

DOI: 10.18721/JPM.12309  
УДК 544.77.022.823

## КОМПОЗИЦИОННЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ МАТРИЦЫ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ И ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ

**И.П. Добровольская<sup>1,2</sup>, Е.М. Иванькова<sup>1,2</sup>,  
П.В. Попрядухин<sup>1,2</sup>, В.Е. Юдин<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук,  
Санкт-Петербург, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
Санкт-Петербург, Российская Федерация

В статье представлена реализация современных методов получения одно-, двух- и трехмерных композиционных матриц для тканевой инженерии на основе резорбируемых и нерезорбируемых полимеров. Описаны коагуляционный способ получения композиционных волокон на основе хитозана и наночастиц хитина, метод электроформования композиционных нановолокон, метод лиофилизации растворов хитозана и их смесей с наночастицами для получения трехмерных пористых матриц с повышенной стабильностью механических характеристик в водных средах. Приведены результаты исследования адгезии и кинетики пролиферации стволовых и соматических клеток человека и животных на разработанных матрицах. В результате экспериментов *in vivo* установлено, что материалы в виде волокон, пленок, трубчатых образцов и губок можно использовать в качестве имплантатов кровеносных сосудов и эффективных раневых покрытий. Представлены также результаты исследования кинетики резорбции исследуемых материалов в живом организме.

**Ключевые слова:** хитозан, наночастицы хитина, тканевая инженерия, композиционное нановолокно, композиционная губка

**Ссылка при цитировании:** Добровольская И.П., Иванькова Е.М., Попрядухин П.В., Юдин В.Е. Композиционные полимерные матрицы для тканевой инженерии и трансплантологии // Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки. 2019. Т. 12. № 3. С. 110–122. DOI: 10.18721/JPM.12309

## COMPOSITE POLYMER MATRICES FOR TISSUE ENGINEERING AND TRANSPLANTOLOGY

**I.P. Dobrovolskaya<sup>1,2</sup>, E.M. Ivan'kova<sup>1,2</sup>,  
P.V. Popryadukhin<sup>1,2</sup>, V.E. Yudin<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Macromolecular Compounds RAS, St. Petersburg, Russian Federation;

<sup>2</sup>Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russian Federation

The article presents implementation of modern methods for producing one-, two-, and three-dimensional composite matrices for tissue engineering based on resorbable and nonresorbable polymers. Coagulation method for producing composite fibers based on chitosan and chitin nanofibrils, electrospinning method for composite nanofibers, lyophilization of chitosan solutions and their mixtures with nanoparticles to obtain three-dimensional porous matrices with increased stability of mechanical characteristics in aqueous media have been described. The results of the studies in the adhesion and kinetics of proliferation of stem and somatic cells of humans and animals on the developed matrices were given. *In vivo* experiments showed that materials in the form of fibers, films, tubular samples, and sponges could be used as implants

for blood vessels and effective wound dressings. Moreover, the article contains the findings of an investigation into the kinetics of resorption of the involved materials in a living organism.

**Keywords:** chitosan, chitin nanofibrilla, tissue engineering, composite nanofiber, composite sponge

**Citation:** Dobrovolskaya I.P., Ivan'kova E.M., Popryadukhin P.V., Yudin V.E., Composite polymer matrices for tissue engineering and transplantology, St. Petersburg Polytechnical State University Journal. Physics and Mathematics. 12 (3) (2019) 110–122. DOI: 10.18721/JPM.12309

### Введение

В настоящее время тканевая инженерия является одной из наиболее молодых отраслей науки, базирующейся на принципах материаловедения, цитологии, молекулярной биологии и медицины. Используемый в ней междисциплинарный подход направлен на создание новых тканеинженерных препаратов для восстановления утраченных функций тканей или органов [1]. Тканеинженерный препарат, который, по сути, является биокомпозиционным материалом, состоит из полимерной, керамической или иной матрицы, а также наполнителей в виде стволовых или соматических клеток, факторов роста и других компонентов, способствующих пролиферативной активности клеток, их дифференциации, формированию новой ткани. Матрица должна иметь форму, наиболее подходящую для воссоздания нового органа или его части, т. е. быть в виде волокон, пленок, пористых трехмерных образцов с различной структурой и размерами, а также трубчатых образцов. Исследования, проведенные в последнее время, позволили сформулировать основные требования к материалам, которые могут быть использованы в тканевой инженерии и трансплантологии [2 – 4].

Как в сухом состоянии, так и в водных средах матрица должна обладать прочностными и деформационными свойствами, уровень характеристик которых не препятствовал бы манипуляциям при их стерилизации, а также при формировании тканеинженерного препарата. Полимерная матрица или тканеинженерный препарат должны обеспечивать удобство их использования в хирургических процедурах при имплантировании в тот или иной орган.

Кроме того, на материал матрицы налагаются требования биосовместимости с живой тканью, отсутствия негативного влияния на окружающие ткани как самих матриц, так и продуктов их резорбции. Поверхность матрицы должна способствовать адгезии, пролиферации и дифференциации

стволовых и соматических клеток в составе тканеинженерного препарата. С этой целью предусматривается возможность модификации поверхности для формирования оптимального рельефа для данного вида ткани [5].

### Материалы и оборудование

Для получения композиционных волокон использовали хитозан (Fluka Chemie, BioChemika line) с молекулярной массой, равной 255 кДа, степенью деацетилирования 80 %, а также наночастицы хитина (Mavi Sud s.r.l, Italy).

Диспергирование наночастиц хитина в воде проводили ультразвуковой обработкой в течение 30 мин. Для получения смеси раствора хитозана с наночастицами хитина, в водную дисперсию, содержащую указанные наночастицы, добавляли хитозан в количестве, необходимом для получения 4 масс. % раствора, а хитина – 0,05 – 20 масс. % по отношению к хитозану. После этого в смесь вводили раствор уксусной кислоты, доводя концентрацию кислоты в растворителе до 2 об. %. Смесь раствора хитозана с наночастицами хитина перемешивали 90 мин, фильтровали, а затем обезвоздушивали под давлением 0,1 атм.

