

*на правах рукописи*

Сочилина Анастасия Владимировна

**МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И МОДИФИЦИРОВАННОЙ  
ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ СТРУКТУРНО-  
ОРГАНИЗОВАННЫХ СКАФФОЛДОВ В ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ**

Специальность 1.5.6. – Биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

**Москва-2022**

Работа выполнена в лаборатории полимеров для биологии отдела биоматериалов и бионанотехнологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

**Научный руководитель:**

Доктор химических наук **Генералова Алла Николаевна**

**Официальные оппоненты:**

**Филиппова Ольга Евгеньевна**, доктор физико-математических наук, профессор кафедры физики полимеров и кристаллов физического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

**Григорьев Тимофей Евгеньевич**, кандидат физико-математических наук, заместитель руководителя по научной работе Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

**Ведущая организация**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева» «РХТУ им. Д. И. Менделеева».

Защита состоится «12» октября 2022 г. в 11 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, ГСП-7, Москва В-437, ул. Миклухо-Макляя, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и на сайте института [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru).

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор физико-математических наук

 В.А. Олейников

## ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Одним из интенсивно развивающихся направлений современной медицины является тканевая инженерия, которая представляет собой технологию замещения участков тканей и органов, повреждённых или утраченных вследствие травм и иных причин, путем имплантации структур, называемых матрицами или скаффолдами, в комбинации с определёнными клетками и биоактивными веществами. Оптимальное сочетание физических, химических свойств и внутренней архитектоники скаффолдов обеспечивает формирование стабильных и функционально-активных тканеинженерных конструкций. Это достигается при использовании в качестве скаффолдов биосовместимых, биodeградируемых материалов, которые при отсутствии цитотоксичности, иммуногенности и пирогенности способны формировать механически прочные пористые структуры, обеспечивающие высокую адгезию клеток. В последнее время большое внимание уделяют материалам из природных полимеров и их производных, среди которых особый интерес привлекают природные полисахариды: хитозан и гиалуроновая кислота. На сегодняшний день в литературе представлено большое количество методов получения скаффолдов из данных полисахаридов. Однако актуальной задачей остаётся разработка подходов к созданию трёхмерных изделий с контролируемыми химическими и физико-механическими свойствами для адаптации к замещаемым тканям организма.

Хитозан активно используют для решения задач биотехнологии и биомедицины благодаря значительной адгезии к живым тканям, стимуляции выработки белков внеклеточного матрикса, антимикробной активности, отсутствию цитотоксичности. Сочетание этих свойств с доступностью, способностью к формированию гидрогелей за счет нековалентных взаимодействий и комплексообразованию с биологически-активными соединениями позволяет рассматривать хитозан как перспективный материал для получения структурно-организованных скаффолдов. Кроме того, необходимость «настройки» свойств скаффолдов под свойства замещаемых тканей является актуальной проблемой. Она может быть решена путем эффективного управления размерами, морфологией и механическими характеристиками скаффолдов.

Гиалуроновая кислота является одним из примеров эндогенных полимеров, которые синтезируются во многих живых организмах, включая человека, а потому *a priori* обладают хорошей биосовместимостью, низкой иммуногенностью и способностью к эффективной ферментативной деградации в организме. Гиалуроновая кислота является важным

компонентом кожи, мышц, нервов и других тканей, её взаимодействие с клетками происходит через рецепторы клеточной поверхности и влияет на формирование тканей, воспаление и морфогенез, что определяет использование этого полисахарида в качестве материала для стимулирования заживления ран и регенерации тканей. Создание скаффолдов из гиалуроновой кислоты в виде гидрогелей, организованных за счет реакции нековалентной сшивки, как в случае хитозана, не позволяет решить проблему слабой механической прочности гидрогелей. Поэтому актуальным направлением представляется разработка методов получения скаффолдов на основе гиалуроновой кислоты за счет реакции ковалентной сшивки, которая может быть проведена под действием света. Фотоиндуцированные реакции сшивки, легко адаптируемые к аддитивным технологиям (лазерная 3D-печать), позволяют создавать материалы с требуемыми физико-химическими свойствами при сохранении биосовместимости и способности к биодegradации. Кроме того, формирование скаффолдов при облучении светом может быть реализовано непосредственно в живом организме без предварительной стадии *in vitro*.

**Цель исследования:** получение скаффолдов с заданными физико-химическими свойствами и требуемой архитектуры на основе природных полисахаридов хитозана и гиалуроновой кислоты для решения задач тканевой инженерии.

**Задачи исследования:**

- 1) Разработать метод формирования нековалентно сшитых хитозановых гидрогелей, позволяющий регулировать химические и физико-механические свойства посредством изменения состава компонентов и условий процесса желирования в системе незамерзающих растворителей.
- 2) Получить гидрогели на основе комплексов хитозана и поливинилового спирта с системой ориентированных каналов при фронтальном желировании без участия токсичных сшивающих агентов.
- 3) Модифицировать гиалуроновую кислоту с помощью полимераналогичной реакции с глицидилметакрилатом для контролируемого введения винильных групп с целью проведения радикальной реакции внутри- и межмолекулярной сшивки гиалуроновой кислоты.
- 4) Разработать количественный экспресс-метод определения степени замещения групп в гиалуроновой кислоте винильными звеньями и изучить влияние этого параметра на свойства модифицированной гиалуроновой кислоты и скаффолдов на её основе.
- 5) Методами формования и экструзионной 3D-печати получить скаффолды на основе модифицированной гиалуроновой кислоты в процессе

фотоиндуцируемой сшивки излучением синего диапазона спектра при участии эндогенного соединения флавиномононуклеотида (витамин В<sub>2</sub>) в качестве фотоинициатора.

