

УДК 544.77.022.823

*И.П. Добровольская<sup>1,2</sup>, Е.Н. Дресвянина<sup>1,2</sup>, А.Н. Юденко<sup>1,2</sup>,  
П.В. Попрядухин<sup>1,2</sup>, Е.М. Иванькова<sup>1,2</sup>, В.Е. Юдин<sup>1,2</sup>*<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный политехнический университет<sup>2</sup> Институт высокомолекулярных соединений РАН

## **СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ОДНОМЕРНЫХ МАТРИЦ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И НАНОФИБРИЛЛ ХИТИНА ДЛЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ**

Волокна из хитозана и композиционные волокна на его основе, полученные коагуляционным методом, характеризуются ориентированной структурой как частиц наполнителя, так и макромолекул полимера. Методами электронной сканирующей микроскопии и рентгеноструктурного анализа показано, что нанофибриллы хитина имеют поперечный размер 20 нм и продольный 600 – 800 нм, в поперечном направлении нанофибрилла хитина состоит из двух кристаллитов размерами 11 – 12 нм. Введение нанофибрилл хитина в количестве 0,1 – 0,3 мас. % приводит к повышению прочности и модуля упругости композиционных волокон. Мезенхимные стволовые клетки хорошо закрепляются и распластаются на поверхности хитозановых волокон. Поверхностная фибриллизация волокон способствует изменению формы стволовых клеток. Полученные композиционные волокна из хитозана могут быть использованы в качестве одномерных матриц для клеточных технологий и тканевой инженерии.

ХИТОЗАН, НАНОФИБРИЛЛЫ ХИТИНА, КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ, КОМПОЗИЦИОННОЕ ВОЛОКНО, ОРИЕНТИРОВАННАЯ СТРУКТУРА, МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, АДГЕЗИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК.

### **Введение**

Одной из актуальных задач современного материаловедения является разработка материалов для медицины и биологии, в частности биорезорбируемых полимерных матриц для клеточных технологий и трансплантологии. Такие материалы должны обладать биосовместимостью, биорезорбцией, отсутствием цитотоксичности как самих полимеров, так и продуктов их разложения. Для резорбируемых матриц используют полигликолиды, полилактиды, полилактоны, полисахариды и другие природные и синтетические полимеры. Каждый из них обладает как преимуществами, так и недостатками. В частности, при синтезе и переработке полигидроксиалканоатов использу-

ются дихлорметан и гексан, следы которых в готовых матрицах могут препятствовать культивации клеток [1, 2].

В последнее время в качестве матриц используют пленки, волокна и пористые блочные материалы на основе природного биорезорбируемого полисахарида – хитина [3 – 8]. При переработке этого полимера используется органический растворитель – ДМАА, содержащий хлорид лития, ионы которого трудно выводятся из полимера, что снижает биосовместимость материала и повышает его цитотоксичность.

К наиболее перспективным полимерам, которые обладают комплексом необходимых свойств, а именно отсутствием цитотоксичности, биodeградируемостью,



экологичностью переработки, удовлетворительными прочностными и деформационными характеристиками, относится хитозан [3, 4, 7, 9, 10]. Однако ввиду высокой гидрофильности, свойства материалов из этого полимера нестабильны: во влажном состоянии происходит снижение их прочностных и упругих характеристик. Для повышения прочности волокон в хитозановую матрицу вводили гидросиликатные нанотрубки [12]. Исследование структуры и свойств композиционных волокон показало, что введение нанотрубок хризотила в количестве 1 – 3 масс. % повышает прочность и модуль упругости волокон, способствует формированию ориентированной структуры. Однако наночастицы хризотила не подвержены разложению под действием активных биологических сред, они могут сохраняться в живом организме в течение длительного времени.

Поэтому актуальной задачей разработки резорбируемых одномерных матриц для клеточных технологий является получение композиционных волокон, характеризующихся биорезорбцией как матрицы, так и наполнителя. Введение в хитозановую матрицу наночастиц хитина позволит получить резорбируемые композиционные волокна с повышенными прочностными и упругими характеристиками.

### Материалы и оборудование

Для получения композиционных волокон использовали хитозан (Fluka Chemie, BioChemika line) с  $MW = 255$  кДа, степенью деацетилирования 80 %, зольностью 0,5%, а также наночастицы хитина (Mavi Sud s.r.l, Италия).

Диспергирование наночастиц хитина в воде проводили ультразвуковой обработкой в течение 30 мин. Для получения смеси раствора хитозана с наночастицами хитина, в водную дисперсию, содержащую наночастицы хитина, добавляли хитозан в количестве, необходимом для получения 4 масс. % раствора, а хитина – 0,05 – 20 масс. %, по отношению к хитозану. Подготовленную дисперсию с  $pH = 4 - 5$  перемешивали в течение 30 мин до набухания и частичного растворения хитозана. После этого в смесь

вводили раствор уксусной кислоты (при постоянном перемешивании), доводя концентрацию кислоты в растворителе до 2 %. Смесь раствора хитозана с наночастицами хитина перемешивали 90 мин, после чего фильтровали, а затем обезвоздушивали в течение 24 ч при давлении 0,1 атм.

Волокна формировали коагуляционным методом на лабораторной установке ИВС РАН. Осадителем являлась смесь 10%-го раствора NaOH и  $C_2H_5OH$  в соотношении 1 : 1. Формование моноволокон проводили через фильеру диаметром 0,6 мм; при этом скорость течения раствора из фильеры составляла 0,1 мм/с, время осаждения – 150 с; степень фильерной вытяжки  $\lambda$  варьировалась от –40 до 100 %. Волокно промывали в дистиллированной воде, затем сушили при температуре 50 °С.

Реологические исследования проводились на реометре Physica MCR 301 (Anton Paar) при 20 °С по методу «цилиндр в цилиндре», в режиме сдвигового течения при скоростях сдвига 1 – 4000  $s^{-1}$ . Для измерений в кювету помещали 5 мл раствора; зависимости вязкости от скорости сдвига измеряли в режиме увеличения частоты вращения цилиндров.

Для исследования надмолекулярной структуры композиционных волокон использовали методы сканирующей электронной микроскопии и рентгеновской дифракции. Измерения проводили на микроскопе Supra-55 VP (Carl Zeiss) и на рентгеновском дифрактометре Bruker D2 Phaser. Диспергирование частиц хитина выполняли на ультразвуковом диспергаторе УЗВ-1.3 (Россия) при частоте 40 кГц. Измерения механических свойств проводили на установке УМИВ (Россия); база испытания составляла 15 мм, скорость нагружения – 1 мм/мин. Перед испытаниями волокна выдерживались при относительной влажности 66 % не менее 24 ч.