Волокна формировали на лабораторной установке ИВС РАН. Осадителем служила спирто-щелочная смесь, состоящая из 10%-го раствора NaOH и метанола в соотношении 1:1. Формование моноволокон проводили через фильеру диаметром 0,6 мм; скорость подачи 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.

Электроформование нановолокон проводили на установке NANON-01A (MECC Co., Япония). Раствор с помощью инжекторного насоса подавался через электрод-фильеру радиусом 0,3 мм в электри-

ческое поле с напряжением  $V = 18$  кВ. Расстояние между электродом-фильерой и приемным электродом, на котором происходило осаждение волокон, составляло 0,2 м. Для получения трубчатых образцов использовали цилиндрический электрод диаметром 1 мм, вращающийся со скоростью 600 об/мин.

Для получения пористых композитов использовали хитозан производства фирмы ALDRICH Chemistry (Исландия), с молекулярной массой 140 кДа, степенью деацетилирования 82 %. Смесь раствора хитозана и наночастиц хитина готовили способом, аналогичным использованному при формировании волокон коагуляционным методом. Готовые растворы выдерживали в течение суток в холодильнике при  $t = 4^\circ\text{C}$ , а затем замораживали до  $t = -32^\circ\text{C}$  и выдерживали при этой температуре в течение 4 ч. Образцы лиофилизировали при  $t = -5^\circ\text{C}$  и давлении 1,6 Па. Лиофилизацию и замораживание растворов проводили на установке Freeze Dry System (США). Полученные образцы обрабатывали 10%-м раствором NaOH с целью перевода хитозана из водорастворимой солевой формы в не растворимую в воде основную форму.

Структуру готовых образцов исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа SUPRA-55VP (Carl Zeiss, Германия). Предварительно на них напыляли тонкий слой платины.

### Результаты и их обсуждение

**Композиционные волокна на основе хитозана.** Перспективными материалами для тканевой инженерии и трансплантологии являются одномерные полимерные матрицы – прообразы нервной и мышечной тка-

ней, а также ткани связок. Такие матрицы лучше всего соответствуют волоконной структуре.

В настоящее время актуальной задачей разработки резорбируемых одномерных матриц становится получение композиционных волокон, которые характеризуются биорезорбцией как полимера, так и наполнителя. Введение наночастиц хитина в хитозановую матрицу позволяет изготавливать полностью резорбируемые композиционные волокна с повышенными прочностными и упругими параметрами. В данной работе волокна были получены методом мокрого формования.

Из результатов электронно-микроскопических исследований следует, что волокна на основе хитозана, полученные методом коагуляционного (мокрого) формования, обладают гладкой поверхностью (рис. 1, *a*) 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 (рис. 1, *b*).

Процесс ориентационной вытяжки композиционных волокон с малым (до 1 масс. %) содержанием наполнителя можно описать следующей схемой.

При взаимодействии молекулы хитозана с уксусной кислотой (растворителем) происходит протонирование аминогруппы  $-\text{NH}_2$ ;  $-\text{NH}_2 \rightarrow \text{NH}_3^+$ ; при этом образуется соль – ацетат хитозана.

Между наночастицами хитина существует свободный объем, в котором находятся макромолекулы ацетата хитозана и уксусная кислота.

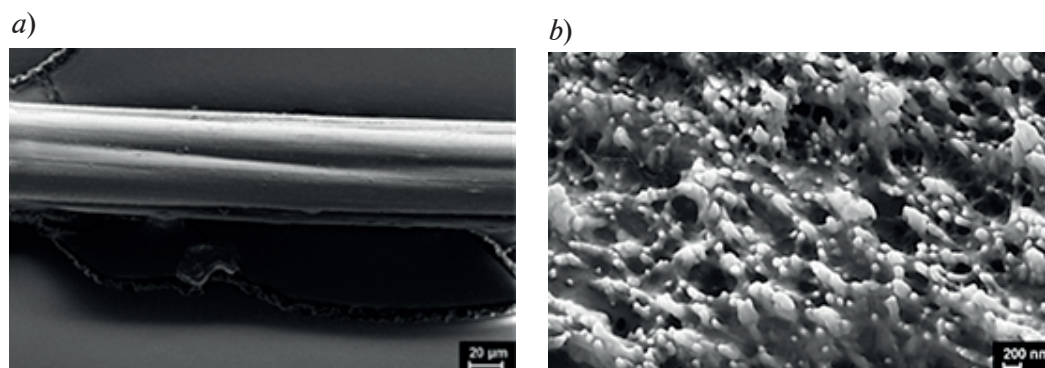


Рис. 1. Микрофотографии композиционного волокна на основе хитозана, содержащего 1 масс. % наночастиц хитина: *a* – поверхность волокна, *b* – его поперечное сечение

При прохождении через фильеру раствор попадает в поле сдвиговых напряжений, при этом происходит ориентация как частиц наполнителя, так и макромолекул ацетата хитозана. Ввиду хорошей адгезии, макромолекулы ацетата хитозана, находящиеся в приповерхностном слое нанофибрилл хитина, приобретают дополнительную ориентацию. В процессе вытяжки в осадительной ванне происходит ориентация макромолекул ацетата хитозана и образование 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 и контакта струи с осадителем (спирто-щелочная смесь) происходит депротонирование макромолекул, 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 [6].

Отсутствие цитотоксичности волокон хитозана подтверждается эффективной адгезией мезенхимных стволовых клеток на их поверхности. На рис. 2 приведены микрофотографии поверхности волокон, на которых видны агрегации мезенхимных стволовых клеток. Клетки имеют типичную для них морфологию и структуру роста. Данные микрофотографии демонстрируют не только адгезию, но и пролиферацию клеток на поверхности волокна, так как регистрируется момент митотического де-

ления клетки. Волокно, полученное с высокой степенью вытяжки ( $\lambda = 100\%$ ), характеризуется фибриллярной структурой поверхности, 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 [7, 8], где установлено, что изменение формы стволовых клеток есть один из факторов их направленной дифференцировки.