- 6) Провести фотоиндуцируемое *in situ* формирование скаффолдов на основе модифицированной гиалуроновой кислоты при участии в качестве фотоинициатора водорастворимого производного фталоцианина в модели животных под действием излучения красного диапазона спектра.
- 7) Оценка *in vitro* цитотоксичности и *in vivo* биосовместимости полученных скаффолдов на основе хитозана и модифицированной гиалуроновой кислоты.

#### **Научная новизна исследования:**

- Продемонстрирована возможность получения нековалентно сшитых нанофибриллярных водно-спиртовых гелей и гидрогелей с высоким модулем упругости при охлаждении водно-спиртовых растворов хитозана до температур выше их точки замерзания.
- Установлено, что формирование нековалентно сшитых гидрогелей с системой параллельно ориентированных каналов для направленного роста клеток (на примере линии глиомы С6) происходит в условиях фронтального желирования композиций хитозана с поливиниловым спиртом с использованием щелочи в качестве осадителя.
- Разработан экспресс-метод определения двойных связей в составе модифицированной гиалуроновой кислоты на основе реакции с перманганатом калия со спектрофотометрическим подтверждением результатов.
- Продемонстрировано, что эффективным инструментом управления свойствами при получении фотоотверждаемых скаффолдов является степень замещения групп гиалуроновой кислоты звеньями с двойными связями. Степень замещения зависит от состава и концентрации компонентов в исходной смеси, а также условий проведения полимераналогичной реакции гиалуроновой кислоты с глицидилметакрилатом.
- Установлено, что фотоиндуцируемая реакция сшивки модифицированной гиалуроновой кислоты в присутствии флавиномононуклеотида в качестве фотоинициатора позволяет получать биосовместимые скаффолды различной архитектуры (сплошные, полые и решётчатые структуры), в том числе и с живыми клетками (на примере линии HaCaT).
- Разработан подход для получения трубчатых конструкций методом экструзии модифицированной гиалуроновой кислоты в водный раствор

фотоинициатора флавинмоноклеотида при проведении реакции фотоиндуцируемой сшивки в условиях диффузии инициатора.

- Установлено, что фотоиндуцируемая сшивка фотоотверждаемых композиций на основе модифицированной гиалуроновой кислоты в присутствии водорастворимого производного фталоцианина позволяет формировать биосовместимые скаффолды непосредственно в организме под действием света (670 нм), попадающего в «окно прозрачности» ткани.

#### **Область применения и практическая значимость исследования.**

Полученные в работе скаффолды на основе ковалентно и нековалентно сшитых гидрогелей из хитозана и модифицированной гиалуроновой кислоты имеют значительный потенциал для применения в тканевой инженерии. Разработанный двухстадийный метод получения хитозановых нанопфибриллярных гидрогелей позволяет не только легко адаптировать его под современные технологии получения трёхмерных изделий, но и эффективно регулировать их свойства (размеры, морфологию поверхности, механические и оптические свойства и т.п.), подстраивая под свойства замещаемых тканей организма. Хитозановые мультиканальные гидрогели не цитотоксичны и способны обеспечивать направленный рост клеток внутри каналов, что может играть важную роль при регенерации разрывов периферических нервов. Оптимизация реакции модификации гиалуроновой кислоты глицидилметакрилатом, быстрое определение и управление степенью замещения, а также её влияние на свойства конечных продуктов позволяют максимально эффективно, с низкими затратами получать биосовместимые скаффолды из модифицированной гиалуроновой кислоты с требуемыми характеристиками для различных видов мягких тканей. Такие скаффолды можно использовать и как носители для культивирования клеток и формирования новой ткани, и как имплантаты для регенерации травмированных тканей.

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

- Условия формирования термообратимых алкогелей из водно-спиртовых растворов хитозана и получение на их основе гидрогелей с настраиваемыми размерами, морфологией, модулем Юнга и оптическими свойствами.
- Закономерности получения гидрогелей с системой ориентированных микроканалов при фронтальном осаждении композиций хитозана с поливиниловым спиртом для направленного роста клеток.
- Зависимость свойств гиалуроновой кислоты, модифицированной глицидилметакрилатом, от параметров реакций и оптимальные условия для создания скаффолдов методами фотоиндуцируемой сшивки с флавинмоноклеотидом в качестве фотоинициатора.

- Процедура создания фотокомпозиции для формирования скаффолдов на основе модифицированной гиалуроновой кислоты *in situ* в условиях живого организма под действием излучения красного диапазона спектра.

**Личный вклад автора.** Автор принимал активное участие в большей части исследований – постановка задачи и планирование, модификация гиалуроновой кислоты и определение степени замещения модифицированной гиалуроновой кислоты, подбор состава водно-спиртовых композиций хитозана и фотоотверждаемых композиций гиалуроновой кислоты, характеристика гидрогелей на основе модифицированной гиалуроновой кислоты и хитозана, проведение некоторых экспериментов *in vitro* и *in vivo*, обсуждение и литературное оформление полученных результатов.

