М. Григорьев³,
М.М. Новиков⁴, С.Г. Лакеев², В.И. Севастьянов³, В.Н. Баграташвили¹

¹ Институт фотонных технологий ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Троицк, Москва, Российская Федерация

² ФГУП «НИФХИ им. Л.Я. Карпова», Москва, Российская Федерация

³ ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

⁴ Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, Шатура, Московская область, Российская Федерация

Цель. Контролируемая обработка физико-химических и механических свойств трехмерных сшитых матриц на основе реакционно-способного хитозана. **Материалы и методы.** Из фоточувствительной композиции на основе аллилхитозана (5 масс.%), диакрилата полиэтиленоксида (8 масс.%) и фотоинициатора Irgacure 2959 (1 масс.%) провели формирование трехмерных матриксов на установке лазерного стереолитографа. Для структур в основной и солевой формах хитозана с использованием весового метода построены кинетические кривые набухания, измерены краевые углы смачивания методом растекающейся капли. Модифицирование матриксов проводили на установке сверхкритического флюида (40 °C, 12 МПа) в течение 1,5 часа. С помощью нанотвердомера Nano Indenter Piuma рассчитывали значения модуля Юнга. Исследование цитотоксичности проводили методом прямого контакта образцов с культурой фибробластов мышцы клеточной линии NIH 3T3. **Результаты.** Архитектура матриксов полностью повторяет заданную программой модель, матриксы однородны по всему объему и сохраняют свою форму после перевода в основную форму. Обработка матриксов в среде сверхкритического диоксида углерода (скCO₂) приводит к их сжатию на 5%. Рассчитанный модуль упругости матриксов после обработки в среде скCO₂ в 4 раза выше, чем для исходного матрикса. Кривые набухания матриксов имеют схожий вид, при этом для матриксов в основной форме максимальная степень набухания в 2–2,5 раза больше, чем для матриксов в солевой форме. Перевод материала в основную форму приводит к гидрофобизации поверхности: контактный угол смачивания равен 94°, для солевой формы равен 66°. Поглощение жидкости основной формой происходит примерно в 1,6 раза быстрее. Толщина пленок на участке контакта с жидкостью после поглощения образцом капли увеличилась на 133 и 87% для основной и солевой форм соответственно. Обработка образцов в среде скCO₂ приводит к снижению их цитотоксичности со 2-й степени реакции (исходные образцы) до 1-й. **Заключение.** Использование сверхкритического диоксида углерода для сформированных матриксов позволяет улучшить биосовместимость применяемого материала на 1 степень и повысить модуль упругости материала более чем в 3 раза. Аллилхитозан в процессе лазерной фотополимеризации образует устойчивые трехмерные сетки, что дает возможность десорбировать токсичный низкомолекулярный компонент без разрушения структуры матрикса.

Ключевые слова: гидрогели, лазерная стереолитография, биосовместимость трехмерных матриц, изменение механических свойств гидрогеля.

Для корреспонденции: Бардакова Ксения Николаевна. Адрес: Москва, Троицк, ул. Пионерская, 2. Тел. (496) 851-04-42. E-mail: arie5@yandex.ru.

For correspondence: Bardakova Kseniia Nikolaevna. Address: 2, Pionerskaya St., Moscow, Troitsk, Russian Federation. Tel. (496) 851-04-42. E-mail: arie5@yandex.ru

SUPERCritical FLUID TREATMENT OF THREE-DIMENSIONAL HYDROGEL MATRICES, COMPOSED OF CHITOSAN DERIVATIVES

P.S. Timashev^{1, 2}, K.N. Bardakova¹, S.N. Churbanov¹, L.I. Krotova¹, A.M. Grigoriev³, M.M. Novikov⁴, S.G. Lakeev², V.I. Sevastianov³, V.N. Bagratashvili¹

¹ Institute of Photonic Technologies, Federal Research Center Crystallography and Photonics, Moscow, Troitsk, Russian Federation

² Karpov Institute of Physical Chemistry, Moscow, Russian Federation

³ V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

⁴ Institute on Laser and Information Technologies, Shatura, Moscow region, Russian Federation

Aim. Controlled treatment of the physico-chemical and mechanical properties of a three-dimensional cross-linked matrix based on reactive chitosan. **Materials and methods.** The three-dimensional matrices were obtained using photosensitive composition based on allyl chitosan (5 wt%), poly(ethylene glycol) diacrylate (8 wt%) and the photoinitiator Irgacure 2959 (1 wt%) by laser stereolithography setting. The kinetic swelling curves were constructed for structures in the base and salt forms of chitosan using gravimetric method and the contact angles were measured using droplet spreading. The supercritical fluid setting (40 °C, 12 MPa) was used to process matrices during 1.5 hours. Using nanohardness Piuma Nanoindenter we calculated values of Young's modulus. The study of cytotoxicity was performed by direct contact with the culture of the NIH 3T3 mouse fibroblast cell line. **Results.** Architectonics of matrices fully repeats the program model. Matrices are uniform throughout and retain their shape after being transferred to the base form. Matrices compressed by 5% after treatment in supercritical carbon dioxide (scCO₂). The elastic modulus of matrices after scCO₂ treatment is 4 times higher than the original matrix. The kinetic swelling curves have similar form. In this case the maximum degree of swelling for matrices in base form is 2–2.5 times greater than that of matrices in salt form. There was a surface hydrophobization after the material was transferred to the base form: the contact angle is 94°, and for the salt form it is 66°. The basic form absorbs liquid approximately 1.6 times faster. The film thickness was increased in the area of contact with the liquid droplets after absorption by 133 and 87% for the base and the salt forms, respectively. Treatment of samples in scCO₂ reduces their cytotoxicity from 2 degree of reaction (initial samples) down to 1 degree of reaction. **Conclusion.** The use of supercritical carbon dioxide for scaffolds allows improving biocompatibility of the applied material for 1 degree and increasing the elastic modulus of the material more than 3 times. Allyl chitosan forms stable three-dimensional networks during laser photopolymerization. This enables desorbing toxic low molecular weight component without destruction of the matrix structure.