#### Пористые пленки на основе композиционных нановолокон

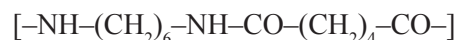
Для обеспечения метаболических процессов в клетке, ее пролиферативной активности необходимы оптимальные транспортные характеристики матрицы, в частности высокая газо- и водопроницаемость [9]. Такими свойствами обладают пленочные материалы на основе нановолокон из биосовместимых полимеров.

Высокие диэлектрические характеристики алифатического сополиамида (СПА), способность его растворов к фазовому разделению, а также экологичность растворителя позволяют его использовать для получения нановолокон методом электроформования [9].

Для изготовления требуемых нановолокон мы использовали СПА: сополимер  $\epsilon$ -капролактама

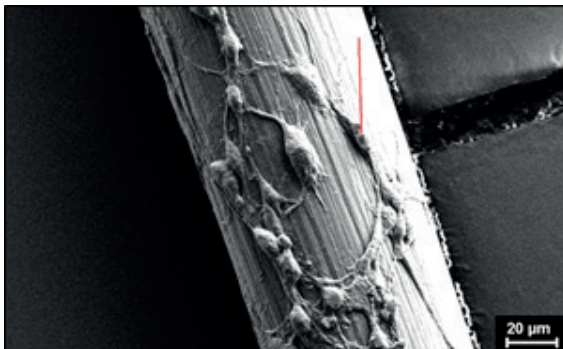


и гексаметилендиаминдипината



с соотношением компонентов 40:60.

a)



b)

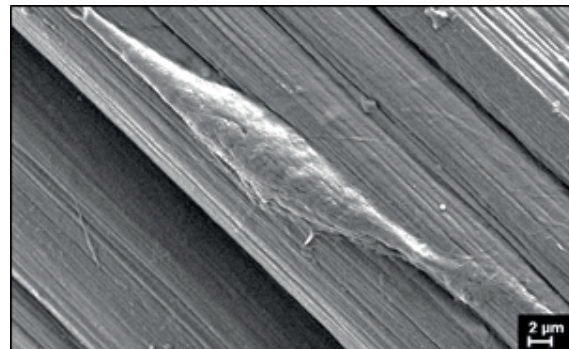


Рис. 2. Микрофотографии поверхности волокон (с разной степенью увеличения) на основе хитозана после культивации мезенхимных стволовых клеток в течение 3 сут.

Стрелка указывает на область митотического деления клетки

Авторами настоящей статьи ранее было показано, что оптимальными свойствами для электроформования волокон обладают растворы СПА с концентрацией 16 масс. % в смеси этанол + вода в соотношении 80:20.

Было установлено, что пористые пленки на основе нановолокон из СПА характеризуются сравнительно невысокими значениями прочности ( $\sigma = 6,5$  МПа) и модуля упругости ( $E = 55$  МПа). Однако такие механические характеристики позволяют успешно проводить манипуляции на воздухе и в жидкой среде. Пленки эластичны как в сухом, так и во влажном состоянии, и они хорошо дублируют рельеф поверхности. Материалы с такими свойствами вполне пригодны в качестве матриц для тканевой инженерии, а также в составе композиционных раневых покрытий.

Макромолекула СПА содержит амидные, карбонильные и карбоксильные группы, включающие главным образом ковалентные и водородные химические связи. Материал на основе такого полимера обладает гидрофильными свойствами. Волокна и пленки из него сохраняют свои размеры и свойства при длительном контакте с водными средами. Исходя из перечисленного, было резонно предположить, что полученные материалы должны обладать хорошей адгезией по отношению к стволовым и соматическим клеткам, обеспечивать высокую скорость пролиферации клеток как на поверхности, так и в объеме.

Вторым полимером, успешно используемым в различных областях медицины, является хитозан. В работе [15] было показано, что введение в раствор хитозана до 20 масс. % нановолокон хитина, с одной стороны, увеличивает вязкость смеси, с другой – приводит к существенному

уменьшению ее значений в поле сдвиговых напряжений. Это обусловлено образованием кластерной структуры частиц наполнителя, ориентацией нановолокон хитина под действием сдвиговых напряжений в электромагнитном поле. Наличие нановолокон хитина облегчает образование нановолокон в электрическом поле, приводит к значительному уменьшению количества дефектов.

На рис. 3 представлены электронные микрофотографии тканеинженерного препарата, включающего матрицу на основе нановолокон из СПА и мезенхимных стволовых клеток (рис. 3, *a, b*), а также хитозана и фибробластов человека (рис. 3, *c*).

На приведенных микрофотографиях виден контакт псевдоподий клетки с нановолокнами матрицы (рис. 3, *a*), а также деление стволовой клетки (рис. 3, *b*) и структура тканеинженерного препарата (рис. 3, *c*).

#### Имплантаты кровеносных сосудов на основе нановолокон из полилактида

Одним из наиболее перспективных методов получения имплантатов кровеносных сосудов является метод электроформования. Метод позволяет получать материалы на основе нановолокон, которые характеризуются высокими значениями пористости и удельной поверхности. Последнее особенно важно для миграции клеток и их пролиферации в объем имплантата. В то же время структура должна препятствовать просачиванию крови через стенки трубки [10 – 13]. Метод электроформования нановолокон обеспечивает необходимый уровень механических характеристик трубчатых имплантатов. Последние должны интегрироваться в живой организм, при этом их внутренняя поверхность на ранней стадии имплантиро-

