

УДК 57.089.67

**БЕСКЛЕТОЧНАЯ МАТРИЦА НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА С ПОВЫШЕННЫМИ
ХОНДРОИНДУКТИВНЫМИ СВОЙСТВАМИ**

В.В. НОВОЧАДОВ*, П.С. СЕМЕНОВ*, М.П. ЛЯБИН*, Н.М. ГАЙФУЛЛИН**

* *Волгоградский государственный университет*

** *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова*

Тел. 8-(8442)-447297 E-mail: biobio@volsu.ru, г. Волгоград

Аннотация. С целью повышения итоговых хондроиндуктивных свойств были проведены модификации на этапах изготовления пористой бесклеточной матрицы на основе оригинального хитозана для замещения дефектов хрящевой ткани. За счет повышения чистоты исходного препарата хитина, степени его деацетилирования и механизмов получения пористого продукта достигнуты удовлетворительные результаты гетеротопической имплантации матриц. По своим физико-химическим свойствам, биосовместимости и динамике биорезорбции они были сопоставимы с матрицами на основе коммерческого хитозана, а по способности индуцировать образование хрящевой ткани – превосходили их.

Ключевые слова: хитозан, тканевая инженерия, скаффолды, суставной хрящ, имплантат, биосовместимость, морфология

**THE CHITOSAN-BASED SCAFFOLD WITH IMPROVED
CHONDROINDUCTIVE POTENCY**

V.V. NOVOCHADOV*, P.S. SEMENOV*, M.P. LYABIN*, N.M. GAIFULLIN**

* *Volgograd State University*

** *M.V. Lomonosov Moscow State University*

Phone: +7-(8442)-447297 E-mail: biobio@volsu.ru, Volgograd

Abstract. To improve the chondroinductive properties of porous cell-free chitosan scaffold for cartilage tissue engineering the authors modified some stages of their fabrication. Satisfactory results after heterotopic implantation scaffolds were achieved by improving the purity of the original drug chitin, a degree of its deacetylation and mechanisms for obtaining porous product. These scaffolds were comparable to the matrix on the basis of commercial chitosan by its physical and chemical properties, toxicity and dynamics of biocompatibility and they exceeded them in the ability to induce the formation of cartilage tissue.

Key words: chitosan, tissue engineering, scaffolds, implant, biocompatibility, morphology.

Актуальность. Приоритетное направление тканевой инженерии - разработка биоматериалов для последующей трансплантации пациенту с целью частичной или полной замены поврежденных тканей. Основными требованиями, которые предъявляют к современным материалам для создания матриц (каркаса будущих тканей) являются: полная биологическая совместимость, поддержание жизнедеятельности заселяющих клеток, способность к естественной резорбции с трансформацией в натуральный матрикс замещаемой ткани, изменение строения и свойств в ответ на действия факторов окружающей среды [2, 8].

Хитозан - деацетилированная форма широко распространенного в природе полимера хитина, является одним из перспективных материалов для создания матриц, биомиметических к костной и хрящевой тканям. Он все активнее используется в имплантологии и тканевой инженерии, поскольку обладает большинством из вышеперечисленных свойств [5, 9, 11].

Не менее значимым фактом, расширяющим возможные сферы биоинженерного применения хитозана, является его достаточная химическая активность, позволяющая с легкостью осуществлять различные модификации с использованием широкого спектра биологически активных компонентов – шелком, гидроксипатитом, полиальгинатами, полимолочными кислотами и др. [3, 4, 7, 10].

Необходимость создания пористой 3D-организованной структуры полимера с размером пор от 50 до 500 мкм при создании тканевых матриц определяется механическими, биохимическими и физиологическими потребностями протезируемой ткани. Изначально высокая вязкость растворов хитозана позволяет использовать различные методы создания пористых матриц, начиная от лиофильного высушивания, заканчивая вспениванием газами, пузыри которых формируют стабильные поры диаметром до 500 мкм. Доказано влияние размеров пор и толщины хитозановых мембран, образующих пористую 3D-матрицу, на качество клеточной адгезии, скорость последующей адгезии, пролиферации клеток и неоангигенеза [5]. Поры такой матрицы могут дополнительно заполняться гелями, содержащими факторы роста и дифференцировки клеток [10]. Твердо-упругие свойства некоторых модификаций матриц из хитозана,

приближаются к значениям для губчатой кости, и способны выдерживать компрессионную нагрузку порядка 75 МПа [6].