Key words: hydrogels, laser stereolithography, biocompatibility of three-dimensional matrices, changes in the mechanical properties of the hydrogel.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка биологически совместимых конструкций, используемых для интенсификации регенеративного потенциала организма при терапии повреждений участков тканей и органов, является одним из основных направлений современной тканевой инженерии и регенеративной медицины [1, 2]. В основе таких конструкций лежат трехмерные полимерные структуры (так называемые матриксы-носители клеток, или скаффолды), выполняющие, во-первых, роль каркаса, поддерживающего тканевой дефект [3], и во-вторых, носителей клеток, на поверхности которых осуществляется адгезия, пролиферация и последующая дифференцировка клеток [4]. Для разработки и внедрения терапии с использованием трехмерных структур и аутологичных клеток необходимо иметь возможность варьирования механических свойств таких

структур, а также обеспечение их биосовместимости. Это важно для ослабления тканевого ответа при их имплантации, в частности для утоньшения фиброзной капсулы вокруг места имплантации [5].

Имеется несколько основных способов формирования трехмерных конструкций, позволяющих регулировать механические свойства структур, среди которых следует отметить: введение дополнительных сшивающих агентов; включение органических/неорганических добавок в полимерную основу матрикса; использование дополнительных армирующих конструкций [6–8]. Использование дополнительных сшивающих агентов увеличивает число поперечных связей, способных к ковалентному связыванию, что обычно вызывает возрастание механической прочности матрикса [9]. В то же время использование высоких концентраций сшивающих агентов может повысить токсичность тканеинженерного каркаса [10]. Применение армирую-

ших конструкций добавляет сложности в контроле скорости биodeградации получаемого матрикса, а материал конструкции ограничивает возможные конфигурации полимерного каркаса.

Одним из возможных вариантов модифицирования трехмерной структуры без изменения ее архитектоники является использование сверхкритического флюида (СКФ), в частности, сверхкритического диоксида углерода (scCO_2) [11]. Среда scCO_2 нетоксична, полностью удаляется из структуры материала по завершению процесса модификации и может быть использована для стерилизации материалов биомедицинского назначения [12]. Помимо этого, обработка в среде scCO_2 позволяет проводить экстракцию низкомолекулярных фрагментов и несшитых элементов полимерной матрицы, не меняя ее химический состав, что, в свою очередь, повышает биосовместимость модифицированных структур [13]. В работе представлены результаты обработки в среде scCO_2 трехмерных структур, сформированных методом лазерной стереолитографии на основе производных хитозана, приводящей к снижению токсичности и изменению их механических характеристик.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе применяли аллилхитозан, полученный в результате твердофазного синтеза по методике, описанной в работе [14]. Твердофазное модифицирование осуществляли действием на хитозан аллилбромид в отсутствие жидкой дисперсионной среды в двухшнековом экструдере. Введение двойной $\text{C}=\text{C}$ связи в хитозан позволяет расширить возможности получения новых материалов на его основе за счет реакций присоединения, сшивания и привитой сополимеризации. По данным ЯМР-анализа, замещение происходит в основном по аминогруппам хитозана со степенью замещения не менее 0,2 [15].

В качестве сшивающего агента использовали диакрилат полиэтиленоксида (ПЭГ-ДА, 700 Да). Фотоинициатор (ФИ, Irgacure 2959, 96%) и остальные применяемые в работе реактивы были произведены компанией Sigma-Aldrich. Смешение компонентов фоточувствительной композиции проводили согласно [16], итоговая смесь содержала 5 масс.% аллилхитозана, 8 масс.% ПЭГ-ДА и 1 масс.% ФИ. Формирование скаффолдов осуществляли по заданной программе с помощью многократного рисования каждого слоя, по методу [17] на установке лазерного стереолитографа ЛС 120 (ИПЛИТ РАН, Россия), с использованием HeCd-лазера (длина волны 325 нм, мощность излучения 15 мВт) [16].

Готовые скаффолды отмывали от остатков несшитого материала дистиллированной водой, после матриксы оставляли на 10 часов в эксикаторе для полного удаления излишней влаги. Сформирован-

ные матриксы переводили в основную форму путем выдерживания в водном растворе аммиака (25%). В дальнейшем эти структуры использовали для определения характеристик набухания и модификации в среде scCO_2 .

Для модифицирования структур использовали СКФ-установку [18], оснащенную реактором объемом 30 мл. В реактор напускали CO_2 до давления 7 МПа, после чего включали нагрев реактора и повышали температуру до 40 °С. По мере нагрева реактора давление увеличивалось и достигало 12 МПа. Обработку полимерных структур проводили в течение 1,5 часа, после чего нагреватель выключали и производили снижение давления до атмосферного с помощью вентиля, оснащенного игольчатым наплетателем, обеспечивающим постоянную скорость сброса диоксида углерода из реактора. Такой подход обеспечивал равномерный сброс давления и воспроизводимость проводимых экспериментов. Модифицированные таким образом образцы извлекали из реактора и хранили в эксикаторе при температуре +21 °С.