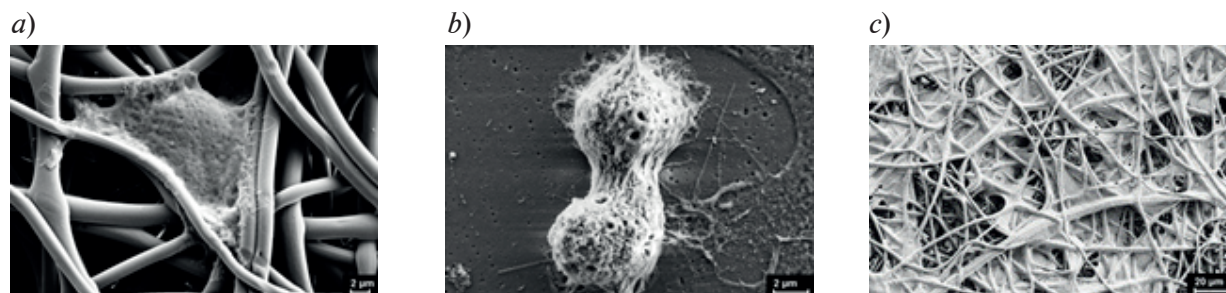


Рис. 3. Электронные микрофотографии тканеинженерных препаратов, включающих матрицы двух видов: на основе нановолокон из СПА и мезенхимных стволовых клеток (*a, b*) и на основе нановолокон из хитозана и фибробластов человека (*c*);  
*a* – адгезия стволовой клетки на матрице, *b* – деление этой клетки

вания должна покрываться слоем эндотелия, что существенно снижает вероятность образования тромбов.

Методом электроформования нами были получены трубки с внутренним диаметром 1 мм и толщиной стенок около 250 мкм (рис. 4, *a*). Формование нановолокон проводили из раствора полилактида в дихлорэтане на вращающийся приемный электрод [13].

В экспериментах *in vivo* была проведена имплантация трубчатых образцов на основе нановолокон из ПЛА в брюшную аорту крысы. Установлено, что через четыре недели все имплантаты были проходимы; аорта была прикреплена к имплантату; снятие швов не привело к разрушению анастомоза; патологического влияния на окружающие ткани обнаружено не было.

Морфологический анализ материала [3] показал, что на внутренней стороне имплантата сформировался эндотелиальный слой, который начинается с дистальных и проксимальных анастомозов; центральная часть была покрыта неоднородным сетча-

тым фибриновым слоем. Между волокнами ПЛА, в основном со стороны адвентиции, были обнаружены ядра фибробластов; начали появляться тонкие коллагеновые волокна. Инородные тела гигантских клеток располагались на внешней стороне трансплантата. Наличие этих клеток типично для реакции организма на инородное тело, так как они активно участвуют в его разрушении. Однако в нашем случае размеры клеток не позволяли им проникать через поры внутрь имплантата, они сохраняли свою форму и структуру.

Первые признаки биорезорбции были обнаружены через 12 недель после имплантации. Через 24 недели после имплантации все имплантаты оставались проходимыми, на нановолокнах наблюдались многочисленные поперечные трещины, а значительная часть волокон была фрагментирована. Это свидетельствует об интенсивном процессе резорбции полимерной матрицы.

Анализ микрофотографии поперечного сечения, сделанный через 64 недели после имплантации (рис. 4, *b*, *c*), показал, что по-

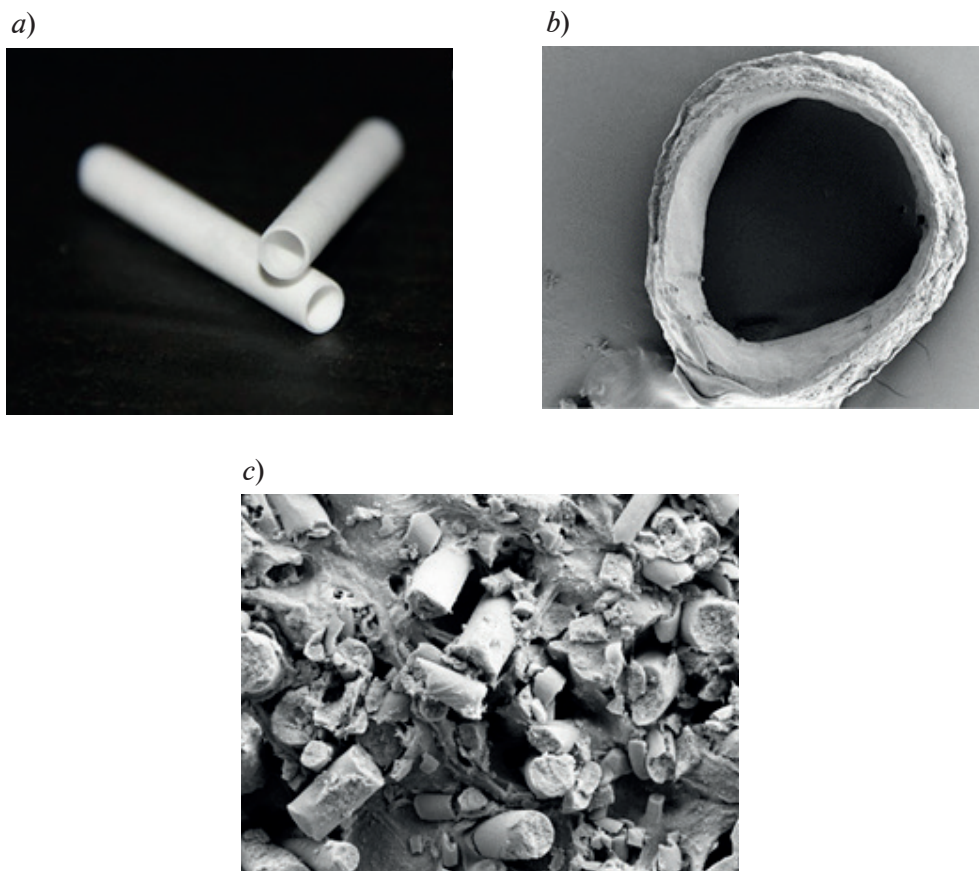


Рис. 4. Фотография имплантатов сосудов на основе нановолокон ПЛА (*a*) и микрофотографии их поперечного сечения с разным увеличением (*b*, *c*) через 64 недели после имплантации

ристость стенок имплантата существенно уменьшилась. Морфологические исследования показали, что эндотелий и субэндотелий, содержащие волокна коллагена, полностью покрывают имплантат и образовалась неоинтима. В пределах толщины имплантата между волокнами ПЛА расположены фибробласты и вновь образованные волокна коллагена. Со стороны адвентиции наблюдались многочисленные гигантские клетки инородного тела.