### Результаты и их обсуждение

Важная задача при получении композиционных материалов на основе полимерной матрицы и наполнителей из наночастиц различной формы состоит в равномерном распределении частиц по объему компози-

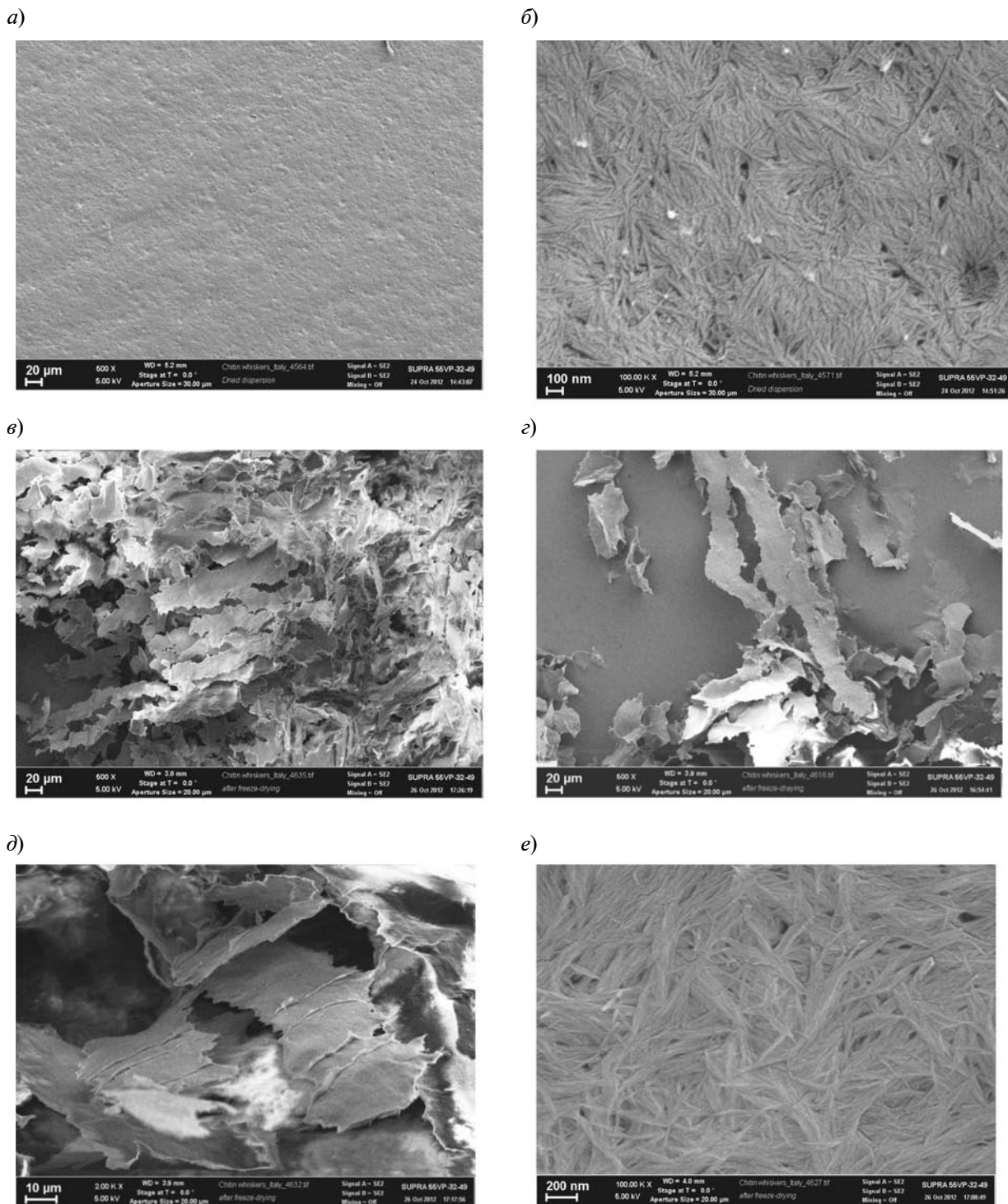


Рис. 1. Электронные микрофотографии пленки из нановолокон хитина (а, б) и порошка, полученного лиофилизацией водной дисперсии (в – е). Изображения имеют разный масштаб; для наглядности представлены в одинаковом масштабе микрофотографии изолированной микрочастицы (е) и множества микрочастиц (в)

та. Степень диспергирования наночастиц зависит от характера взаимодействия полимера и наполнителя, что в свою очередь определяется особенностями их химического строения, а также надмолекулярной структурой. Поэтому особое внимание в работе уделено исследованию структуры наночастиц хитина.

**Структура наночастиц хитина.** Хитин – азотсодержащий полисахарид, содержит боковую группу –NH–CO–CH<sub>3</sub> [14]. Для его кристаллической структуры характерен полиморфизм – существование двух кристаллических модификаций, в которых макромолекулы расположены антипараллельно ( $\alpha$ -хитин) или параллельно ( $\beta$ -хитин). В одном живом организме могут существовать обе модификации, выполняющие различные функции.

Исследование структуры наночастиц хитина проводили на двух видах образцов: пленках и порошках. Пленки получали сушкой при 20 °С водной дисперсии, содержащей 31,9 мг/мл наночастиц хитина. Микрофотографии поверхности пленки из хитина, толщиной 100 мкм приведены на рис. 1, а, б. Для этой пленки характерно наличие гладкой ровной поверхности; при

большем увеличении отчетливо видны протяженные частицы – наночастицы, имеющие поперечный размер 15 – 20 нм.

Второй способ получения частиц хитина заключался в лиофилизации исходной суспензии хитина; в результате получали порошок из микрочастиц (рис. 1, в – е), состоящих из наночастиц хитина. Видно, что микрочастицы имеют ленточное строение с поперечным размером около 30 мкм и толщиной 0,1 мкм (рис. 1, д). Они состоят из наночастиц шириной 20 нм и длиной 600 – 800 нм, что совпадает с данными, полученными для пленочных образцов (рис. 1, е). Отметим, что частицы хитина имеют склонность к образованию плоских слоев элементов структуры как на микро-, так и нано- уровнях.

Строение наночастиц хитина исследовалось с помощью метода рентгеновской дифракции. Рентгенограмма порошка хитина приведена на рис. 2. Интенсивные дифракционные максимумы свидетельствуют о наличии кристаллической структуры  $\alpha$ -хитина. Параметры кристаллической ячейки:  $a = 0,473$  нм,  $b = 1,899$  нм,  $c = 1,025$  нм; они совпадают с данными работы [13]. Отметим, что поперечный раз-

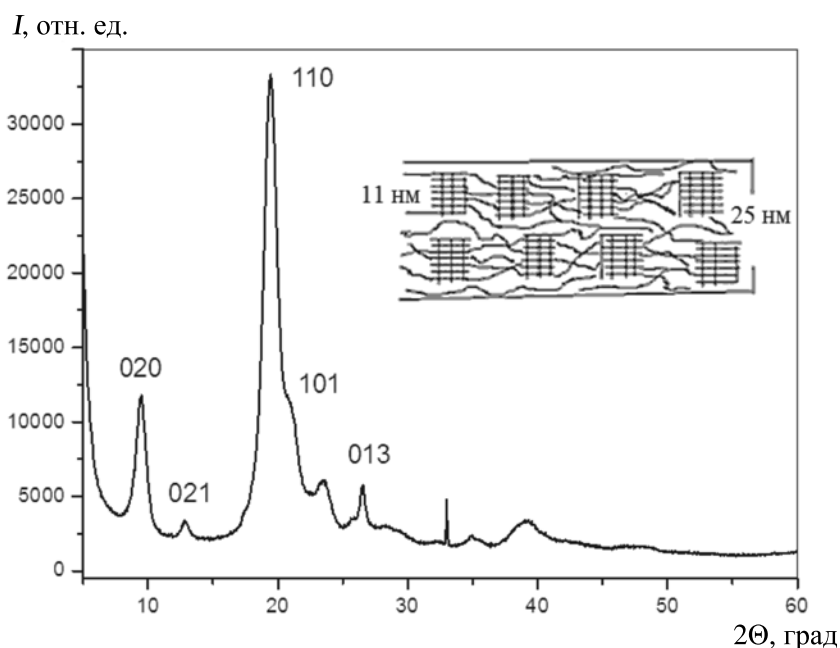


Рис. 2. Рентгенодифрактограмма порошка из наночастиц хитина. На вставке показана схема строения наночастицы хитина

мер кристаллической ячейки  $b$  существенно больше размера  $a$ , что, видимо, обусловлено наличием в макромолекуле боковой группы  $-NH-CO-CH_3$ . Макромолекулы в ячейке этой кристаллической модификации хитина располагаются антипараллельно друг другу. Средний размер  $L$  кристаллической области, определенный по величине интегральной интенсивности дифракционных максимумов, составляет 12,5 нм. Оценка размера кристаллита в направлении  $b$ -оси по методу Шеррера для рефлекса (020) дала значение  $L = 11,1$  нм. Оценить размер кристаллитов в направлении оси  $c$ , т. е. в направлении осей макромолекул, не представилось возможным, ввиду отсутствия четкого рефлекса (002) или его более высоких порядков; такое отсутствие свидетельствует о существенно меньшем размере кристаллитов в направлении осей макромолекул, об их большей дефектности. На основе полученных данных можно сделать вывод о большей упорядоченности наночастиц хитина в поперечном направлении, чем в продольном.