Измерение механических свойств матриксов проводили с помощью наноиндентора Nano Indenter Piuma (Нидерланды) [19]. Сканирование поверхности образцов осуществляли на воздухе при комнатной температуре с шагом 20 мкм. Радиус закругления кантилевера составлял 27,5 мкм, жесткость – 0,46 Н/м. По экспериментальной кривой зависимости нагрузки от глубины вдавливания по имеющейся в наноинденторе программе рассчитывали значения модуля Юнга.

Процесс набухания изучали весовым методом в фосфатно-солевом буфере; исследовали матриксы в солевой и в основной формах. Непосредственно перед помещением в растворители матриксы высушивали на установке лиофильного сушения (FreeZone, Labconco). Перед взвешиванием матриксы выдерживали в эксикаторе в течение 2 часов для удаления излишков жидкости. Каждую точку кривой набухания рассчитывали по формуле:

$$Po \text{ int} = \frac{W_s - W_0}{W_0},$$

где W_s – масса набухшего матрикса, W_0 – масса матрикса после лиофильной сушки.

Определение угла смачиваемости проводили при комнатной температуре и влажности 70% с использованием методики, приведенной в [20]. Изучаемые структуры находились в солевой и основной формах, в качестве смачивающей жидкости использовали дистиллированную воду, подкрашенную бенгальским розовым (ACROS ORGANICS, India) для лучшей визуализации процессов смачивания. Измерение краевых углов смачивания осуществляли с помощью фотокамеры Scopetek dcm 900, направ-

Таблица

Степень ответной реакции клеток
The degree of cell response reaction

Степень реакции	Реакция	Описание зоны реакционной зоны
0	Отсутствует	Нет никакой реакции клеток вокруг образца и под ним
1	Незначительная	Некоторые клетки под образцом имеют измененную морфологию или разрушены
2	Не резкая	Зона лизиса клеток ограничивается площадью под образцом
3	Умеренная	Зона лизиса распространяется на 1 см вокруг образца
4	Резкая	Зона лизиса распространяется больше, чем на 1 см, вокруг образца

ленной на горизонтальную поверхность с прикрепленным к ней образцом; и камера, и поверхность с образцом были закреплены на одной высоте на штативе. С помощью инсулинового шприца, закрепленного над горизонтальной поверхностью под углом 90°, обеспечивали падение капли на анализируемый образец. Далее каждые 5 секунд осуществляли фотографирование поверхности образца вместе с каплей подкрашенной воды, до момента ее полного всасывания.

Исследование цитотоксичности проводили методом прямого контакта образцов с культурой фибробластов мыши клеточной линии NIN 3T3 по стандартной методике в соответствии с требованиями стандарта ГОСТ ISO 10993-5-2011 [21].

Фибробласты мыши линии NIN 3T3 были получены из коллекции перевиваемых соматических клеток позвоночных ГУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН (ГУ НИИВ РАМН). Клетки культивировали в культуральных флаконах в полной ростовой среде (ПРС), содержащей в качестве основы среду ДЕМЕМ с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-Глутамина, 1 мМ HEPES и гентамицина в количестве 50 мкг/мл, до состояния $80 \pm 10\%$ монослоя. После чего клетки снимали с культурального пластика смесью растворов Версена и трипсина (1:1) и ресуспендировали ПРС. Суспензию клеток доводили до концентрации $1,0 \times 10^5$ кл/мл, разбавляя ПРС. Определение количества клеток в суспензии проводили с использованием гемоцитометра (камеры Горяева). Клетки высевали в культуральные 24-луночные плоскодонные планшеты, добавляя по 0,5 мл суспензии необходимой концентрации в каждую лунку. Планшеты инкубировали (24 ± 2) ч при 37 °C во влажной атмосфере, содержащей (5 ± 1)% CO₂, до образования клетками (80 ± 10)% монослоя. Уровень конfluence монослоя оценивали с помощью бинокулярного инвертированного микроскопа Micros MC700 (Австрия), $\times 100$.

Аккуратно удаляли из лунок питательную среду и помещали на поверхность клеточного монослоя испытуемые образцы и добавляли по 0,5 мл свежей ПРС. Перед исследованием образцы дезинфициро-

вали инкубацией в 70%-м этаноле в течение 20 мин с последующей двукратной отмывкой этанола стерильным физиологическим раствором в асептических условиях в ламинарной боксе 2 класса защиты.

Через (24 ± 2) ч инкубации из лунок удаляли содержимое и промывали сбалансированным солевым раствором Хенкса. В каждую лунку добавляли 0,1% раствор витального красителя трипанового синего. Трипановый синий окрашивает лизированные клетки и/или клетки с поврежденными клеточными мембранами. Через 1–2 мин краситель удаляли из лунок, аккуратно промывали лунки раствором Дюльбекко, после чего сразу же производили оценку культуры микроскопически на наличие морфологических изменений и/или уменьшения плотности клеток.

Полученные результаты цитотоксической реакции культуры фибробластов мыши линии NIN 3T3 интерпретировали с использованием таблицы «Степень ответной реакции клеток» (табл.).

Отрицательным контролем в эксперименте служила полная ростовая среда, положительным – стандартный раствор цинка в азотной кислоте (Zn 1–2 wt. % HNO₃, разведение 1:200 раствором 0,9% NaCl для инъекций).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Архитектоника матриксов на основе аллилхитозана, полученных нами методом лазерной стереолитографии, полностью повторяет заданную программой модель (приведена на рис. 1, а). Матриксы прозрачны, однородны по всему объему структуры, обладают упругими свойствами, сохраняют свою форму после процесса отмывки и перевода в основную форму (рис. 1, б). После проведения процесса обработки структур в среде скСО₂ не происходило значительных изменений со структурой гидрогеля (рис. 1, в).