#### Раневые покрытия на основе композиционных нановолокон

Раневое покрытие должно обеспечивать газо- и влагообмен, необходимые для жизнедеятельности клеток, воспроизводить рельеф раневой поверхности, быть удобным для хирургических манипуляций. Важным свойством современного раневого покрытия является его атравматичность: при удалении его с поверхности раны, образовавшийся слой эпителия не должен травмироваться или разрушаться. Наконец, покровный материал должен предотвращать загрязнение раны патогенной микрофлорой из окружающей среды.

Эти свойства присущи пористым пленкам на основе полимерных нановолокон, полученных методом электроформования [10]. Получение нановолокон из спирторастворимого алифатического сополиамида (СПА) было описано ранее [9]; изготовление композиционных нановолокон на основе хитозана и нановолокон хитина — в работе [15].

Исходя из специфических свойств каждого материала (СПА и хитозан) и особенностей их электроформования, авторами

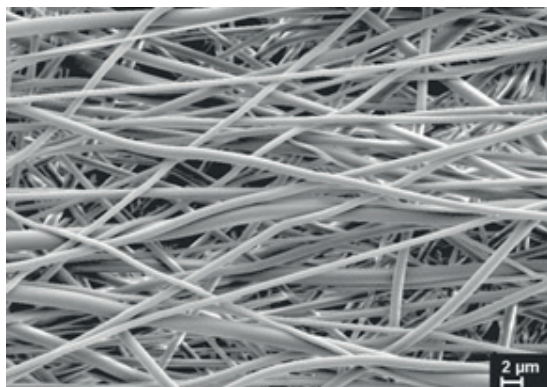
настоящей статьи предложен способ получения композиционных раневых покрытий на основе нановолокон СПА и композиционных нановолокон из хитозана и нановолокон хитина [16].

Нановолокна нерезорбируемого СПА придают материалу необходимые механические характеристики, обеспечивают обменные процессы между раной и окружающей средой, а также защиту от патогенных бактерий и грибков (рис. 5, *a*).

Слой, непосредственно контактирующий с раной, который состоит из композиционных нановолокон на основе хитозана и нановолокон хитина (рис. 5, *b*), обеспечивает атравматичность покрытия, способствует эффективной регенерации покровной ткани.

Созданный материал обладает биосовместимостью, пористой структурой, которая сохраняет форму и размеры пор в жидких биологических средах. Механические характеристики материала позволяют манипуляции с ним как в сухом, так и во влажном состояниях. При наложении на рану слой, состоящий из композиционных нановолокон на основе резорбируемых полимеров природного происхождения — хитозана и хитина и непосредственно контактирующий с поврежденной поверхностью, резорбирует под действием биологически активной среды. Как известно, активная среда включает лейкоциты, тучные клетки, плазматциты, гистиоциты, фибробласты, а также ферменты из ряда гликозидаз и хитиназ. Хитин, хитозан и продукты их биоразложения оказывают на среду бактерицидное действие, что способствует процессам грануляции и эпителизации раны.

*a)*



*b)*

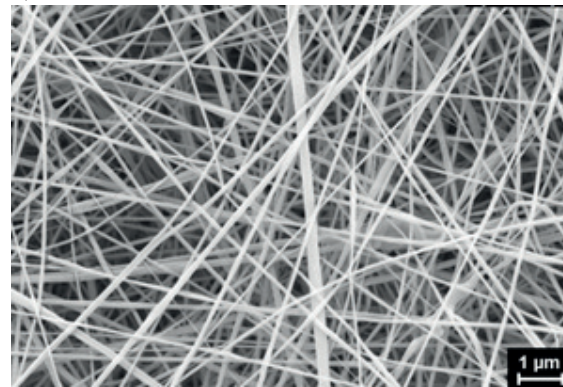


Рис. 5. Микрофотографии нановолокон из СПА (*a*) и композиционных нановолокон на основе хитозана и нановолокон хитина (*b*)

Двухслойное раневое покрытие позволяет не нарушать процессы грануляции и эпителизации раны при замене или снятии повязки за счет отделения прочного нерезорбируемого слоя. Менее прочный слой, состоящий из хитина и хитозана, подвергшийся частичной резорбции, остается на поверхности раны вплоть до полной резорбции и способствует заживлению раневой поверхности.

Полученный целевой материал мы исследовали *in vivo* в качестве раневого покрытия для лечения ожога кожи III степени (диагноз по международной классификации болезней 10-го пересмотра – МКБ-10). Эксперимент проводили на самцах крыс линии «Wistar-Kyoto» весом 200 – 250 г. В экспериментальной группе на раневую поверхность накладывали композиционное раневое покрытие. Наблюдение за животными осуществляли в течение четырех недель.

В табл. 1 приведены значения площади раневой поверхности ожога III степени после применения целевого раневого покрытия, покрытия G-DERM и контрольной группы животных.

Из приведенных в табл. 1 данных видно, что скорость заживления ожоговой раны при лечении композиционным раневым покрытием на основе нановолокон из СПА и композиционных нановолокон из хитозана и нановолокон хитина существенно выше, чем при использовании материала аналогичного назначения, наиболее распространенного на современном рынке, а также гораздо выше, чем у контрольной группы животных.

### Трехмерные пористые композиционные матрицы

Большинство органов человека и животных представляют собой трехмерные структуры различной формы. Каждый из этих органов имеет свои важные морфологические и физиологические особенности, которые следует принимать во внимание при разработке матриц для тканеинженерных препаратов. Важным параметром трехмерных матриц для клеточных технологий является наличие открытой пористости. Размер пор должен обеспечивать равномерное заполнение свободного объема матрицы соматическими клетками, их миграцию и пролиферацию. Структура пор должна способствовать протеканию метаболических процессов, необходимых для жизнедеятельности клеток.