Сопоставление данных рентгеноструктурного анализа с результатами электронно-микроскопических исследований позволяет заключить, что в поперечном направлении

наночастица состоит из двух кристаллитов с поперечными размерами 11 – 12 нм,  $b$ -оси которых расположены перпендикулярно оси наночастицы.

Особенностью кристаллической структуры наночастиц хитина является существенно больший размер кристаллитов в поперечном направлении, чем в продольном. Для целлюлозы и ее производных в ориентированном состоянии, а также для ряда других полисахаридов продольный размер кристаллитов обычно больше поперечного и составляет около 7 нм [14].

**Реологические свойства растворов хитозана и их смесей с наночастицами хитина.** Наночастицы хитина были использованы в качестве наполнителя для получения резорбируемых композиционных волокон. Для оптимизации режима формирования волокон необходимы сведения о реологических свойствах раствора хитозана и его смесей с наполнителем. На рис. 3 приведены зависимости вязкости от скорости сдвига для раствора хитозана и его смесей с наночастицами хитина.

Данные реологических измерений позволяют заключить, что зависимость вязкости от скорости сдвига для всех исследуемых растворов носит нелинейный характер.

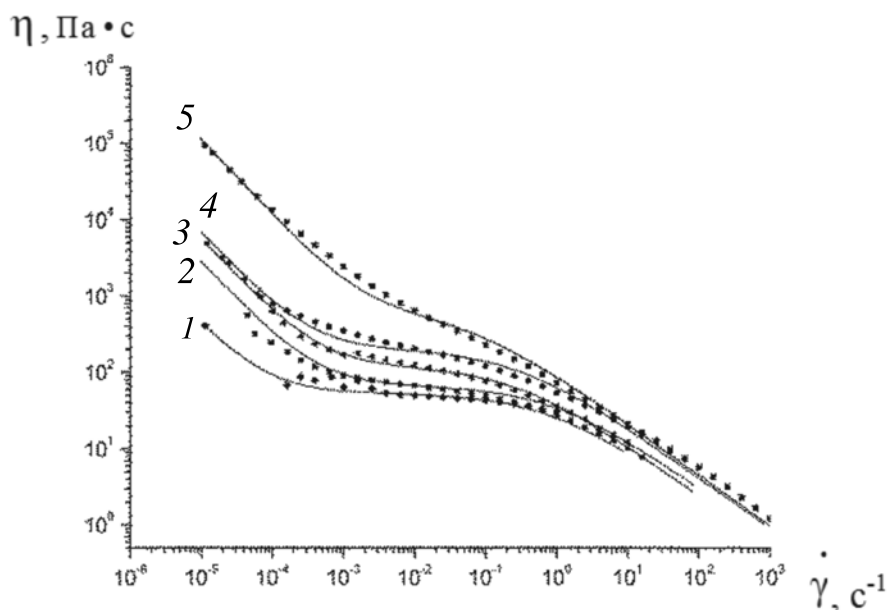


Рис. 3. Зависимости вязкости от скорости сдвига для раствора хитозана (1) и смесей с различным содержанием наночастиц хитина, мас. % : 1,0 (2), 7 (3), 10 (4), 20 (5)

Для раствора, не содержащего наполнителя (кривая 1 на рис. 3), значимое уменьшение вязкости наблюдалось при скорости сдвига более  $10 \text{ с}^{-1}$ . Вязкость раствора хитозана увеличивалась с ростом содержания нанофибрилл хитина; особенно это заметно при содержании наполнителя более 1 мас. % (кривые 3–5 на рис. 3). С увеличением содержания нанофибрилл хитина пороговое значение скорости деформации смещается в сторону меньших значений  $\dot{\gamma}$ . Для смеси, содержащей 20 мас.% наполнителя, зависимость  $\eta(\dot{\gamma})$  приближается к линейной в широком диапазоне скоростей сдвига. Снижение вязкости при увеличении сдвиговых напряжений связано с разрушением исходной структуры раствора и созданием новой, переходом из изотропного состояния в анизотропное. Формирование анизотропной структуры раствора под действием сдвигового поля характерно для большинства жесткоцепных полимеров [15].

Повышение содержания наполнителя в растворе хитозана сопровождается ростом вязкости и напряжения сдвига, что особенно заметно при низких скоростях сдвига. Это свидетельствует о хорошем взаимодействии частиц хитина с макромолекулами хитозана, высокой адгезии наполнителя и матрицы, а также об образовании кластерной структуры наполнителя.

Низкое содержание наполнителя в растворе (менее 1 мас.%) мало влияет на реологические свойства раствора хитозана.

**Структура и свойства композиционных волокон.** В работах [11, 12] показано, что ориентированная структура волокон из хитозана формируется на стадии прохождения раствора или его смеси с наночастицами через фильеру; ориентация частиц наполнителя и макромолекул полимера зависят от скорости сдвига, возникающей в фильере.

Режим формования волокна подбирался в соответствии с уравнением [11]:

$$\dot{\gamma} = \frac{2Q}{\pi R^3},$$

где  $Q$  – скорость подачи полимера,  $R$  – радиус фильеры.

Значения величин  $Q$  и  $R$  позволяют по-

лучать скорости сдвига, которые обеспечивают структурирование раствора при прохождении его через фильеру.

Как показали эксперименты, растворы хитозана, содержащие нанофибриллы хитина, обладают необходимыми динамическими свойствами, которые позволяют сохранять ламинарность струи в осадителе после прохождения раствора через фильеру. Формование волокон из хитозана и композиционных волокон, содержащих нанофибриллы хитина, проводили коагуляционным методом.

Из результатов электронно-микроскопических исследований (рис. 4) следует, что волокна на основе хитозана обладают гладкой поверхностью и гомогенной внутренней структурой. Особенностью фибриллярного строения волокна, содержащего наночастицы хитина, является наличие плоских микрофибрилл – слоистых структур, которые отчетливо видны на сколе композиционного волокна в жидком азоте (см. рис. 4, з). Плоские микрофибриллы включают нанофибриллы хитина, которые ориентированы вдоль оси волокна и имеют поперечные размеры 25 – 30 нм. Эта величина немного больше размера, определенного для лиофилизата суспензии нанофибрилл хитина (20 нм), что свидетельствует о хорошей адгезии частиц хитина к хитозановой матрице. Хорошая адгезия обусловлена тем, что макромолекула хитозана содержит боковые группы как  $-\text{NH}_2$ , так и  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ ; последние характерны для макромолекулы хитина.