**Апробация работы.** Основные результаты работы были доложены на XXIX Зимней молодёжной научной школе “Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии” (Москва, 2017), на XXX Зимней молодёжной научной школе “Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии” (Москва, 2018), на международной конференции Sechenov international biomedical summit (Москва, 2018), на 5-ой международной конференции Saint Petersburg OPEN 2018 International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures (Санкт-Петербург, 2018), на 13-ой международной конференции *HBSM-2018* “Hole Burning, Single Molecule, and Related Spectroscopies: Science and Applications” (Суздаль, 2018), на XXXII Зимней молодёжной научной школе “Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии” (Москва, 2020), на 7-ой Троицкой конференции с международным участием «Медицинская физика» (Москва, 2020), на 8-ой международной конференции Saint Petersburg OPEN 2021 International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures (Санкт-Петербург, 2021).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 12 оригинальных статей в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах и 8 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

**Объём и структура работы.** Диссертационная работа изложена на 132 страницах, содержит 39 рисунков, 17 схем и 4 таблицы, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающей 178 ссылок.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В настоящее время активно развивается тканевая инженерия - направление медицины, связанное с восстановлением и регенерацией повреждённых органов и тканей с помощью структурно-организованных скаффолдов. Одними из самых перспективных материалов для этой области являются полисахариды природного происхождения, такие как хитозан (ХТ) и гиалуроновая кислота (ГК). Несмотря на то, что эти полисахариды известны и активно изучаются, разработка новых подходов, позволяющих управлять свойствами скаффолдов, определяемых свойствами поражённых тканей, всё ещё остаётся актуальной задачей и её решение ведет к прогрессу в области тканевой инженерии.

### 1. Нанопфибриллярные гели на основе ХТ

Одной из важных задач тканевой инженерии является разработка способов получения скаффолдов со свойствами, настраиваемыми под конкретные дефекты ткани. Наиболее перспективными для решения этих задач являются методы формирования гелей ХТ посредством термически индуцированного разделения фаз, в частности, низкотемпературного термически индуцированного разделения фаз (low temperature thermally induced phase separation, LT-TIPS). Однако, его возможности не реализованы в полной мере, поскольку свойства гелей трудно контролировать, их структура остаётся высоко гетерогенной, а сам гель имеет низкий модуль упругости.

Было выдвинуто предположение, что при определённом соотношении полимера (ХТ), растворителя (вода) и нерастворителя (этанол), а также в зависимости от типа кислоты можно получить такую систему, в которой происходит фазовое разделение жидкость-жидкость при температуре выше точки замерзания ( $T_{fr}$ ) смеси растворителей (вода-этанол). Такая система позволяет формировать алкогели с более гомогенной структурой, высоким содержанием нанопфибрилл и улучшенными механическими характеристиками. Растворы и соответствующие им гели обозначены как ХТ- $n/EtOH-m$ , где  $n$  и  $m$  (%) — это концентрация ХТ ( $C_{ХТ}$ ) и объёмная доля спирта ( $\phi_{EtOH}$ ), соответственно. Данный метод не описан в литературе и получил название низкотемпературное термически индуцированное разделение фаз в незамерзающих условиях (LT-TIPS-NF).

#### 1.1. Особенности формирования алкогелей ХТ

Установлено, что при инкубировании раствора ХТ-2/ $EtOH$ -47,5, растворённого в  $HCl$ , при  $-18^{\circ}C$  в течение 20 мин формируется устойчивый (удерживающий форму) алкогель. Следует отметить, что при использовании



уксусной кислоты желирования не происходит. Получаемый алкогель (нестабилизированный алкогель, НСт-алкогель, Рис. 1.а) стабилен только в закрытой системе при отрицательных температурах, размягчается при нагревании и плавится при  $T > 49^{\circ}\text{C}$ . При обработке НСт-алкогеля водно-спиртовым раствором NaOH формируется опалесцирующий прозрачный алкогель, сохраняющий форму при нагреве (далее стабилизированный алкогель, Ст-алкогель, Рис. 1.а). Полученные прозрачные гели имели однородную нанофибриллярную структуру с системой взаимосвязанных наноразмерных пор (Рис. 1.а,б) в отличие от непрозрачных макропористых гелей, полученных традиционными методами, например, гидрогеля ХТ-2/EtOH-87,0 (Рис. 1.в),.