Известно, что некоторые полимеры способны образовывать пористые структуры различных типов [1 – 3]. Хитозан также относится к этим полимерам. Как видно на рис. 6, *a*, при замораживании смеси раствора хитозана и хитиновых нановолокон происходит фазовое разделение раствора. Полимер, содержащий наполнитель, образует сотовую структуру. Существенной особенностью композиционных губок, полученных лиофилизацией, является более выраженная ламинарная структура (рис. 6, *b*), по сравнению с таковой у губок из чистого хитозана.

Анализ литературы показал, что скорость резорбции матрицы хитозана зависит от степени деацетилирования, молекулярной массы полимера, пористости материалов, наличия наночастиц или других полимеров

Таблица 1  
Сравнение эффективности лечения двумя раневыми покрытиями по площадям раневой поверхности ожога III степени

Срок наблюдения, сут.	Площадь раневой поверхности, см <sup>2</sup>		
	Целевое раневое покрытие	Покрытие G-DERM	Без покрытия (контрольная группа)
0	32	32	32
3	22	27	29
7	16	19	25
15	9	12	18
21	1,5	8,0	12,5

Примечание. Эксперимент проведен на самцах крыс линии «Wistar-Kyoto» весом 200 – 250 г.



в матрице [13, 14].

На рис. 7 представлены микрофотографии поперечного сечения материала на основе хитозана. Можно видеть, что материал имеет структуру с открытыми порами; поры связаны между собой и с окружающей средой. Такая структура позволяет питательным веществам и растворенным газам свободно циркулировать внутри всей матрицы. Размер пор и извилистость каналов, соединяющих поры друг с другом, обеспечивают свободную миграцию клеток.

В табл. 2 приведены результаты гистологического исследования пористых хитозановых матриц. Через первую неделю после имплантации выявлено умеренно выраженное асептическое воспаление вокруг матрицы с очагами инфильтрации лейкоцитов и преобладанием сегментарных ядерных клеток. Через две недели после имплантации наблюдалось незначительное асептическое воспаление вокруг пористой матрицы, однако капсулы соединительной ткани не образовывались, и отека не было обнаружено. Через шесть недель после начала экспери-

мента вокруг пористой матрицы не образовалась и капсула из соединительной ткани. Через 3 мес (12 нед) после имплантации площадь поперечного сечения матрицы уменьшилась и составила  $5,38 \cdot 10^5$  (мкм)<sup>2</sup>; это значение заметно отличается от соответствующего, измеренного через неделю после имплантации (65,9%).

Через 6 мес (24 нед) после имплантации хитозановой матрицы площадь ее поперечного сечения уменьшается и становится равной  $2,64 \cdot 10^5$  (мкм)<sup>2</sup>, что существенно отличается от значений, полученных через одну и шесть недель после имплантации. Через 12 мес после имплантации фрагменты хитозановой матрицы были обнаружены только в одном образце ткани. Площадь поперечного сечения матрицы уменьшилась до  $1,71 \cdot 10^5$  (мкм)<sup>2</sup>.

Таким образом, установлено, что полная биорезорбция полимерной хитозановой матрицы происходит через 12 мес после имплантации; рубцовая ткань не сформировалась, а изменений или повреждений в окружающих тканях обнаружено не было.

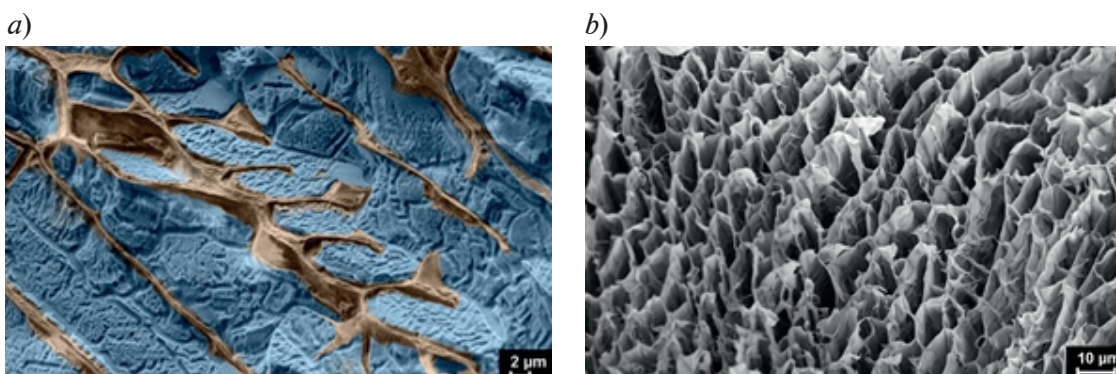


Рис. 6. Микрофотографии смеси раствора хитозана и нановолокна хитина при температуре  $-160^\circ\text{C}$  (a) и губки после лиофильной сушки при температуре  $-5^\circ\text{C}$  (b)

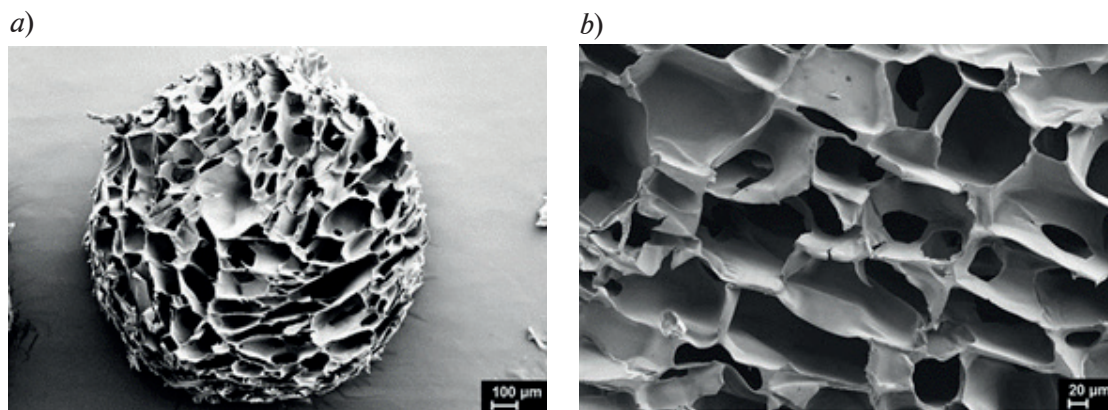


Рис. 7. Микрофотографии поперечного сечения цилиндрического образца губки: a – общий вид, b – та же губка с большим увеличением