К ограничениям, возникающим при использовании хитозана, большинство авторов относят его природное происхождение. Как следствие, качество получаемого хитина, затем – хитозана, и, наконец, 3D –матриц на его основе, зависит от источника сырья и технологий изготовления полимера [9, 10]. Все возрастающие объемы использования для нужд пищевой промышленности и биомедицины не способствовали росту качества коммерческих образцов хитозана. Отсюда понятен интерес к улучшению качества хитозана, предназначенного для нужд тканевой инженерии.

Цель исследования – получить из собственного и коммерческого хитозана высокопористые матрицы для имплантации и в эксперименте на крысах, сравнить их хондроиндуктивные свойства в условиях гетеротопической имплантации.

Материал и методы. Хитин был получен из наружного скелета ракообразных рода *Pandalus*, который после трехкратной промывки водопроводной водой, с целью депротенирования обрабатывался 10%-ным раствором NaHCO_3 в присутствии поверхностно-активных веществ ПАВ (стиральный порошок "Лотос") при температуре 70°C в течение 120 минут. Полученный продукт отстаивался в течение 24 ч. Далее проводилось повторное депротенирование, отмывка водопроводной водой до полного прекращения пенообразования и значения pH 7,0. Деминерализация продукта проводилась 0,1М раствором HCl при 20°C в течение 6 часов с трехкратной промывкой водопроводной водой до значения pH 7,0. Сушку проводили при температуре $35,0\text{--}40,0^\circ\text{C}$ до суховоздушного состояния. Использование в технологии NaHCO_3 в сочетании с поверхностно-активными веществами исключало применение агрессивных и токсических реагентов: концентрированных щелочей и органических растворителей, позволило снизить температуру, что обеспечило максимально щадящее воздействие на полимер, предотвратило его деградацию и исключило развитие вторичной пигментации продукта. Кроме этого, предложенная технология позволила увеличить экологическую и пожарную безопасность процесса, сделать его более технологичным. На «Способ получения хитина» авторами заявка на выдачу Патента РФ на изобретение (№ 2012112564/13(018921), приоритет от 30.03.12).

Хитозан получали путем проведения деацетилирования из хитина, предварительно измельченного до размеров 1-2 x 2-3 мм в двугорлом реакторе, снабженном термометром, обратным холодильником и подключенным к вакуумному водоструйному насосу. В качестве деацетилирующего реагента использовали 40%-ный раствор NaOH при 100°C , давлении 300 мм рт.ст. в течение 1-2 ч. Проведение процесса в условиях вакуума водоструйного насоса способствовало значительному снижению концентрации кислорода в реакционной зоне наличие которого, как известно, увеличивает степень деструкции хитина. По истечении указанного времени готовый продукт многократно промывался дистиллированной водой на воронке Бюхнера до pH 7,0. Отфильтрованный хитозан представлял собой сильно гидратированный продукт с содержанием воды более 70%. Для предотвращения ороговения хитозан сушили в термостате при $35,0\text{--}40,0^\circ\text{C}$ до суховоздушного состояния в течение не менее 72 ч. На «Способ получения хитозана» авторами заявка на выдачу Патента РФ на изобретение (№ 2012112563/13(018920), приоритет от 30.03.12).

Для оценки качества полученного хитозана были использованы показатели, заложенные в технические условия на пищевой хитозан (ТУ 9289-067-00472124-03): внешний вид, цвет, вкус, запах. Значение степени деацетилирования конечного продукта определялось потенциометрическим титрованием 1%-ного раствора в 0,1н HCl . Состав полученного хитозана устанавливали методом элементного анализа.

Пористые 3D-матрицы на основе хитозана были созданы с помощью оригинального метода замораживания-высушивания. Размеры каждой матрицы - $5 \times 5 \times 2$ мм, регулярный размер пор - 70–150 мкм. По 10 стерильных матриц были созданы из оригинального хитозана и из хитозана производства SGMV Corporation (США).

Проверка свойств матриц *in vivo* была осуществлена в экспериментах с использованием 36 белых крыс-самцов массой от 180 г до 240 г, полученных из нелинейных стоков Волгоградского научно-исследовательского противочумного института. Протокол экспериментов соответствовал этическим нормам, изложенным в «Международном кодексе медицинской этики» (1994), Правилах лабораторной практики (GLP), Хельсинской декларации (2000) и Директивах Европейского сообщества 86/609ЕЕС. Матрицы были вшиты под кожу в области холки крысам-самцам линии Wistar, наркотизированным в/м введением Золетила в дозе 40 мг/кг массы. Участки ткани вместе с имплантатами удаляли через 4 и 8 недель после постановки в тех же условиях. При изъятии образцов оценивали их подвижность *in situ*, состояние окружающей клетчатки, наличие питающих матрицу сосудов, выраженность спаечного процесса и степень биодеградации матриц. Материал фиксировали в формалине и после быстрой проводки по спиртам и полного обезвоживания, через ксилол заключали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5-7 мкм после депарафинирования окрашивали гематоксилином и эозином, трехцветным методом по Массону, микрофуксином по Ван-Гизону.