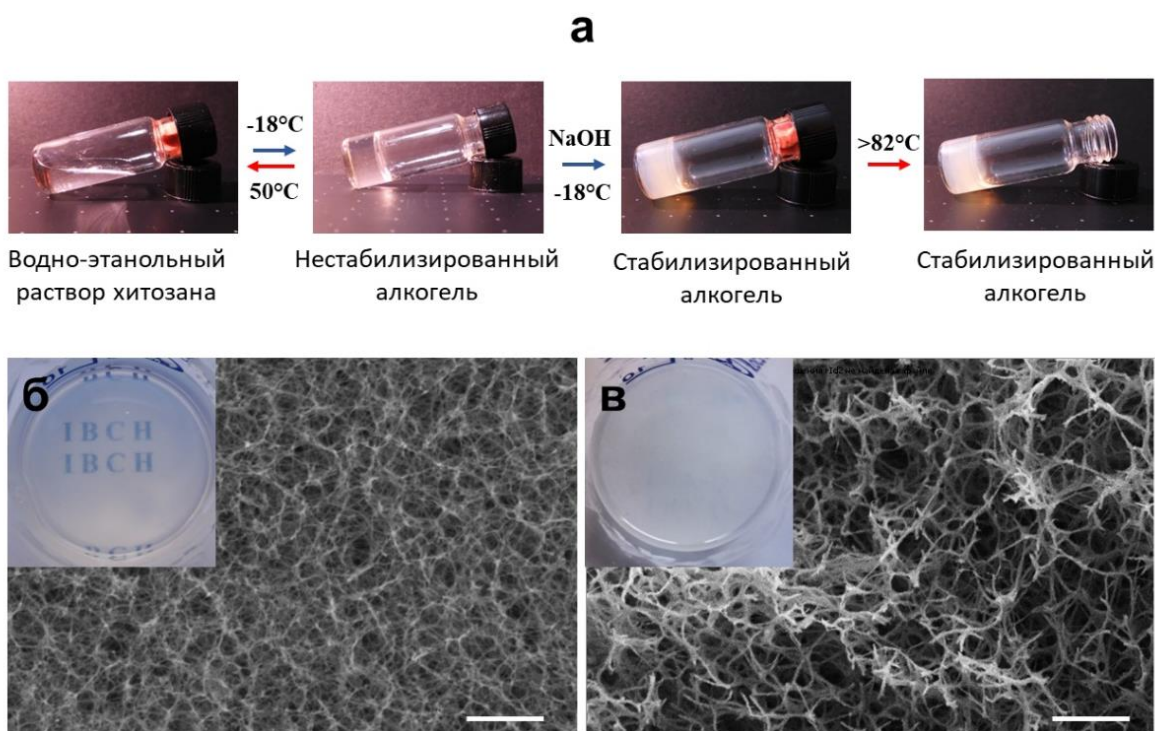


Рисунок 1. а) Схема получения алкогелей и изображения, полученные сканирующей электронной микроскопией (СЭМ), лиофильно высушенных алкогелей со вставками оптических изображений соответствующих гидрогелей: б) ХТ-2/EtOH-47,5; в) ХТ-2/EtOH-87,0. Масштабная линейка для СЭМ изображений 1 мкм.

## 1.2. Влияние различных параметров на свойства алкогелей ХТ

Для управления процессом получения прозрачных гелевых изделий сложной формы исследовали влияние температуры, концентрации ХТ и этанола на процесс LT-TIPS-NF, а также на внутреннюю структуру, оптические и механические свойства исследуемых гелей.

На примере ХТ-2/EtOH-47,5 показано, что прозрачные НСт-алкогели с разным уровнем опалесценции в зависимости от температуры охлаждения ( $T_q$ ) формируются при  $-25^{\circ}\text{C} \leq T_q \leq 5^{\circ}\text{C}$ . Понижение  $T_q$  сокращает время, необходимое для формирования алкогеля, а также приводит к повышению

твердости и точки размягчения. Установлено, что оптимальным диапазоном концентраций ХТ для протекания процесса желирования в незамерзающих условиях является  $0,5 \text{ масс.}\% < C_{\text{ХИТ}} \leq 2 \text{ масс.}\%$ . Понижение  $\phi_{\text{EtOH}}$  приводит к повышению времени желирования растворов ХТ и снижению теплостойкости НСт-алкогелей. При  $\phi_{\text{EtOH}} < 28,5 \text{ об.}\%$  все исследованные растворы не желируются при  $T_q > T_{fr}$ , а при  $\phi_{\text{EtOH}} > 47,5 \text{ об.}\%$  происходит осаждение ХТ.

### 1.3. Свойства нанопибриллярных гелей ХТ

Понижение  $C_{\text{ХИТ}}$  (при постоянном  $\phi_{\text{EtOH}}$ ) приводит к снижению жесткости гелей, а при  $C_{\text{ХИТ}} < 1 \text{ масс.}\%$  формирующиеся гели имеют значения модуля Юнга, сопоставимые со значениями для известных макропористых ХТ гелей, полученных традиционными методами осаждения (Таблица 1, контрольные гели). Следует также отметить, что замена этанола в составе Ст-алкогелей на воду приводит к снижению жесткости гелей. Примечательно, что образцы, полученные из растворов с постоянной концентрацией ХТ, но с разным содержанием спирта, после стабилизации осадителем характеризуются сопоставимыми значениями модуля Юнга (Таблица 1).

Таблица 1. Зависимость модуля Юнга при сжатии гидрогелей от состава гелеобразующего раствора.

Образец геля	$T_q, ^\circ\text{C}$	Модуль Юнга, кПа
ХТ-2/EtOH-47,5	-18	$539 \pm 54 / 973^{*} \pm 70$
ХТ-1/EtOH-47,5	-18	$248 \pm 36$
ХТ-0.75/EtOH-47,5	-30	$85 \pm 10$
ХТ-0.5/EtOH-47,5	-36	$52 \pm 7$
ХТ-2/EtOH-38,0	-18	$487 \pm 52$
ХТ-1/EtOH-38,0	-18	$194 \pm 13$
ХТ-2/EtOH-28,5	-10	$450 \pm 47 / 510^{*} \pm 64$
Контроль ХТ-2/EtOH-87,0	+22	$41 \pm 7$
Контроль ХТ-2/EtOH-0	+22	$32 \pm 6$

\* - Ст-алкогель.