Таблица 2

Объемное содержание компонентов в пористой композиционной матрице на основе хитозана после ее имплантации в мышцу крысы

Срок наблюдения, нед	Объемное содержание компонента, %			
	Матрица	Коллагеновые волокна	Сосуды	Лейкоциты
1	17,74	0,94	0,12	11,94
2	19,10	3,24	0,48	0,86
6	19,38	3,94	0,88	1,20
12	24,70	3,40	0,50	1,63
24	24,90	3,74	1,30	3,90

Примечание. Эксперимент проведен на самце крысы линии «Wistar-Kyoto» весом 250 г. Имплантация сделана в широчайшую спинную мышцу.

На протяжении всего эксперимента матрица демонстрировала высокую стабильность формы и сохраняла структуру открытых пор, что облегчало прорастание кровеносных сосудов и свободную миграцию клеток в объеме матрицы.

#### Заключение

Методами коагуляции и электроформования получены композиционные волокна и нановолокна на основе хитозана и нанофибрилл хитина. Предложен механизм формирования структуры композиционных волокон, содержащих анизометричные наночастицы. На крысах проведены (*in vivo*) исследования трубок на основе нановолокон из полилактида в качестве имплантатов кровеносных сосудов. Разработаны компо-

зиционные раневые покрытия на основе нановолокон из алифатического сополиамида и композиционных нановолокон из хитозана и нанофибрилл хитина. Исследование *in vivo* показало высокую эффективность разработанного раневого покрытия при лечении глубоких поражений кожи различной этиологии. Результаты исследования кинетики резорбции трехмерных пористых губок на основе хитозана, а также процесса образования тканей (соединительной, нервной, эпителия) позволяют рекомендовать этот материал в тканевой инженерии, в частности для реконструкции костной ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 19-73-30003.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Spector M. Intelligent support for instructional development: Approaches and limits // Design approaches and tools in education and training. J. van den Akker, R. Branch, et al. (Eds.). Springer Science + Business Media Dordrecht, 1999. Pp. 279–290.
2. Reddi A.H. Regulation of bone differentiation by local and systemic factors // Bone and Materials Research. 1985. Vol. 3. Pp. 27–47.
3. Dobrovolskaya I.P., Yudin V.E., Popryadukhin P.V., Ivan'kova E.M. Polymer scaffolds for tissue engineering. St. Petersburg: Media Papier, 2018. 228 p.
4. Biomaterials, artificial organs and tissue engineering. L. Hench, J. Jones (Eds.) Cambridge: Woodhead Publishing, 2005. 304 p.
5. Atala A., Allickson J.G. Translational regenerative medicine. Elsevier, Academic Press, 2014. 606 p.
6. Yudin V.E., Dobrovolskaya I.P., Neelov I.M., Dresvyanina E.N., Popryadukhin P.V., Ivan'kova E.M., Elokhovskii V.Yu., Kasatkin I.A., Okrugin B.M., Morganti P. Wet spinning of fibers made of chitosan and chitin nanofibrils // Carbohydrate Polymers. 2014. Vol. 108. Pp. 176–182.
7. Barbucci R., Pasqui D., Wirsén A., Afrossman S. Micro and nano-structured surfaces // Journal of Material Science. Materials in Medicine. 2003. Vol. 14. No. 8. Pp. 721–725.
8. Lim J.Y., Donahue H. Cell sensing and

response to micro- and nanostructured surfaces produced by chemical and topographic patterning // *Tissue Engineering*. 2007. Vol. 13. No. 8. Pp. 1879–1891.

9. **Dobrovolskaya I.P., Popryadukhin P.V., Yudin V.E., Ivan'kova E.M., Elokhovskiy V.Yu., Weishauptova Z., Balik K.** Structure and properties of porous films based on aliphatic copolyamide developed for cellular technologies // *Journal of Material Science: Materials in Medicine*. 2015. Vol. 26. No. 1. Pp. 46–52.

10. **Harskamp R.E., Lopes R.D., Baisden C.E., Winter R.J., Alexander J.H.** Saphenous vein graft failure after coronary artery bypass surgery: pathophysiology, management, and future directions // *Annals of Surgery*. 2013. Vol. 257. No. 5. Pp. 824–833.

11. **Athanasiou T., Saso S., Rao C., Vecht J., Grapsa J., Dunning J., Lemma M., Casula R.** Radial artery versus saphenous vein conduits for coronary artery bypass surgery: forty 2014s of competition – which conduit offers better patency? A systematic review and meta-analysis. Review article // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2011. Vol. 40. No. 1. Pp. 208–220.

12. **Hibino N., McGillicuddy E., Matsumura G., Ichihara Y., Naito Y., Breuer C., Shinoka T.**

Late-term results of tissue-engineered vascular grafts in humans // *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2010. Vol.139. No. 2. Pp. 431–436.

13. **Popryadukhin P.V., Popov G.I., Dobrovolskaya I.P., Yudin V.E., Vavilov V.N., Yukina G.Yu., Ivan'kova E.M., Lebedeva I.O.** Vascular prostheses based on nanofibers from aliphatic copolyamide // *Cardiovascular Engineering and Technology*. 2016. Vol. 7. No.1. Pp. 78–86.

14. **Spasova M., Manolova N., Paneva D., Rashkov I.** Preparation of chitosan-containing nanofibers by electrospinning of chitosan/poly (ethylene oxide) blend solutions // *e-Polymers*. 2004. Vol. 4. No. 1. Pp. 1–12.