На рис. 5 приведена фоторентгенограмма волокна из хитозана, полученного в равновесных условиях, когда в процессе формования на него не действовали растягивающие напряжения; волокно имело усадку (отрицательная вытяжка  $\lambda = -40 \%$ ). Распределение интенсивности дифракционного максимума, соответствующего рефлексам [200] и [220] хитозана, имеющее вид кольца, свидетельствует о слабо ориентированной, практически изотропной, структуре волокна. Вытяжка волокна на 60 % при его формовании приводит к ориентации кристаллитов. На рентгенограмме это проявляется в стягивании дифракционного мак-

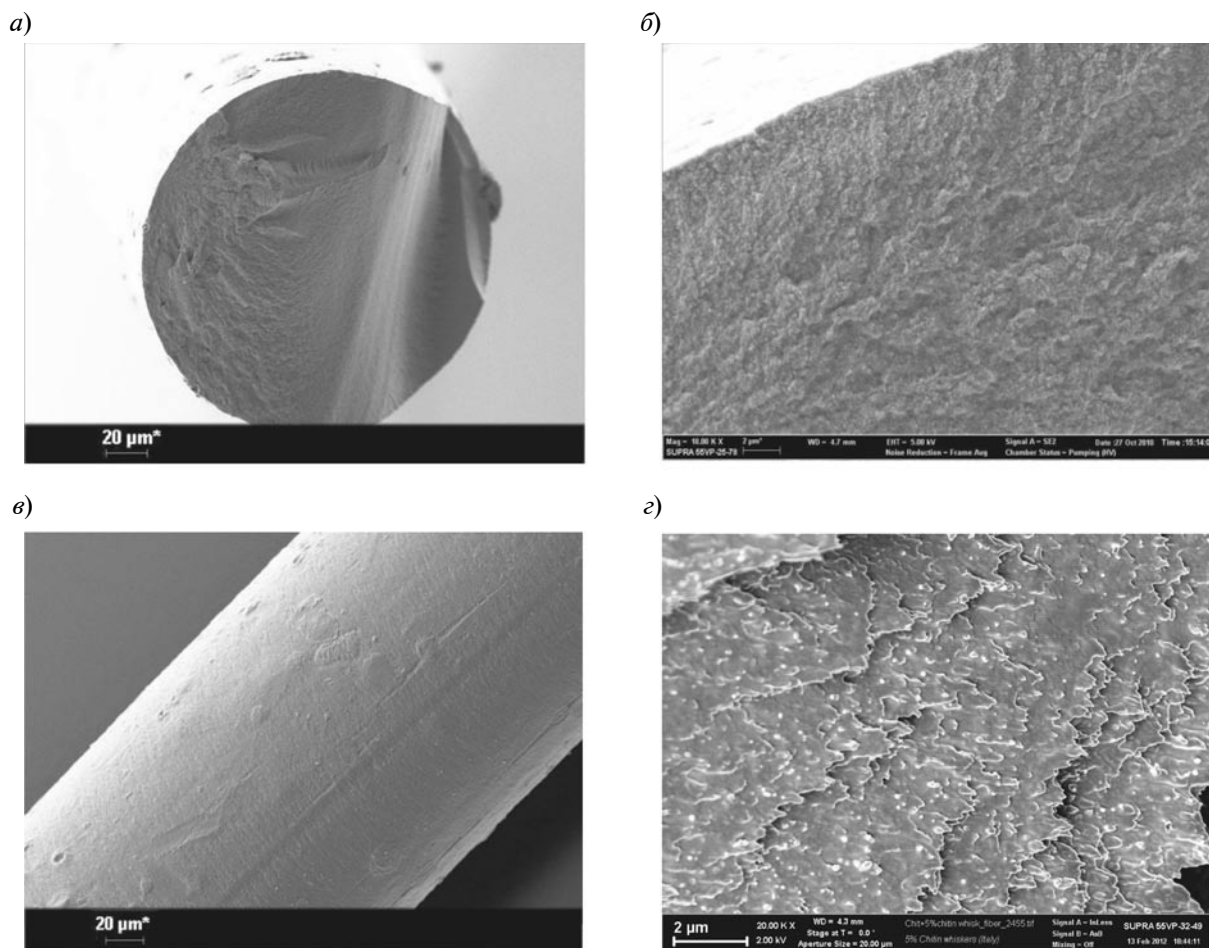


Рис. 4. Микрофотографии волокна из хитозана (*а*, *б*) и композиционного волокна (*в*, *г*), содержащего 1 мас. % наночитина

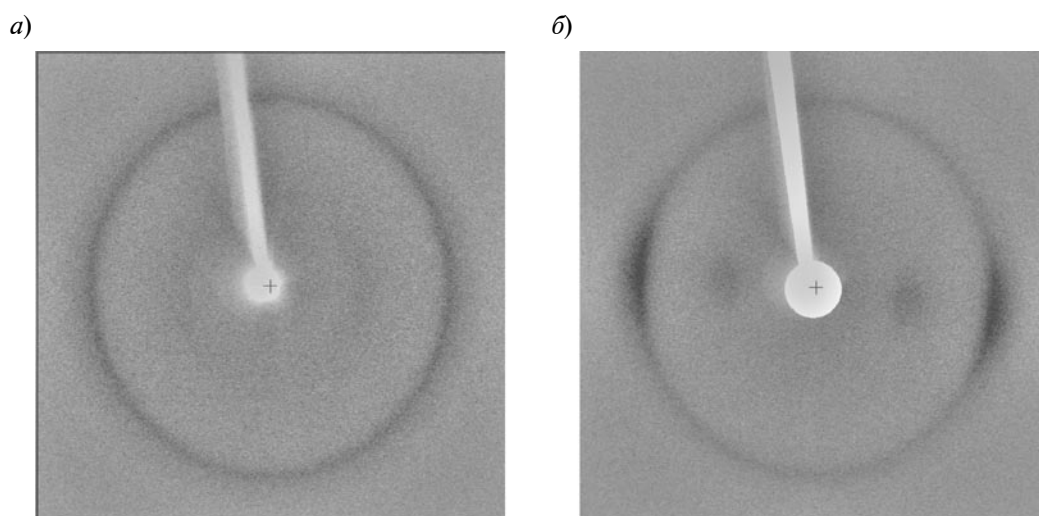


Рис. 5. Фоторентгенограммы волокон из хитозана для различных значений  $\lambda$ , %: -40 (*а*) и 60 (*б*)

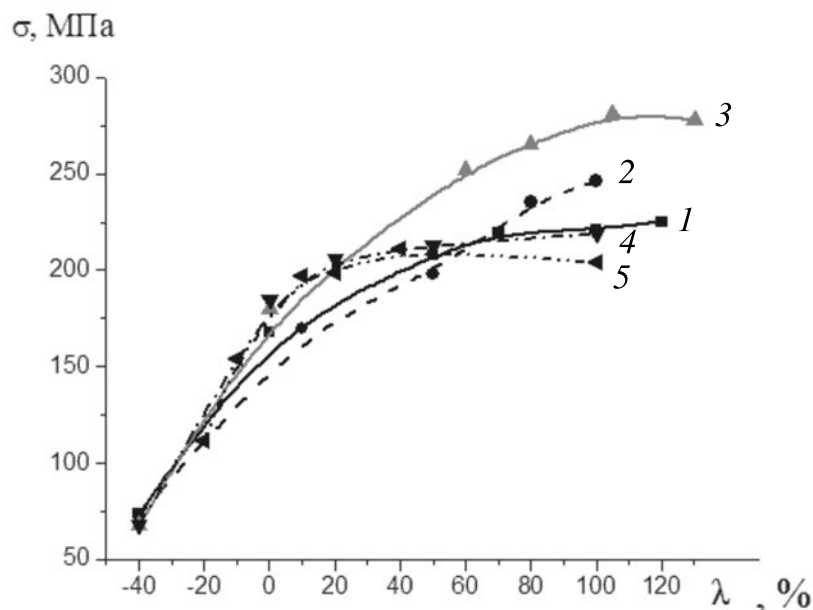


Рис. 6. Зависимости прочности хитозановых (1) и композиционных (2 – 5) волокон с различным содержанием наночастиц хитина, % : 0 (1), 0,05 (2), 0,10 (3), 1,0 (4) и 20 (5), от величины ориентационной вытяжки

симума к экватору. Следует отметить, что распределение интенсивности в виде дуги наблюдается для большинства исследованных волокон из хитозана и композиционных волокон, содержащих наночастицы хитина. Даже небольшая вытяжка приводит к ориентации кристаллитов хитозана.