Для исходных и модифицированных в среде скСО₂ матриксов были определены абсолютные значения модуля упругости. Было показано (рис. 2), что рассчитанный модуль упругости матриксов после обработки в среде скСО₂ в 4 раза выше, чем для исходного матрикса (до обработки в скСО₂). При

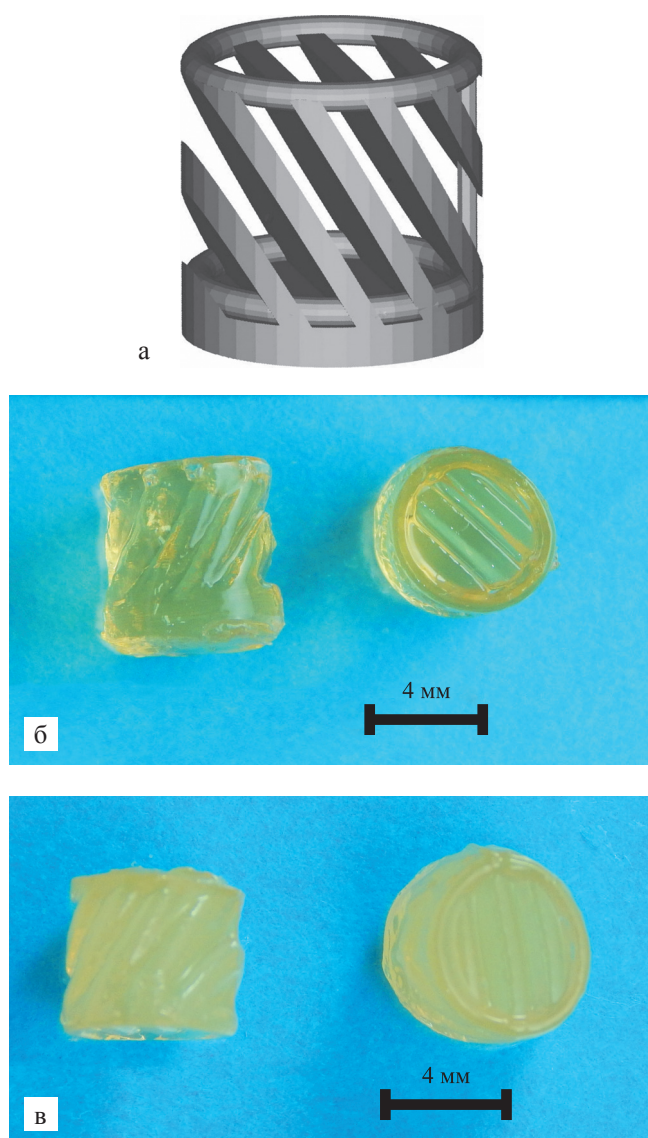


Рис. 1. а – компьютерная модель матрикса; б – структурированные матриксы из фоточувствительной композиции на основе аллилхитозана и ПЭГ-ДА; в – матриксы после обработки в среде scCO_2

Fig. 1. а – a computer model of the matrix; б – structured matrices based on photosensitive allyl chitosan and PEG-DA; в – matrix after treatment in scCO_2

этом дисперсия измерений значения модуля упругости (в абсолютных процентных значениях) была одинаковой для обоих типов таких образцов.

Полученные кривые набухания матриксов имеют схожий характер: степень набухания матриксов сначала растет во времени, через двое суток нахождения в буфере на обоих графиках появляется горизонтальный участок кривой, называемый равновесной, или максимальной, степенью набухания (рис. 3). Эта величина является количественной мерой способности полимера к набуханию. Для матриксов в основной форме максимальная степень набухания в 2–2,5 раза больше, чем у матриксов в солевой форме.

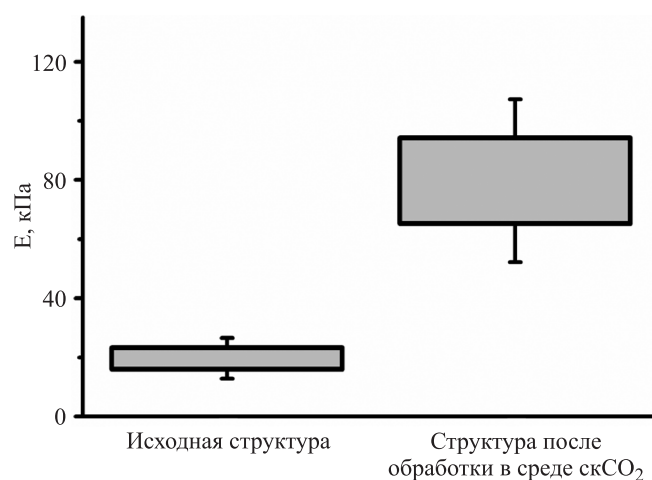


Рис. 2. Изменение модуля упругости хитозановых матриксов до и после обработки в среде сверхкритического диоксида углерода

Fig. 2. Change of elastic modulus of chitosan matrices before and after treatment in supercritical carbon dioxide