Для видео документирования, качественного и количественного анализа микропрепаратов ис-

пользовали аппаратно-компьютерный комплекс «Видеотест-Морфо» 3.0 (Россия) с привлечением возможностей программы Image J (США. Фотосъемка части препаратов проведена на микроскопе Micros (Германия) с фотокамерой Рихега (Япония).

Обработку количественных данных проводили непосредственно из общей матрицы данных Excel 7.0 (Microsoft, USA) с привлечением возможностей программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA) с учетом общепринятых требований для медико-биологических исследований. Для анализа различий между выборками использовали критерий Манна-Уитни, критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимали равным 0,05.

Результаты и их обсуждение.

Сравнительный анализ и сопоставление характеристик полученного оригинального препарата Хитозана и коммерческого аналога выявили их полное соответствие требованиям российского ТУ к пищевому Хитозану (табл. 1). Полученный нами препарат имел несколько меньшую массовую долю влаги, рН при растворении в 2%-ной CH_3COOH и сопоставимую степень деацетилирования (свыше 90%), в сравнении с коммерческим препаратом фирмы SGMV Corporation (США).

Таблица 1

Сравнительный анализ полученного хитозана и коммерческого препарата

Показатель	Характеристики и значения согласно ТУ	Коммерческий препарат *	Оригинальный Препарат *
Внешний вид	Чешуйки размером 1-3 мм	Чешуйки размером 1-3 мм	Чешуйки размером 1-2 мм
Цвет	Белый с кремовым оттенком	Соответствует	Соответствует
Вкус и запах	Свойственные данному продукту, без постороннего привкуса и запаха	Соответствует	Соответствует
Растворимость в воде, этаноле, гексане, 0,1н HCl, 0,1н NaOH	Не растворим	Не растворим	Не растворим
Массовая доля влаги, %	Не более 10,0	7,34 ± 0,31	4,27 ± 0,17
рН 1%-ного раствора в 2%-ной CH_3COOH	Не более 7,5	6,60 ± 0,04	5,17 ± 0,03
Степень деацетилирования, %	Не менее 80	91,3 ± 6,1	93,0 ± 7,5

* - При двукратных независимых определениях в пяти образцах

Через 4 недели после имплантации в основной группе и группе сравнения матрицы были малоподвижны, плотно спаяны с окружающей клетчаткой. При отделении от нее обнаруживалась новообразованная сосудистая сеть регенерата и видимые признаки резорбции хитозана. Морфологическая картина на микроскопическом уровне отличалась выраженной мозаичностью и полиморфизмом клеточных элементов регенерата на месте деградирующей матрицы. Резорбция хитозана осуществлялась активированными макрофагами, которые обнаруживались поодиночке и объединенными в микроколонии на поверхности пор разрушаемого полимера, часто в их цитоплазме содержались фагоцитированные фрагменты хитозана. Замещение полимера шло за счет образования соединительнотканых и, частично, хрящевых элементов с обилием внеклеточного матрикса в соотношении 2,5 : 1 в основной группе и примерно 3,9 : 1 – в группе сравнения (табл. 2).

Через 8 недель после поставки имплантатов их подвижность при макроскопическом исследовании практически полностью утрачивалась, регенераты постепенно обобществлялись с окружающими тканями, уплотнялись и утрачивали исходную форму. При микроскопическом исследовании обнаруживалось все меньше фрагментов резорбирующегося хитозана (до 7,5% объема в основной группе, до 11,4% - в группе сравнения), уменьшалось и число фактивно фагоцитирующих клеток макрофагального ряда. Среди них встречались небольшие скопления эпителиоидных клеток. В регенерате обнаруживались участки с «разновозрастными» сосудами, находящимися на разных стадиях ангиогенеза. Аналогичным образом чередовались участки скоплений фибробластов, окруженных аморфным соединительнотканым матриксом и клетки хондрального ряда, образующие вокруг себя гиалиноподобный хрящевой матрикс. Соотношение этих тканей в 8-недельном регенерате в основной группе составляло 0,8 : 1, в группе сравнения – 1,6 : 1.