На рис. 6 приведены зависимости прочности хитозановых и композиционных волокон от степени вытяжки. Видно, что прочность хитозановых волокон, не содержащих наполнителя, возрастает с увеличением вытяжки до  $\lambda \approx 20$  %. Дальнейшая вытяжка при формировании мало влияет на упрочнение волокон.

Прочность композиционных волокон, содержащих малое количество наполнителя (0,05 – 0,30 масс.%), монотонно увеличивается при вытяжке вплоть до  $\lambda = 100 - 120$  %. Увеличение содержания наночастиц хитина в волокне до значений более 1 мас.% существенно изменяет характер зависимости  $\sigma(\lambda)$ ; рост прочности прекращается при  $\lambda \approx 20$  %.

Увеличение прочности волокон обусловлено изменением их надмолекулярной структуры, ориентацией макромолекул.

Ориентацию кристаллитов хитозана в процессе формирования волокон оценивали по полуширине  $\alpha$  азимутального распределения интенсивности дифракционного максимума [200]. Из данных, приведенных в таблице, следует, что даже небольшая вытяжка приводит к ориентации кристаллитов.

Величина  $\alpha$  зависит от содержания наночастиц хитина в композиционном волокне. Малое количество наполнителя способствует ориентационной вытяжке волокон, предельная ориентация кристаллитов наблюдается уже при значении  $\lambda \approx 60$  %. Дальнейшее увеличение степени вытяжки не способствует ориентации кристаллитов. Вместе с тем, увеличивается прочность и модуль упругости волокон. Это можно объяснить ориентацией макромолекул в межкристаллитных областях фибрилл хитозана.

Композиционные волокна, полученные в равновесных условиях, обладают большей ориентацией кристаллитов, чем аналогичные волокна, не содержащие наполнителя. Введение наночастиц в количестве 1 мас.% позволяет получить ориентирован-



Таблица

**Величина азимутального распределения интенсивности рефлексов [200] хитозана для волокон, полученных с различной ориентационной вытяжкой**

Содержание хитина, мас. %	$\lambda$ , %	$\alpha$ , град
0	-40	90,6
	0	29,5
	30	31,2
	60	29,4
0,1	-40	57,3
	0	29,1
	23	27,6
	90	29,5
1,0	-40	62,4
	0	28,8
	66	30,0
	90	30,6
	180	28,3
20	20	32,7

Обозначения:  $\lambda$  – степень ориентационной вытяжки,  $\alpha$  – полуширина азимутального распределения интенсивности дифракционного максимума [200]

ную структуру без вытяжки волокна при его формировании. Это позволяет предположить, что наличие анизодиаметричных наночастиц (нанофибрилл хитина) способствует ориентации макромолекул хитозана. Как видно из электронной микрофотографии скола в жидком азоте композиционного волокна (см. рис. 4, з), частицы наполнителя хорошо ориентированы вдоль оси волокна. Этому способствуют сдвиговые напряжения, возникающие при прохождении через фильеру раствора хитозана, содержащего наофибриллы хитина.

Ориентация частиц наполнителя, их хорошее взаимодействие с хитозановой матрицей повышает прочностные и упругие характеристики композиционных волокон, содержащих наофибриллы хитина. На рис. 7 приведены зависимости прочности и модуля упругости волокон от содержания наофибрилл хитина.

Расчет величины перкаляционного барьера по методу, приведенному в рабо-

те [16], для частиц с осевым отношением  $l = 25$ , соответствующим геометрическим размерам наофибрилл хитина, дал значение 1 мас. %; при содержании частиц наполнителя менее 1,0 мас.% образование кластерной структуры невозможно.

Процесс ориентационной вытяжки композиционных волокон с малым (до 1 мас.%) содержанием наполнителя можно описать следующей схемой. При взаимодействии молекулы хитозана с уксусной кислотой (растворителем) происходит протонирование группы  $-NH_2$  с образованием соли – ацетата хитозана. В растворе частицы наполнителя располагаются хаотично, преимущественная ориентация отсутствует. Между наночастицами хитина существует достаточно большой объем, в котором находятся макромолекулы ацетата хитозана и уксусной кислоты. Попадая в поле сдвиговых напряжений при прохождении через фильеру, как частицы наполнителя, так и макромолекулы ацетата хитозана ориентируются.

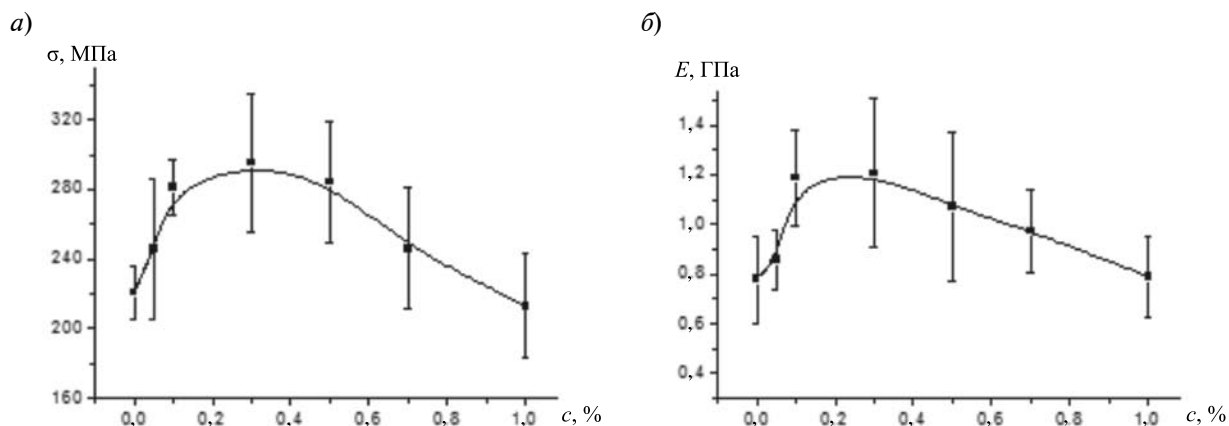


Рис. 7. Зависимости прочности (а) и модуля упругости (б) композиционных волокон на основе хитозана от содержания наночастиц хитина

Ввиду хорошей адгезии, макромолекулы ацетата хитозана, находящиеся в приповерхностном слое хитина, приобретают дополнительную ориентацию. В процессе вытяжки в осадительной ванне происходит ориентация макромолекул ацетата хитозана, что приводит к образованию ориентированной кристаллической структуры. Дальнейшее увеличение вытяжки при формировании композиционных волокон способствует ориентации макромолекул в межкристаллитных аморфных областях внутри фибрилл хитозана. После прохождения раствора через фильеру, контакта струи с осадителем (спирто-щелочной смесью) происходит переход полимера из солевой

формы в основную. Наличие сдвиговых напряжений в фильере и вытяжка волокна после его осаждения способствуют формированию ориентированной структуры как макромолекул полимера, так и наночастиц наполнителя. Схема формирования ориентированной структуры композиционных волокон на основе хитозана и наночастиц хитина представлена на рис. 8.