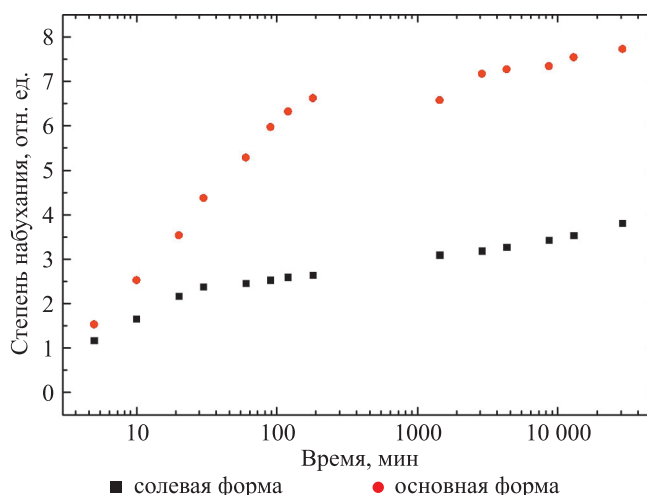


Рис. 3. Кинетические кривые набухания матриксов в солевой и основной формах

Fig. 3. The kinetic swelling curves for matrices in the salt form and in the basic form

На рис. 4 приведены фотографии капель жидкости на поверхности пленок в солевой и основной формах. Видно, что перевод материала в основную форму приводит к увеличению контактного угла смачивания. Толщина пленок на участке контакта с жидкостью после поглощения образцом капли увеличилась на 133 и 87% для основной и солевой форм соответственно.

Кинетика смачивания обеих форм (рис. 5) имеет схожие закономерности со скоростями, при этом солевая форма является более гидрофильной: уже на 140-й с происходит полное поглощение помещенной на поверхность капли, тогда как для основной формы полное поглощение жидкости происходит

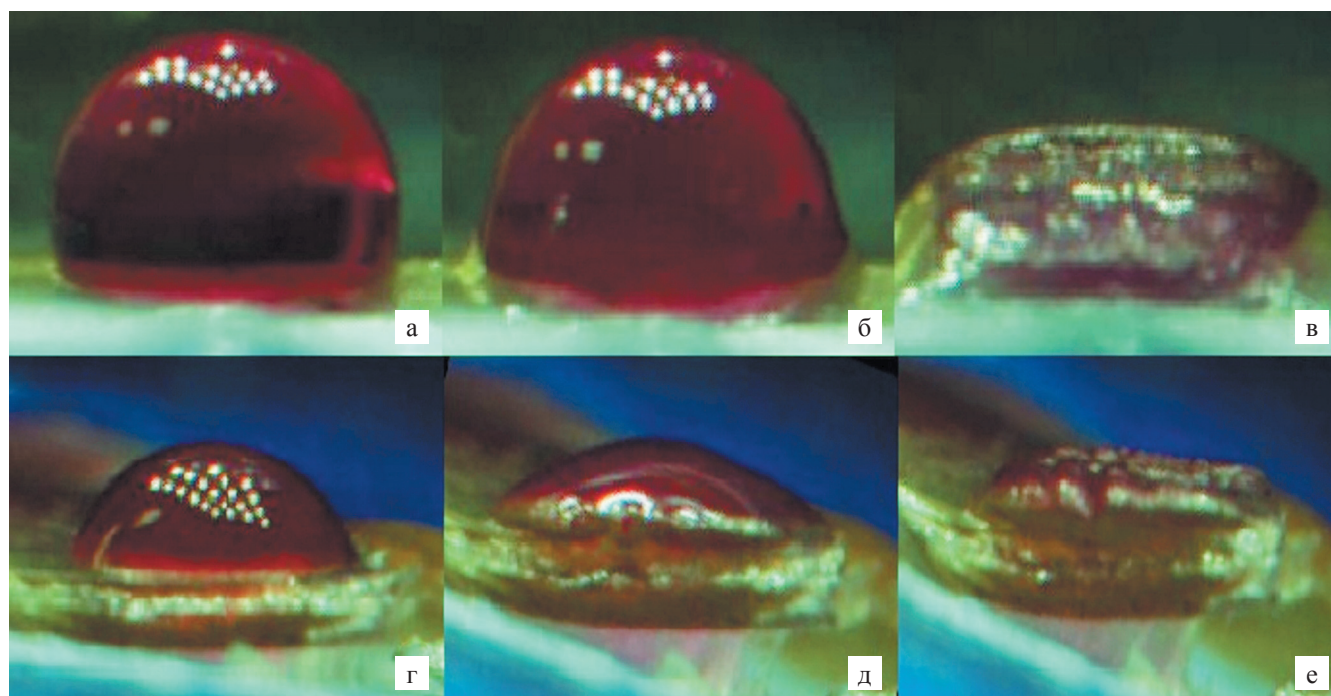


Рис. 4. Изменение краевого угла смачивания в основной и солевой форме матриц: а – основная форма в момент касания жидкости поверхности пленки, $\theta = 94^\circ$; б – основная форма через 60 секунд после касания жидкости поверхности пленки, $\theta = 77^\circ$; в – основная форма через 325 секунд после касания жидкости поверхности пленки, $\theta = 0^\circ$; г – солевая форма в момент касания жидкости поверхности пленки, $\theta = 66^\circ$; д – солевая форма через 60 секунд после касания жидкости поверхности пленки, $\theta = 30^\circ$; е – солевая форма через 140 секунд после касания жидкости поверхности пленки, $\theta = 0^\circ$