Количественные показатели морфологии регенерата на месте гетеротопической имплантации крысам матриц на основе хитозана (M ± m)

Показатель	Группа	Контроль	Сроки эксперимента	
			4 недели	8 недель
Объемная доля хитозана в регенерате, %	основная сравнения	0	16,2 ± 1,2 *#	7,5 ± 0,5 *#
			26,3 ± 1,8 *	11,4 ± 0,8 *
Объемная доля соединительной ткани, %	основная сравнения	5,5 ± 0,5	48,3 ± 3,0 *#	31,2 ± 1,9 *#
			53,4 ± 3,2 *	43,5 ± 2,8 *
Объемная доля хрящевой ткани, %	основная сравнения	0	19,2 ± 1,2 *#	39,3 ± 2,5 *#
			13,8 ± 1,1 *	27,3 ± 2,2 *
Численная плотность макрофагов, 1/мм ³	основная сравнения	18,2 ± 1,1	182,5 ± 10,3 *	116,0 ± 6,3 *
			175,8 ± 9,9 *	110,8 ± 5,9 *

* - достоверные различия с величиной показателя в контроле;

- достоверные различия между величинами показателей в группах.

Таким образом, отработана технология получения пористых матриц из оригинального хитозана с модификациями в направлении повышения итоговых хондроиндуктивных свойств. При гетеротопической имплантации в подкожную жировую клетчатку лабораторных животных, такие матрицы стимулируют образование гиалиноподобного хряща, сопоставимое, а по отдельным показателям – превосходящее аналогичное свойство матриц, изготовленных из коммерческих образцов хитозана. Пористые бесклеточные матрицы на основе хитозана обладают хорошей биосовместимостью, и могут оказаться перспективными для формирования хрящевой ткани *de novo* или для культивирования хондроцитов для нужд регенеративной биомедицины.

Литература

1. *Лябин, М.П.* Совершенствование технологии получения хитозана / М.П. Лябин, П.С. Семенов // Вестник Волгоградского гос. ун-та. Серия Естественные науки. – 2011. – вып. 2. – С. 17–22.
2. *Маланин, Д.А.* Восстановление повреждений хряща в коленном суставе: монография / Д.А. Маланин, В.Б. Писарев, В.В. Новочадов. – Волгоград: Волгоградское научное изд-во, 2010. – 518 с.
3. *Chen, J.P.* Preparation and characterization of biomimetic silk fibroin/chitosan_composite nanofibers by electrospinning for osteoblasts culture / J.P. Chen, S.H. Chen, G.J. Lai // *Nanoscale Res Lett.* – 2012. – Vol. 7, N1. – P. 170–178.
4. Chitosan scaffolds containing hyaluronic acid for cartilage tissue engineering / C.R. Correia, L.S. Moreira-Teixeira, L. Moroni [et al.] // *Tissue Eng. Part C. Methods.* – 2011. – Vol.17, N7. – P. 717–730.
5. *Di Martino, A.* Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering / A. Di Martino, M. Sittinger, M.V. Risbud // *Biomaterials.* – 2005. – Vol. 26, N30. – P. 5983–5990.
6. *Muzzarelli, R.A.* Biomedical exploitation of chitin and chitosan via mechano-chemical disassembly, electrospinning, dissolution in imidazolium ionic liquids, and supercritical drying / R.A. Muzzarelli // *Mar. Drugs.* – 2011. – Vol. 9, N9. – P. 1510–1533.
7. Proliferation and chondrogenic differentiation of CD105-positive enriched rat synovium-derived mesenchymal stem cells in three-dimensional porous scaffolds / J. Qi, A. Chen, H. You [et al.] // *Biomed. Mater.* – 2011. – Vol. 6, N1. – e015006.
8. *Roach, P.* Modern biomaterials: a review-bulk properties and implications of surface modifications / P. Roach, D. Eglin, K. Rohde, C.C. Perry // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 2007.
9. *Shi, C.* Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine / C. Shi, Y. Zhu, X. Ran, M. Wang, Y. Su, T. Cheng // *J Surg Res.* – 2006. – Vol. 133, N2. – P. 185–192.
10. *Venkatesan, J.* Chitosan_composites for bone tissue engineering - an overview / J. Venkatesan, S.K. Kim // *Mar. Drugs.* – 2010. – Vol. 8, N8. – P. 2252–2266.
11. *Yang, T.L.* Chitin-based materials in tissue engineering: applications in soft tissue and epithelial organ / T.L. Yang // *Int. J. Mol. Sci.* – 2011. – Vol. 12, N3. – P. 1936–1963.