Предлагаемая схема позволяет объяснить немонотонный характер зависимости прочности и модуля упругости от содержания наночастиц. Оптимальное содержание наполнителя 0,1 – 0,3 мас. % обеспечивает, с одной стороны, дополнительную ориентацию молекул хитозана на поверхности

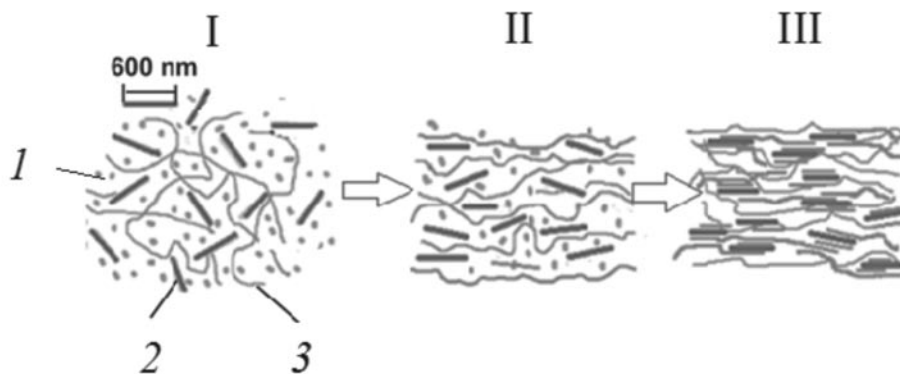


Рис. 8. Схема формирования ориентированной структуры композиционных волокон на основе хитозана и наночастиц хитина: I – раствор хитозана, II – смесь после ее прохождения через фильеру, III – композиционное волокно; 1 – растворитель, 2 – наночастицы хитина, 3 – ацетат хитозана

нанофибрилл хитина, с другой, — достаточную подвижность макромолекул полимера, необходимую для их ориентации в процессе вытяжки. При содержании нанофибрилл хитина свыше 1 мас.% происходит образование жесткой сетки из частиц наполнителя (кластерной структуры), которая препятствует ориентации макромолекул хитозана. Этим можно объяснить снижение прочности и модуля упругости волокон, содержащих более 1 мас.% наночастиц хитина.

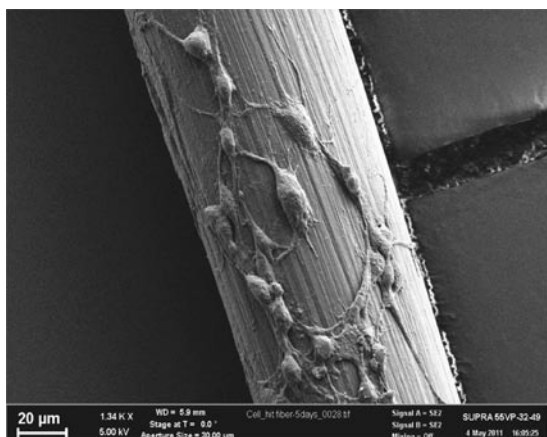
**Адгезия мезенхимных стволовых клеток.** Одним из основных критериев использования материала в качестве матриц для клеточных технологий является адгезия стволовых или соматических клеток на его поверхности. Адгезия зависит от химического строения матрицы, структуры ее поверхности, в частности от наличия неоднородностей, соизмеримых с размерами клеток, пористости, наличия следов растворителя и других примесей, повышающих цитотоксичность.

Для исследования совместимости клеток с волокнами из хитозана были использованы культуры мезенхимных стволовых клеток жировой ткани (ASCs). Белая жировая ткань крысы, полученная методом липэктомии, была подвергнута гомогенизации, ферментативной обработке 0,2 %-м раствором коллагеназы (Sigma, США) и центрифугированию. Клетки культивировали в питательной среде MEM Alpha Modification (Gibco, США) с добавлением 15 %-й фе-

тальной сыворотки телят (Gibco, США) и антибиотиков (100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco, США)). Культивирование стволовых клеток проводили в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в атмосфере повышенной влажности (70 %), при температуре 37 °С, содержание углекислого газа составляло 5 – 7 %; при достижении 80 %-го монослоя производили пересев клеток в свободные пластиковые флаконы.

Осаждение стволовых клеток на хитозановую матрицу проводили из жидкой питательной среды, содержащей мезенхимные стволовые клетки. Для исследования адгезии клеток на поверхности волокон методом сканирующей электронной микроскопии была проведена процедура фиксации клеток на поверхности волокон. По истечении 72 ч с момента посева клеток образцы промывали 0,1 М PBS (натрий-фосфатный буфер, pH = 7,4), после чего фиксировали в течение 40 мин 0,25 %-м раствором глutarового альдегида в PBS при температуре 4 °С. После удаления фиксирующего раствора образцы промывали PBS, затем проводили дегидратацию материала восходящими концентрациями спиртов и сушили при 20° С. Далее образцы помещали на предметные столики и напыляли на них золото. Изучение объектов проводили на сканирующем электронном микроскопе Supra 55VP (Carl Zeiss) в режиме регистрации вторичных электронов при ускоряю-

а)



б)

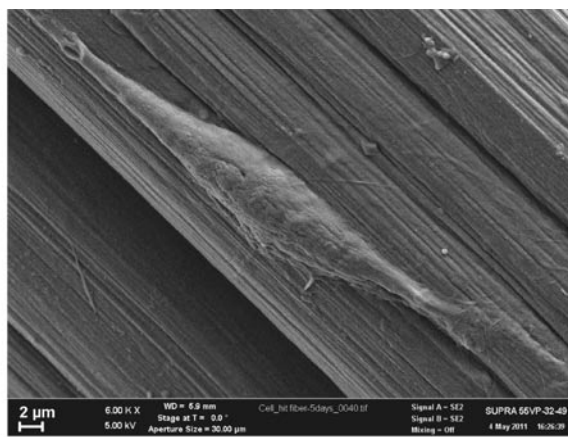


Рис. 9. Микрофотографии поверхности волокон из хитозана, полученных с различной степенью вытяжки  $\lambda$ , %: 20 (а) и 100 (б), после культивации мезенхимных стволовых клеток в течение 3 сут

щем напряжении 20 кВ.

На рис. 9 приведены микрофотографии волокон из хитозана после культивации на них стволовых клеток. Видно, что поверхность волокон содержит стволовые клетки, они хорошо закреплены и распластаны. Поверхность волокна, полученного с высокой вытяжкой ( $\lambda = 100\%$ ), характеризуется фибриллярной структурой поверхности (рис. 9, б), содержит неоднородности в виде каналов, расположенных вдоль волокна. Клетки на такой поверхности имеют вытянутую форму.

Влияние рельефа поверхности матрицы на форму фибробластов исследовано в работах [17, 18], где установлено, что изменение формы стволовых клеток есть один из факторов их направленной дифференциации.

### Заключение

Получены композиционные волокна на основе хитозана и нанофибрилл хитина. Показано, что зависимость вязкости

растворов хитозана от скорости сдвига обусловлена ориентацией макромолекул полимера и наночастиц наполнителя. Введение нанофибрилл хитина в количестве 0,1 – 0,3 мас.% от массы хитозана способствует ориентации макромолекул полимера, что приводит к повышению прочности и модуля упругости волокон.