Установлено, что оптические свойства алкогелей зависят не только от состава гелеобразующего раствора ( $C_{\text{ХИТ}}$ ,  $\phi_{\text{EtOH}}$ ), но и от  $T_q$  и температуры на стадии стабилизации НСт-алкогеля раствором NaOH. Прозрачность Ст-алкогелей повышается при понижении температуры,  $C_{\text{ХИТ}}$  и  $\phi_{\text{EtOH}}$ .

### 1.4. Получение изделий из гелей

Показано, что с помощью метода LT-TIPS-NF можно получать конструкции больших размеров и сложной формы, например, цилиндры с

каналами (Рис. 2.а) и полноразмерный фантом трахеи (Рис. 2.б). Пользуясь свойством термообратимости НСт-алкогелей, можно управлять формой изделия после извлечения из формы и нагрева выше температуры желирования, но ниже температуры размягчения. Так, были получены спиралевидные изделия из цилиндрических стержней (Рис. 2.в).

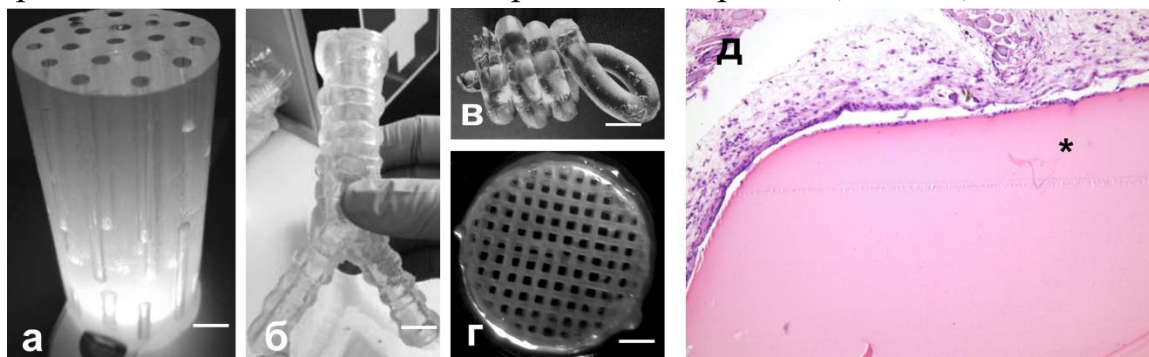


Рисунок 2. Фотографии гидрогелевых продуктов, сделанных различными методами: а,б) литьё в форму; б) изменение формы изделия после молдинга; в) 3D-печать. Масштабные линейки: а – 1 мм, б – 1,5 см, в – 6 мм, г – 2 мм. д) Гистологический срез гидрогелей ХТ-2/EtOH-47,5 и окружающих тканей, извлечённых на 14-ый день после имплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Звёздочка обозначает гидрогель.

В серии экспериментов показано, что при использовании раствора ХТ-2/EtOH-47,5 методом экструзионной 3D-печати ( $T_q = -11^{\circ}\text{C}$ ) можно получить решётчатую цилиндрическую структуру (Рис. 2.г).

### 1.5. *In vitro* и *in vivo* испытания

Экстракт-тест с использованием клеток НерG2 показал незначительное снижение жизнеспособности клеток, вероятно, вызванное снижением количества специфических компонентов полной культуральной среды, используемой для получения экстрактов, а не выделением цитотоксичных продуктов из геля. При прямом контакте с нанопибриллярными гелями клетки НерG2 прикрепляются и растут на поверхности гидрогеля.

Гистологический анализ подкожно имплантированных образцов продемонстрировал слабую воспалительную реакцию и гомогенную структуру образцов, извлечённых после эксперимента, для всех временных промежутков (Рис. 2.д). Полученные данные свидетельствуют о хорошей биосовместимости нанопибриллярных гелей, слабой воспалительной реакции организма на их имплантацию и формировании тонкой соединительно-тканной капсулы вокруг гидрогелей в течение 1 месяца эксперимента. Показана незначительная степень биодеградации на 30-ый день эксперимента.

## **2. Гидрогели с системой направленных каналов на основе ХТ**

Несмотря на преимущества метода LT-TIPS-NF получения гидрогелей ХТ с управляемой морфологией и высоким модулем упругости, существуют трудности при формировании гидрогелей с системой ориентированных микроканалов, имеющих размеры, необходимые для направленного роста клеток. Эта задача представляет особый интерес для регенерации периферических нервов и восстановления тканей с высоким уровнем васкуляризации.

Анализ литературных данных позволил предположить, что критическим условием формирования гидрогелей с системой направленных каналов является наличие малой степени сшивки макромолекул перед желированием. Для соблюдения этого критического условия в качестве объекта исследований был выбран биосовместимый синтетический полимер – поливиниловый спирт (ПВС), который способен формировать комплексы с ХТ.

Найдено, что при фронтальном осаждении раствором NaOH (осадитель) кислых растворов ХТ в комплексе с ПВС в ходе осаждения формируются параллельно ориентированные вдоль направления диффузии осадителя каналы.