15. **Dobrovolskaya I.P., Yudin V.E., Popryadukhin P.V., Ivan'kova E.M., Shabunin A.S., Kasatkin I.A., Morgantie P.** Effect of chitin nanofibrils on electrospinning of chitosan-based composite nanofibers // *Carbohydrate Polymer*. 2018. Vol. 194. Pp. 260–266.

16. **Shabunin A.S., Yudin V.E., Dobrovolskaya I.P.** Composite wound dressing based on chitin/chitosan nanofibers: processing and biomedical applications // *Cosmetics*. 2019. Vol. 6. No. 1. Pp. 16–26.

*Статья поступила в редакцию 30.05.2019, принята к публикации 19.06.2019.*

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**ДОБРОВОЛЬСКАЯ Ирина Петровна** – доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории № 8 Института высокомолекулярных соединений РАН, старший научный сотрудник Высшей школы биомедицинских систем и технологии Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, Российская Федерация.

199004, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Большой пр. В.О., 31  
zair2@mail.ru

**ИВАНЬКОВА Елена Михайловна** – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории № 8 Института высокомолекулярных соединений РАН, старший научный сотрудник Высшей школы биомедицинских систем и технологии Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, Российская Федерация.

199004, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Большой пр. В.О., 31  
evelen@mail.ru

**ПОПРЯДУХИН Павел Васильевич** – кандидат технических наук, старший научный сотрудник лаборатории № 8 Института высокомолекулярных соединений РАН и научный сотрудник Высшей школы биомедицинских систем и технологии Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, Российская Федерация.

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

**ЮДИН Владимир Евгеньевич** – доктор физико-математических наук, заведующий лабораторией № 8 Института высокомолекулярных соединений РАН, профессор Высшей шко-



лы биомедицинских систем и технологии Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, Российская Федерация.

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

## REFERENCES

1. Spector M., Intelligent support for instructional development: Approaches and limits, In: Design approaches and tools in education and training; J. den Akker, R. Branch (Eds.), Kluwer, Dordrecht, 1999.
2. Reddi A.H., Regulation of bone differentiation by local and systemic factors, In: Bone and Materials Research. Vol. 3, Elsevier, New-York (1985) 27–47.
3. Dobrovolskaya I.P., Yudin V.E., Popryadukhin P.V., Ivan'kova E.M., Polymer scaffolds for tissue engineering, Media Papier, St. Petersburg, 2018.
4. Biomaterials, artificial organs and tissue engineering; L. Hench, J. Jones (Eds.), Woodhead Publishing, Cambridge, 2005.
5. Atala A., Allickson J.G., Translational regenerative medicine, Elsevier, Academic Press, 2014.
6. Yudin V.E., Dobrovolskaya I.P., Neelov I.M., et al., Wet spinning of fibers made of chitosan and chitin nanofibrils, Carbohydrate Polymer. 108 (2014) 176–182.
7. Barbucci R., Pasqui D., Wirsen A., Afrossman S., Micro and nano-structured surfaces, Journal of Material Science. Materials in Medicine. 14 (8) (2003) 721–725.
8. Lim J.Y., Donahue H., Cell sensing and response to micro- and nanostructured surfaces produced by chemical and topographic patterning, Tissue Engineering. 13 (2007) 1879–1891.
9. Dobrovolskaya I.P., Popryadukhin P.V., Yudin V.E., et al., Structure and properties of porous films based on aliphatic copolyamide developed for cellular technologies, Journal of Material Science, Materials in Medicine. 26 (1) (2015) 46–52.
10. Harskamp R.E., Lopes R.D., Baisden C.E., et al., Saphenous vein graft failure after coronary artery bypass surgery: pathophysiology, management, and future directions, Annals of Surgery. 257 (5) (2013) 824–833.
11. Athanasiou T., Saso S., Rao C., et al., Radial artery versus saphenous vein conduits for coronary artery bypass surgery: forty years of competition – which conduit offers better patency? A systematic review and meta-analysis. Review Article, European Journal of Cardio-Thoracic Surgery. 40 (1) (2011) 208–220.
12. Hibino N., McGillicuddy E., Matsumura G., et al., Late-term results of tissue-engineered vascular grafts in humans, The Journal of Thoracic Cardiovascular Surgery. 139 (2) (2010) 431–436.
13. Popryadukhin P.V., Popov G.I., Dobrovolskaya I.P., et al., Vascular prostheses based on nanofibers from aliphatic copolyamide, Cardiovascular Engineering and Technology. 7 (1) (2016) 78–86.
14. Spasova M., Manolova N., Paneva D., Rashkov I., Preparation of chitosan-containing nanofibers by electrospinning of chitosan/poly (ethylene oxide) blend solutions, e-Polymers. 4 (1) (2004) 1–12.
15. Dobrovolskaya I.P., Yudin V.E., Popryadukhin P.V., et al., Effect of chitin nanofibrils on electrospinning of chitosan-based composite nanofibers, Carbohydrate Polymer. 194 (2018) 260–266.
16. Shabunin A.S., Yudin V.E., Dobrovolskaya I.P., Composite wound dressing based on chitin/chitosan nanofibers: processing and biomedical applications, Cosmetics. 6 (2019) 16–26.

Received 30.05.2019, accepted 19.06.2019.

## THE AUTHORS

**DOBROVOLSKAYA Irina P.**

*Institute of Macromolecular Compounds RAS*

*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University*

31 Bolshoy Ave. V.O., St. Petersburg, 199004, Russian Federation

zair2@mail.ru

**IVAN'KOVA Elena M.**

*Institute of Macromolecular Compounds RAS*

*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University*  
31 Bolshoy Ave. V.O., St. Petersburg, 199004, Russian Federation  
evelen@mail.ru

**POPRYADUKHIN Pavel V.**

*Institute of Macromolecular Compounds RAS*  
*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University*  
31 Bolshoy Ave. V.O., St. Petersburg, 199004, Russian Federation  
dobrov@hq.macro.ru

**YUDIN Vladimir E.**

*Institute of Macromolecular Compounds RAS*  
*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University*  
31 Bolshoy Ave. V.O., St. Petersburg, 199004, Russian Federation  
yudin@hq.macro.ru