Установлено, что мезенхимные стволовые клетки хорошо закрепляются и распластаются на поверхности хитозановых волокон. Фибриллизация волокон, полученных с высокой вытяжкой, приводит к появлению продольных каналов на их поверхности, что способствует изменению формы стволовых клеток.

Таким образом, волокна на основе хитозана, согласно полученным результатам, могут быть использованы в качестве одномерных матриц для клеточных технологий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 14-33-00003.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Langer R., Tirrell D.A. Designing materials for biology and medicine // *Nature*. 2004. Vol. 428, pp. 487-492.
2. Dhandayuthapani B., Yoshida Ya., Maekawa T., Kumar D.S. Polymeric scaffolds in tissue engineering application // *International Journal of Polymer Science*. 2011. Vol. 61, pp. 475-480.
3. Rathke T.D., Hudson S.M. Review of chitin and chitosan as fiber and film formers // *Journal Macromol. Sci.* 1994. Vol. 34, pp. 375-437.
4. Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications // *Prog. Polym. Sci.* 2006. Vol. 31, pp. 603-632.
5. Pillai C.K.S., Paul W., Sharma C.P. Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation // *Prog. Polym. Sci.* 2009. Vol. 34, pp. 641-678.
6. Sriupayo J., Supaphol P., Rujiravanit R. Preparation and characterization of  $\alpha$ -chitin whisker-reinforced chitosan nanocomposite films with or without heat treatment // *Carbohydr. Polym.* 2005. Vol. 62, pp. 130-136.
7. Muzzarelli R.A.A. Chitin and its derivatives: new trends of applied research // *Carbohydrate Polymers*. 1983. Vol. 3. No. pp. 4, 53-75.
8. Panarin E.F., Nud'ga L.A., Petrova V.A., Bochek A.M. Composite chitin and chitosan based matrices for culturing human dermal cells // *Cell Transplant and Tissue Ing.* 2009. Vol. 4, pp. 42-46.
9. Вихорева Г.А., Гольбрайх Л.С. Пленки и волокна на основе хитина и его производных // *Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение.* М., Наука. 2002. С. 254–278.
10. Агеев Е.П., Вихорева Г.А., Зоткин М.А., Матушкина Н.Н., Герасимов В.И., Зезин С.Б., Оболонкова Е.С. Структура и транспортные свойства хитозановых пленок, модифицированных термообработкой // *Высокомолек. соед.* 2004. Т. 46. № 312. С. 2035–2041.
11. Dresvyanina E.N., Dobrovolskaya I.P., Popryadukhin P.V., Yudin V.E., Ivan'kova E.M. Influence of spinning conditions on properties of chitosan fibers // *Fiber Chemistry*. 2012. Vol. 44, pp. 260-263.
12. Dobrovol'skaya I.P., Popryadukhin P.V., Khomenko A.Yu., Dresvyanina E.N., Yudin V.E., Elokhoyskii V. Yu., Chvalun S.N. Structure and characteristics of chitosan based fibers containing chrysotile and halloysite // *Polym. Sci. Ser. A*. 2011. Vol. 53, pp. 418-423.
13. Sikorski P., Hori R., Wada M. Revisit of  $\alpha$ -chitin crystal structure using high resolution X-ray diffraction data // *Biomacromolecules*. 2009. Vol. 10, pp. 1100-1105.
14. Dobrovolskaya I.P., Slutsker L.I., Chereisky

Z.Yu., Utevsky L.E. Changing the structure of rayon fibers during pyrolysis // Polymer Science USSR. Ser. A. 1975. Vol. 17, pp. 1555-1559.

15. Baird D.G. Viscometry of anisotropic solutions of poly-p-phenyleneterephthalamide in sulfuric acid // Journal of Applied Polymer Science. 1978. Vol. 22, pp. 2701-2706.

16. Garboczi E., Snyder K., Douglas J., Thorpe M. Geometrical percolation threshold of overlapping

ellipsoids // Phys. Rev. 1995. Vol. 52, pp. 819-828.

17. Barbucci R., Pasqui D., Wirsén A., Affrossman S., Curtis A., Tetta C. Micro and nano-structured surfaces // Journal of Mater. Sci. Mat. in Med. 2003. Vol. 14, pp. 721-725.

18. Lim J.Y., Donahue H. Cell sensing and response to micro- and nanostructured surfaces produced by chemical and topographic patterning // J. Tiss. Eng. 2007, Vol. 13, pp. 1879-1891.

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**ДОБРОВОЛЬСКАЯ Ирина Петровна** – доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории полимерных материалов для тканевой инженерии и трансплантологии Санкт-Петербургского государственного политехнического университета; ведущий научный сотрудник лаборатории механики полимеров и композиционных материалов Института высокомолекулярных соединений РАН.

199004, Россия, г. Санкт-Петербург, Большой пр. В.О., 31  
dobrov@hq.macro.ru

**ДРЕСВЯНИНА Елена Николаевна** – научный сотрудник лаборатории полимерных материалов для тканевой инженерии и трансплантологии Санкт-Петербургского государственного политехнического университета; научный сотрудник лаборатории механики полимеров и композиционных материалов Института высокомолекулярных соединений РАН.

199004, Россия, г. Санкт-Петербург, Большой пр. В.О., 31  
elenadresvyanina@gmail.com

**ЮДЕНКО Александра Николаевна** – студентка ИФНиТ Санкт-Петербургского государственного политехнического университета; инженер-исследователь лаборатории механики полимеров и композиционных материалов Института высокомолекулярных соединений РАН.

195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29  
ansa2@mail.ru

**ПОПРЯДУХИН Павел Васильевич** – кандидат технических наук, научный сотрудник лаборатории полимерных материалов для тканевой инженерии и трансплантологии Санкт-Петербургского государственного политехнического университета; научный сотрудник лаборатории механики полимеров и композиционных материалов Института высокомолекулярных соединений РАН.

199004, Россия, г. Санкт-Петербург, Большой пр. В.О., 31  
pavel-pn@mail.ru

**ИВАНЬКОВА Елена Михайловна** – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории полимерных материалов для тканевой инженерии и трансплантологии Санкт-Петербургского государственного политехнического университета; старший научный сотрудник лаборатории механики полимеров и композиционных материалов Института высокомолекулярных соединений РАН.

199004, Россия, г. Санкт-Петербург, Большой пр. В.О., 31  
ivelen@mail.ru

**ЮДИН Владимир Евгеньевич** – доктор физико-математических наук, профессор кафедры медицинской физики Санкт-Петербургского государственного политехнического университета; заведующий лабораторией механики полимеров и композиционных материалов Института высокомолекулярных соединений РАН.

199004, Россия, г. Санкт-Петербург, Большой пр. В.О., 31  
yudin@hq.macro.ru

*Dobrovolskaya I.P., Dresvyanina E.N., Yudenko A.N., Popryadukhin P.V., Ivankova E.M., Yudin V.E.* THE STRUCTURE AND PROPERTIES OF ONE-DIMENSIONAL COMPOSITE MATRIX BASED ON CHITOSAN AND CHITIN NANOFIBRILS AND INTENDED FOR CELL TECHNOLOGIES.