### **2.1. Структура гидрогелей с системой направленных каналов и особенности её формирования**

Поверхностная зона, соответствующая зоне начального контакта с раствором осадителя, не содержит ориентированных структур (Рис. 3.б). В зависимости от условий гелеобразования размер поверхностной зоны составляет от ~ 30 мкм до ~ 1 мм. Ниже неё расположена зона формирования и роста каналов (канальная зона). Диаметр каналов составляет более 10 мкм.

Данные микроскопических исследований показали, что толщина поверхностной зоны зависит от концентрации NaOH в растворе, наслаиваемом на композицию, и концентрации HCl в ее составе. С понижением концентрации HCl (при постоянной концентрации NaOH) и повышением концентрации NaOH (при постоянной концентрации HCl) толщина поверхностной зоны увеличивается. Например, для композиции, содержащей 1,5 масс.% ПВС, толщина этой зоны изменяется от ~ 40 мкм ( $C_{\text{NaOH}} 0,5 \text{ масс.}\%$ ) до ~ 300 мкм ( $C_{\text{NaOH}} = 6 \text{ масс.}\%$ ).

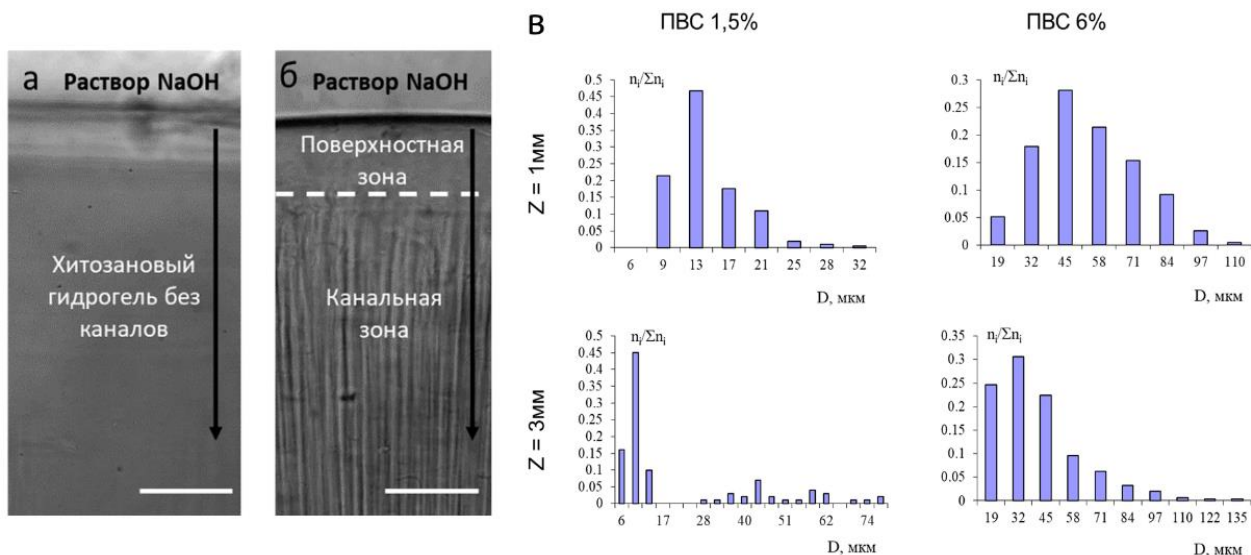


Рисунок 3. ХТ гидрогели а) без каналов (не содержат ПВС); б) содержащие параллельно ориентированные каналы (содержат ПВС). Стрелка указывает направление движения диффузии NaOH. в) Распределение диаметров каналов у образцов с различным содержанием ПВС на разной глубине (Z).

Исследование влияния ПВС на формирование канальной системы в геле показало, что каналы формируются при  $C_{\text{ПВС}} \geq 0,375$  масс.%. Они распределены неравномерно с постепенным изменением количества и диаметра каналов с увеличением расстояния от поверхности. Повышение  $C_{\text{ПВС}}$  без изменения концентраций ХТ и HCl приводит к формированию каналов в более глубоких слоях. При этом повышение содержания ПВС от 0,375 до 1,5 масс.% сопровождается увеличением числа каналов на единицу площади, а увеличение  $C_{\text{ПВС}}$  до 6 масс.% приводит к уменьшению количества каналов и росту их среднего диаметра. (Рис. 3.в).

Однократный цикл замораживания-оттаивания (криообработка) ряда образцов приводит, при сохранении параллельной ориентации каналов, к увеличению их среднего диаметра и более узкому распределению по размерам (Рис. 4.). Полученные данные свидетельствуют о том, что ПВС в концентрации более 1 масс.% выступает в роли крио-стабилизатора.