Fig. 4. Change in the contact angle for matrices in the basic form and salt form: а – basic form in the moment of contact of the liquid and film surface, $\theta = 94^\circ$; б – basic form after 60 seconds after touching the liquid and film surface, $\theta = 77^\circ$; в – basic form after 325 seconds after touching the liquid and film surface, $\theta = 0^\circ$; г – salt form in the moment of contact of the liquid and film surface, $\theta = 66^\circ$; д – salt form after 60 seconds after touching the liquid and film surface, $\theta = 30^\circ$; е – salt form after 140 seconds after touching the liquid and film surface, $\theta = 0^\circ$

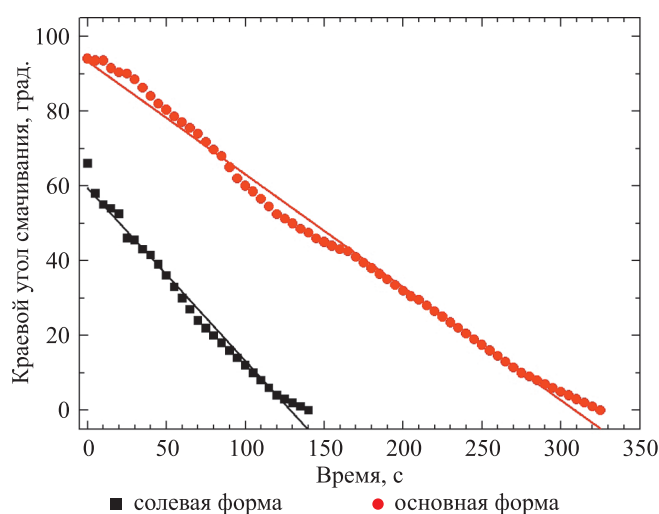


Рис. 5. Кинетика смачивания пленок в основной и в солевой формах во времени

Fig. 5. Kinetics of wetting for films in the basic and salt forms in time

лишь после 325 с. Из тангенсов углов наклона графиков следует, что поглощение жидкости основной формы происходит примерно в 1,6 раза быстрее.

При оценке цитотоксического действия хитозановых матриц оказалось, что все образцы обладают некоторой цитотоксичностью, но отличаются степенью реакции (см. табл.). Исходные образцы матриц оказывали на фибробласты мыши не резкое цитотоксическое действие (2-я степень реакции), т. е. зона лизиса клеток обнаруживалась, но была ограничена площадью под образцом. Обработка скCO_2 хитозановых матриц снижала цитотоксический эффект до 1-й степени реакции (незначительная), при которой зона лизиса клеток отсутствовала и только небольшое количество клеток под образцом имели измененную морфологию или были разрушены.

ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие полимера с диоксидом углерода, находящимся в сверхкритическом состоянии, не сопровождается разрушением структуры, на что указывает устойчивое существование трехмерной

сетки, образуемой макромолекулами, из которых состоит матрикс. Несмотря на более высокую равновесную степень набухания, основная форма демонстрирует худшее смачивание в первоначальный момент контакта капли с поверхностью. Это можно объяснить образованием полярной карбоксильной группы, которая обеспечивает сродство поверхности к воде, а также затрудненной на первоначальном этапе контакта механической адгезией (адгезия за счет попадания воды в трещины и поры структуры). В этом случае рост адгезионных параметров влияет на распластывание клеток на матриксах, их двигательную активность и другие функциональные характеристики, что должно способствовать деградации пленок [22]. Это можно использовать при подборе и варьировании скорости деградации имплантируемого материала.

Как видно из рис. 3, первый этап набухания для обеих форм матриксов идет с максимальной скоростью, что объясняется диффузией молекул растворителя в полимерный матрикс (т. е. фактом капиллярного проникновения жидкости в трехмерную пористую структуру), который можно рассматривать как мембрану. Следующий этап – когда полимерные цепи являются сольватированными, и следовательно, их подвижность уменьшается, замедляется также рост набухания, и при определенном давлении процесс набухания прекращается. Большой наклон кривой набухания (а следовательно, и большая скорость насыщения молекулами растворителя), большее значение равновесной степени набухания для матриксов в основной форме вызвано нехимическим взаимодействием молекул воды с освободившейся амидной группой на хитозане, которая за счет неподеленной электронной пары на атоме азота в растворах проявляет слабоосновные свойства. Благодаря этому именно матриксы, в которых хитозан представлен в основной форме, являются перспективными для дальнейших клеточных испытаний и исследований *in vitro*.

Обработка матриксов в среде scCO_2 не влияет на архитектуру сформированных скаффолдов, однако приводит к десорбции не связанной водородными связями со скелетом матрицы воды, низкомолекулярных соединений, сшивающего агента, фрагментов мономеров и олигомеров. Это вызывает уменьшение объема отдельных локальных трехмерных зон сшитой матрицы и сжатие матриксов на 5%. Структуры теряют оптическую прозрачность вследствие вымывания низкомолекулярных фрагментов и формирования локальных пустот (рис. 1, в). Геометрия структуры сохраняется, что указывает на высокую плотность сшивки сформированных матриксов. Экстракция низкомолекулярных фрагментов, сопровождаемая десорбцией не-

сшитых фрагментов, приводила к значительному возрастанию механической прочности структур и росту модуля упругости – более чем в 3 раза. Таким образом, гидрогели становятся более однородными по всему объему, и их плотность значительно возрастает, что способствует формированию механически прочных гидрогелевых структур.