The goals of this work are to obtain and to study the structure and properties of chitosan fibers filled with chitin nanofibrils. Biocompatible and bioresorbable composite fibers consisting of chitosan filled with anisotropic chitin nanoparticles (nanofibrils) were prepared by the coagulation method. The structure of the fibers and of the chitin nanofibrils was investigated by the XRD and SEM methods. Chitin powder was obtained by lyophilization of initial chitin suspension, films by drying the aqueous suspension. It was evident that the microparticles have strip type structure with the transverse size approximately 30  $\mu\text{m}$  and with the thickness of 0.1  $\mu\text{m}$ ; they consist of nanofibrils of 11-12 nm width and 600-800 nm length. The chitin nanofibrils were used as the filler for obtaining the bioresorbable composite fibers. The results of rheological studies allow to conclude that the dependence of the viscosity ( $\eta$ ) on the shear rate ( $\dot{\gamma}$ ) has nonlinear behavior for all investigated solutions. For the chitosan solution not containing the filler, the decrease of viscosity was observed at the shear rate of 10  $\text{s}^{-1}$  or more. The threshold value of the shear rate at which the dependence  $\eta(\dot{\gamma})$  becomes nonlinear displaces to the smaller values when the chitin nanofibril content increases. For the mixture containing 20 wt% of chitin filler the dependence  $\eta(\dot{\gamma})$  becomes linear over a wide range of shear rates. It was found that both components (chitin and chitosan) of these composite fibers were oriented. The incorporation of 0.1–0.3 wt.% of chitin nanofibrils (with respect to dry chitosan) into the chitosan matrix led to an increase in strength and Young modulus of composite fibers. Based on these results, a scheme of formation of oriented structure of composite fibers comprising anisodiametric nanoparticles was developed. The adhesion of stem or somatical cells on the material surface is one of the basic criteria of its use as the matrices for the cellular technologies. SEM micrograph of the chitosan fibers taken after the cultivation of stem cells on them indicated that the surface of the fibers contained stem cells, which were well-fixed and split. The fibrillation of the fibers, obtained on high degree of drawing, contributed to the adhesion on fiber surface of the mesenchymal stem cells that changed their form.

CHITOSAN, CHITIN NANOFIBRIL, RHEOLOGY OF POLYMER SOLUTION, COMPOSITE FIBER, ORIENTED STRUCTURE, MECHANICAL PROPERTIES, ADHESION OF MESENCHYMAL STEM CELLS.

#### REFERENCES

1. Langer R., Tirrell D.A. Designing Materials for Biology and Medicine. *Nature*, 2004, Vol. 428, pp. 487-492.
2. Dhandayuthapani B., Yoshida Ya., Maekawa T., Kumar D.S. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application. *International Journal of Polymer Science*, 2011, Vol. 61, pp. 475-480.
3. Rathke T.D., Hudson S.M. Review of Chitin and Chitosan as Fiber and Film Formers. *Journal Macromol. Sci.*, 1994, Vol. 34, pp. 375-437.
4. Rinaudo M. Chitin and Chitosan: Properties and Applications. *Prog. Polym. Sci.* 2006, Vol. 31, pp. 603-632.
5. Pillai C.K.S., Paul W., Sharma C.P. Chitin and Chitosan Polymers: Chemistry, Solubility and Fiber Formation. *Prog. Polym. Sci.*, 2009, Vol. 34, pp. 641-678.
6. Sriupayo J., Supaphol P., Rujiravanit R. Preparation and Characterization of A-Chitin Whisker-Reinforced Chitosan Nanocomposite Films with or without Heat Treatment. *Carbohydr. Polym.*, 2005, Vol. 62, pp. 130-136.
7. Muzzarelli R.A.A. Chitin and Its Derivatives: New Trends of Applied Research. *Carbohydrate Polymers*, 1983, Vol. 3, No. 4, pp. 53-75.
8. Panarin E.F., Nud'ga L.A., Petrova V.A., Bochek A.M. Composite Chitin and Chitosan based Matrices for Culturing Human Dermal Cells. *Cell Transplant and Tissue Ing.*, 2009, Vol. 4, pp. 42-46.
9. Vikhoreva G.A., Golbraykh L.S. Plenki i volokna na osnove khitina i yego proizvodnykh. *Khitin i khitozan. Polucheniye, svoystva i primeneniye.* Moscow, Nauka, 2002, pp. 254-278. (rus)
10. Ageyev Ye.P., Vikhoreva G.A., Zotkin M.A., Matushkina N.N., Gerasimov V.I., Zezin S.B., Obolonkova Ye.S. Struktura i transportnyye svoystva khitozanovykh plenok, modifitsirovannykh termoobrabotkoy. *Vysokomolek. soyed.*, 2004, Vol. 46, No. 312, pp. 2035-2041. (rus)
11. Dresvyanina E.N., Dobrovolskaya I.P., Popryadukhin P.V., Yudin V.E., Ivan'kova E.M. Influence of Spinning Conditions on Properties of Chitosan Fibers. *Fiber Chemistry*, 2012, Vol. 44, pp. 260-263.
12. Dobrovolskaya I.P., Popryadukhin P.V., Khomenko A.Yu., Dresvyanina E.N., Yudin V.E., Elokhovskii V. Yu., Chvalun S.N. Structure and Characteristics of Chitosan Based Fibers Containing

Chrysotile and Halloysite. *Polym. Sci., Ser. A*, 2011, Vol. 53, pp. 418-423.

13. **Sikorski P., Hori R., Wada M.** Revisit of  $\alpha$ -Chitin Crystal Structure Using High Resolution X-ray Diffraction Data. *Biomacromolecules*, 2009, Vol. 10, pp. 1100-1105.

14. **Dobrovolskaya I.P., Slutsker L.I., Chereisky Z.Yu., Utevsky L.E.** Changing the Structure of Rayon Fibers During Pyrolysis. *Polymer Science USSR. Ser. A*, 1975, Vol. 17, pp. 1555-1559.

15. **Baird D.G.** Viscometry of Anisotropic Solutions of Poly-p-Phenyleneterephthalamide in Sulfuric Acid. *J. Appl. Polym. Sci.*, 1978. Vol. 22,

pp. 2701-2706.

16. **Garboczi E., Snyder K., Douglas J., Thorpe, M.** Geometrical Percolation Threshold of Overlapping Ellipsoids. *Phys. Rev.*, 1995, Vol. 52, pp. 819-828.

17. **Barbucci R., Pasqui D., Wirsen A., Affrossman S., Curtis A., Tetta C.** Micro- and Nano-Structured Surfaces. *J. Mater. Sci. Mat. in Med.*, 2003. Vol. 14, pp. 721-725.

18. **Lim J.Y., Donahue H.** Cell Sensing and Response to Micro- and Nano-Structured Surfaces Produced by Chemical and Topographic Patterning. *J. Tiss. Eng.* 2007, Vol. 13, pp. 1879-1891.

#### THE AUTHORS

**DOBROVOLSKAYA Irina P.**

*St. Petersburg Polytechnic University*

29 Politekhnikeskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia.

dobrov@hq.macro.ru

**DRESVYANINA Elena N.**

*St. Petersburg Polytechnic University*

31 Bolshoy Ave. V.O., St. Petersburg, 199004, Russia

elenadresvyanina@gmail.com

**YUDENKO Alexandra N.**

*St. Petersburg Polytechnic University*

29 Politekhnikeskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia.

ansa2@mail.ru

**POPRYADUKHIN Pavel V.**

*St. Petersburg Polytechnic University*

29 Politekhnikeskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia.

pavel-pn@mail.ru

**IVANKOVA Elena M.**

*St. Petersburg Polytechnic University*

29 Politekhnikeskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia.

ivelen@mail.ru

**YUDIN Vladimir E.**

*St. Petersburg Polytechnic University*

29 Politekhnikeskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia.

yudin@hq.macro.ru