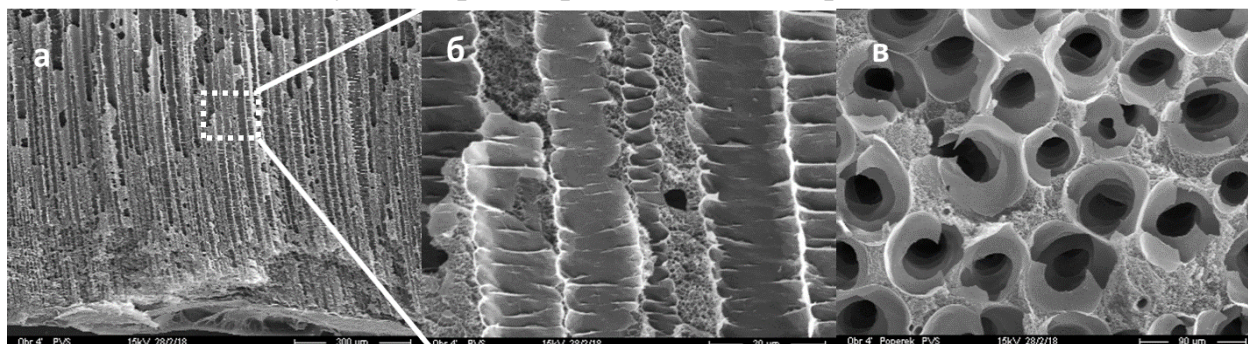


Рисунок 4. Изображения СЭМ на глубине 5 мм лиофильно высушенных а,б) продольных и в) поперечных срезов канальных гидрогелей, содержащих 1,5 масс.% ПВС, после однократного цикла замораживания-оттаивания.

## 2.2. *In vitro* испытания

Биологические испытания проводили с гидрогелями, имеющими наименьшую глубину поверхностной зоны, которые были получены из композиции: 1,5 масс.% ПВС, 0,36 об.% HCl, 1,5 масс.% NaOH.

Результаты МТТ теста показали, что для всех контрольных точек жизнеспособность клеток превышала 80% (Рис. 5. а).

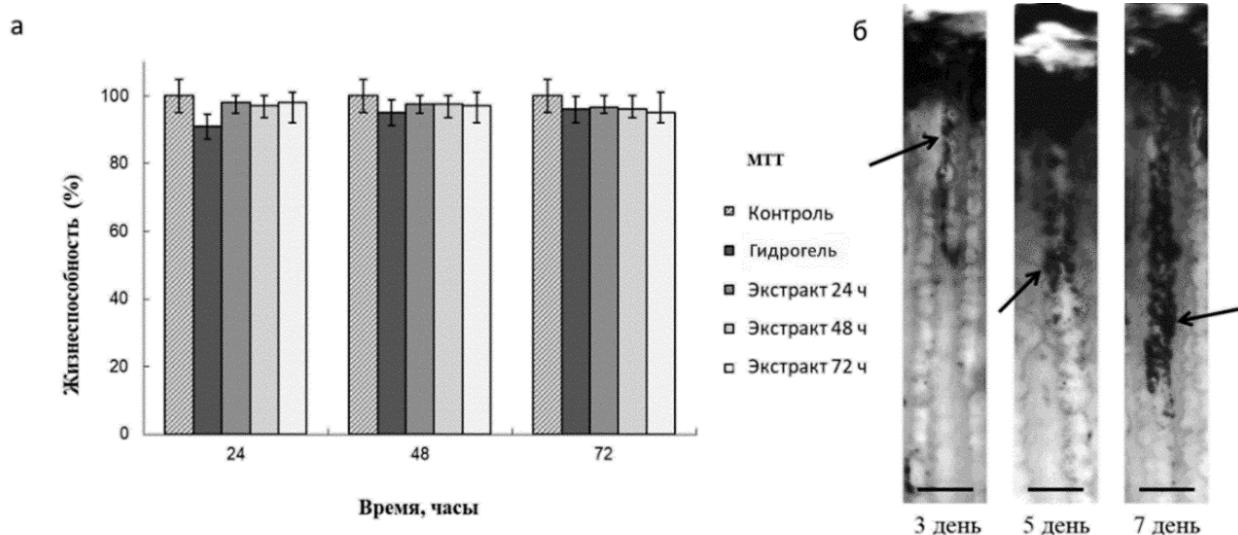


Рисунок 5. а) Оценка цитотоксичности канальных гидрогелей с помощью МТТ теста. б) Продольный срез канальных гидрогелей на 3, 5 и 7 дни культивирования культуры клеток глиомы С6 после обработки МТТ реагентом. Чёрные стрелки указывают на кристаллы формазана в каналах, свидетельствующие о наличии активных клеток. Масштабная линейка 100 мкм.

Способность ХТ гидрогелей с системой параллельно ориентированных каналов обеспечивать направленный рост клеток оценивали с использованием культуры клеток глиомы С6. Клетки наносили на поверхность образцов со срезанной верхней частью канальных гидрогелей ( $h \sim 1$  мм) и культивировали в течение 7 дней. Характер роста оценивали по результатам МТТ-теста. В течение первых трех суток наблюдался рост клеток преимущественно на поверхности канальных гидрогелей с последующим прорастанием внутрь каналов на 5-7 сутки культивирования (Рис. 5.б).

Таким образом, в ходе работы был разработан подход для получения гидрогелей на основе ХТ с системой параллельно ориентированных каналов для направленного роста клеток, размеры и количество которых легко настраиваются путем изменения концентрации ПВС, а также проведения процедуры криожелирования.