Проведенные сравнительные исследования биологической безопасности хитозановых матриксов показали, что обработка образцов в среде scCO_2 приводит к снижению их цитотоксичности со 2-й степени реакции (исходные образцы) до 1-й (scCO_2 -обработанные матриксы). Можно предположить, что наличие слабо выраженного цитотоксического эффекта связано с наличием остаточных количеств низкомолекулярных соединений, сшивающего агента, фрагментов мономеров и олигомеров, которые могут быть эффективно удалены методом СКФ-экстракции [23]. Мы полагаем, что дальнейшая оптимизация алгоритма scCO_2 -обработки матриксов из производных хитозана позволит полностью устранить их хоть и слабый, но все-таки детектируемый цитотоксический эффект.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование сверхкритического диоксида углерода для структурированных методом лазерной стереолитографии матриксов позволяет улучшить биосовместимость применяемого материала на 1 степень и повысить механические характеристики сформированных конструкторов более чем в 3 раза. Реакционно-способный аллилхитозан в процессе лазерной фотополимеризации образует устойчивые трехмерные сетки, что дает возможность десорбировать токсичный низкомолекулярный компонент без разрушения структуры матрикса. Скаффолды в основной форме демонстрируют более быстрое насыщение молекулами воды по сравнению с матриксами, где хитозан представлен в солевой форме, но при этом материал становится гидрофобным в начальный момент контакта с растворителем. Следовательно, очевидна необходимость разработки подходов, которые позволили бы варьировать адгезивные параметры структур для изменения скорости деградации и параметров цитосовместимости материалов.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 14-25-00055 (в части проведения процессов структурирования гидрогелей, модификации полученных структур в среде scCO_2 , а также оценки их цитотоксичности) и Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 16-02-00248а (в части исследования механических свойств сформированных структур и кинетики их набухания).

Авторы благодарят В.К. Попова за полезное обсуждение результатов, Т.А. Акопову за предоставленный модифицированный хитозан.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Биосовместимые материалы (учебное пособие). Под ред. В.И. Севастьянова и М.П. Кирпичникова. М.: МИА, 2011: 544 с. Biosovmestimye materialy (uchebnoye posobie). Pod red. V.I. Sevast'yanova i M.P. Kirpichnikova. M.: MIA, 2011: 544 s.
2. Kim IY, Seo SJ, Moon HS, Yoo MK, Park IY, Kim BC et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology advances*. 2008; 26 (1): 1–21. doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.07.009.
3. Stella JA, D'Amore A, Wagner WR, Sacks MS. On the biomechanical function of scaffolds for engineering load-bearing soft tissues. *Acta biomaterialia*. 2010; 6 (7): 2365–2381. doi: 10.1016/j.actbio.2010.01.001.
4. Chen G, Ushida T, Tateishi T. Scaffold design for tissue engineering. *Macromolecular Bioscience*. 2002; 2 (2): 67–77. doi: 10.1002/1616-5195(20020201)2:2<67::AID-MABI67>3.0.CO;2-F.
5. Волошин АИ, Шехтер АБ, Попов ВК. Тканевая реакция на акриловые пластмассы, модифицированные сверхкритической экстракцией двуокисью углерода. *Стоматология*. 1998; 4: 4–9. Voloshin AI, Shekter AB, Popov VK. Tkanevaya reakcija na akrilovye plastmassy, modifitsirovannye sverhkriticheskoj jekstrakciej dvoukis'ju ugleroda. *Stomatologija*. 1998; 4: 4–9.
6. Huang GP, Shanmugasundaram S, Masih P, Pandya D, Amara S, Collins G et al. An investigation of common crosslinking agents on the stability of electrospun collagen scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2015; 103 (2): 762–771. doi: 10.1002/jbm.a.35222.
7. Martínez A, Blanco MD, Davidenko N, Cameron RE et al. Tailoring chitosan/collagen scaffolds for tissue engineering: Effect of composition and different crosslinking agents on scaffold properties. *Carbohydrate polymers*. 2015; 132: 606–619. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.06.084.
8. Глыбочко ПВ, Аляев ЮГ, Шехтер АБ, Винаров АЗ, Истратов ЛП, Истратова ЕВ и др. Экспериментальное обоснование создания гибридной матрицы и тканеинженерной конструкции на основе сетки из полигликолида и реконструированного коллагена с целью последующей заместительной уретропластики. *Урология*. 2015; 6: 5–13. Glybochko PV, Alyaev YuG, Shekhter AB, Vinarov AZ, Istranov LP, Istranova EV i dr. Eksperimental'noe obosnovanie sozdaniya gibridnoj matricy i tkaneinzhenernoj konstrukcii na osnove setki iz poliglikolida i rekonstruirovannogo kollagena s cel'yu posleduyushchej zamestitel'noj uretroplastiki. *Urologiya*. 2015; 6: 5–13.
9. Kufelt O, El-Tamer A, Sehring C, Schlie-Wolter S, Chichkov BN. Hyaluronic acid based materials for scaffolding via two-photon polymerization. *Biomacromolecules*. 2014; 15 (2): 650–659. doi: 10.1021/bm401712q.
10. Wang C, Lau TT, Loh WL, Su K, Wang DA. Cytocompatibility study of a natural biomaterial crosslinker – Genipin with therapeutic model cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2011; 97 (1): 58–65. doi: 10.1002/jbm.b.31786.
11. Поляков М, Баграшвили ВН. Сверхкритические среды: растворители для экологически чистой химии. *Журнал Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева*. 1999; 43 (2): 93–99. Poljakov M, Bagratashvili VN. Sverhkriticheskie sredy: rastvoriteli dlja jekologicheskij chistoj himii. *Zhurnal Ros. him. ob-va im. D.I. Mendeleeva*. 1999; 43 (2): 93–99.
12. Zhang J, Davis TA, Matthews MA, Drews MJ, LaBerge M, An YH. Sterilization using high-pressure carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2006; 38 (3): 354–372. doi: 10.1016/j.supflu.2005.05.005.
13. Tayton E, Purcell M, Aarvold A, Smith JO, Kalra S, Briscoe A et al. Supercritical CO₂ fluid-foaming of polymers to increase porosity: A method to improve the mechanical and biocompatibility characteristics for use as a potential alternative to allografts in impaction bone grafting? *Acta biomaterialia*. 2012; 8 (5): 1918–1927. doi: 10.1016/j.actbio.2012.01.024. Epub 2012 Jan 24.
14. Akopova TA, Timashev PS, Demina TS, Bardakova KN, Minaev NV, Burdukovskii VF et al. Solid-state synthesis of unsaturated chitosan derivatives to design 3D structures through two-photon-induced polymerization. *Mendeleev Communications*. 2015; 25 (4): 280–282. doi: 10.1016/j.mencom.2015.07.017.
15. Timashev PS, Demina TS, Minaev NV, Bardakova KN, Koroleva AV, Kufelt OA et al. Fabrication of microstructured materials based on chitosan and its derivatives using two-photon polymerization. *High Energy Chemistry*. 2015; 49 (4): 300–303. doi: 10.1016/j.mencom.2015.07.017.
16. Тимашев ПС, Бардакова КН, Демина ТС, Пудовкина ГИ, Новиков ММ, Марков МА и др. Новый биосовместимый материал на основе модифицированного твердофазным методом хитозана для лазерной стереолитографии. *Современные технологии в медицине*. 2015; 7 (3). doi: 10.7868/S0023119315040178. Timashev PS, Bardakova KN, Demina TS, Pudovkina GI, Novikov MM, Markov MA i dr. Novyj biosovmestimyj material na osnove modifitsirovannogo tverdogfaznym metodom hitozana dlya lazernoj stereolitografii. *Sovremennye tekhnologii v medicine*. 2015; 7 (3).
17. Евсеев АВ, Марков МА, Панченко ВЯ, Якунин ВП. Способ отверждения фотополимеризующейся композиции на основе акрилового олигомера путем иницирования полимеризации в установках радиационного отверждения покрытий. Патент РФ № 2148060. 2000 Апр 27. Evseev AV, Markov MA, Panchenko VYa, Yakunin VP. Sposob otverzheniya fotopolimerizuyushchejsya kompozicii na osnove akrilovogo oligomera putem initsirovaniya polimerizacii v ustanovkah radiacionnogo otverzheniya pokrytij. Patent RF № 2148060. 2000 Apr 27.
18. Timashev PS, Kotova SL, Glagolev NN, Aksenova NA, Solovieva AB, Bagratashvili VN. Cleaning of cantilevers for atomic force microscopy in supercritical carbon di-

- oxide. *Russian Journal of Physical Chemistry B*. 2014; 8 (8): 1081–1086. ISSN 1990–7931.
19. Ernst Breel. Characterizing the micro-mechanical properties of immersed hydrogels by nanoindentation. Technical Report. January 2015. doi: 10.13140/2.1.3580.9606.
 20. Yuehua Yuan, T. Randall Lee. Contact Angle and Wetting Properties. *Surface Science Techniques*. 2013; 51: 3–34.
 21. ГОСТ ISO 10993-5-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*». GOST ISO 10993-5-2011 «Izdeliya medicinskie. Ocenka biologicheskogo dejstviya medicinskih izdelij. Chast' 5. Issledovaniya na citotoksichnost': metody *in vitro*». International Standard ISO 10993. Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity.
 22. Шишацкая ЕИ. Клеточные матриксы из резорбируемых полигидроксиалканоатов. *Гены и клетки*. 2007; 2 (2). Shishackaja EI. Kletochnye matriksy iz rezorbiruemih poligidroksialkanoatov. *Geny i kletki*. 2007; 2 (2).
 23. Popov VK, Evseev AV, Ivanov AL, Roginski VV, Volozhin AI, Howdle SM. Laser stereolithography and supercritical fluid processing for custom-designed implant fabrication. *J. Materials Science: Materials in Medicine*. 2004; 15 (2): 123–128.

Статья поступила в редакцию 21.07.2016 г.
The article was submitted to the journal on 21.07.2016

УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!

Подписку на журнал «Вестник трансплантологии и искусственных органов» можно оформить в ближайшем к вам почтовом отделении.

Подписной индекс нашего издания в каталоге «Газеты и журналы» – **80248**



Ф. СП-1	ВЕСТНИК ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ	80248 (индекс издания)																								
	КОЛИЧЕСТВО КОМПЛЕКТОВ																									
	на 2016 год по месяцам																									
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th>1</th><th>2</th><th>3</th><th>4</th><th>5</th><th>6</th><th>7</th><th>8</th><th>9</th><th>10</th><th>11</th><th>12</th> </tr> <tr> <td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td> </tr> </table>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12															
	Куда _____ (почтовый индекс) _____ (адрес) _____																									
	Кому _____ (фамилия, инициалы) _____																									

Ф. СП-1	ВЕСТНИК ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ	80248 (индекс издания)																								
	КОЛИЧЕСТВО КОМПЛЕКТОВ																									
	на 2016 год по месяцам																									
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th>1</th><th>2</th><th>3</th><th>4</th><th>5</th><th>6</th><th>7</th><th>8</th><th>9</th><th>10</th><th>11</th><th>12</th> </tr> <tr> <td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td> </tr> </table>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12															
	Куда _____ (почтовый индекс) _____ (адрес) _____																									
	Кому _____ (фамилия, инициалы) _____																									