### 3. Гидрогели гиалуроновой кислоты, полученные в реакциях фотоиндуцированной сшивки

Получение скаффолдов из гиалуроновой кислоты в виде гидрогелей за счет реакции нековалентной сшивки, как в случае хитозана, не позволяет решить проблему слабой механической прочности данных гидрогелей. Одним из перспективных вариантов образования ковалентной связи является фотоиндуцированная реакция сшивки (фотоотверждение) производных ГК. Важным преимуществом этого направления является не только возможность эффективно управлять свойствами скаффолдов на основе модифицированной ГК, но и легкая адаптация процесса формирования скаффолдов под методы аддитивных технологий (например, для лазерной 3D-печати).

#### 3.1. Введение винильных групп в ГК

Наиболее перспективным подходом к модификации ГК является введение групп, содержащих двойные связи, способные к фотоиндуцированной радикальной реакции сшивки. Такой подход открывает широкий набор методов получения скаффолдов на основе модифицированной ГК (мГК) с помощью лазерных технологий.

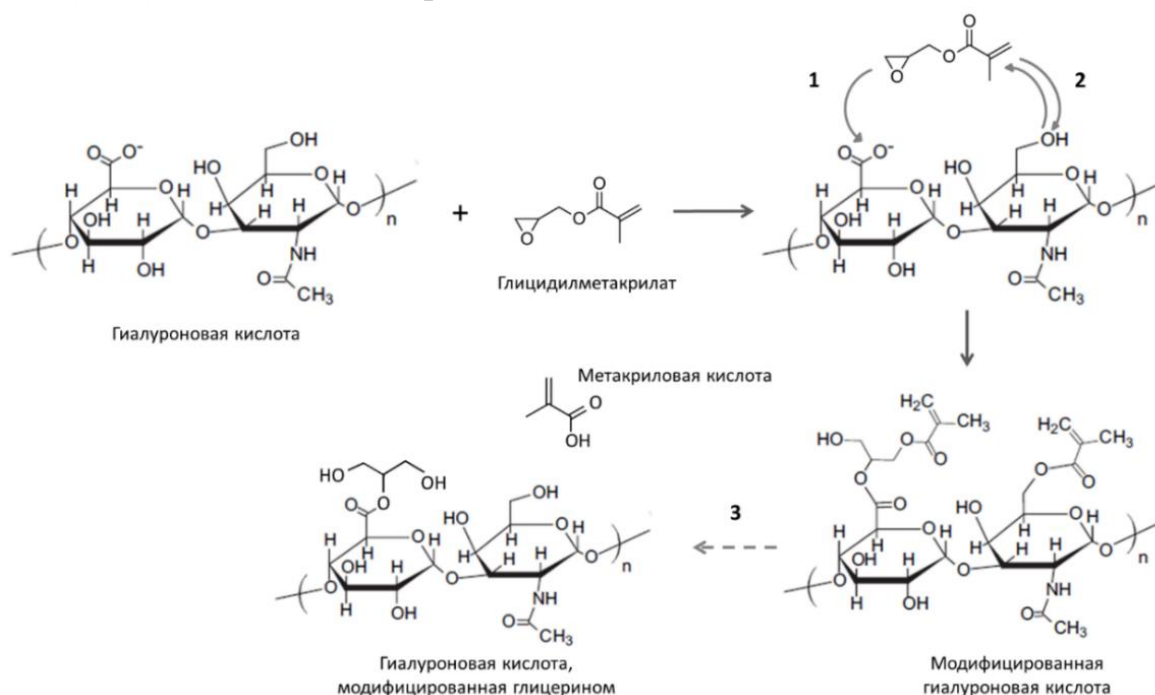


Схема 1. Схема реакции модификации ГК. 1) Необратимая реакция присоединения ГМА через раскрытие эпоксидного кольца; 2) обратимая реакция перезтерификации; 3) побочная реакция гидролиза ГМА.

В данной работе для получения мГК, содержащей винильные группы, проводили одностадийную гомофазную полимераналогичную реакцию ГК с глицидилметакрилатом (ГМА) в водно-органической среде (Схема 1.).

Реакция проходила в следующих условиях: 0,78 масс.% водный раствор ГК, вода/диметилформамид = 1,5/1, ГК/ГМА (г/мл) = 1/18, 25 °С, 4 суток, нейтральный рН (6,5). В этих условиях получены образцы, в которых степень замещения групп ГК звеньями с двойной связью составила 39%.

### 3.2. Разработка метода определения концентрации двойных связей

Концентрация винильных групп, которая может быть представлена в виде степени замещения (СЗ) групп полимера остатками ГМА, является ключевым параметром при получении производных ГК. СЗ влияет не только на степень сшивки, но и отвечает за механические, химические и биологические свойства скаффолдов. Для определения концентрации винильных групп была разработана экспресс-методика количественного определения СЗ с помощью цветной реакции Вагнера (окисления двойных связей перманганатом калия) со спектрофотометрическим подтверждением результатов. Верификация разработанного метода была проведена с помощью данных ИК- и ЯМР-спектроскопии

### 3.3. Влияние условий и состава реакционной смеси на СЗ мГК

Управление СЗ является инструментом для получения скаффолдов с заданными свойствами. В работе продемонстрирована возможность контролируемого управления СЗ путем изменения параметров реакции (состава и концентрации компонентов, условий реакции). Для этого были получены образцы мГК из реакционной смеси с различным рН и содержанием ГМА при изменении времени и температуры реакции, и определена степень замещения винильными группами.

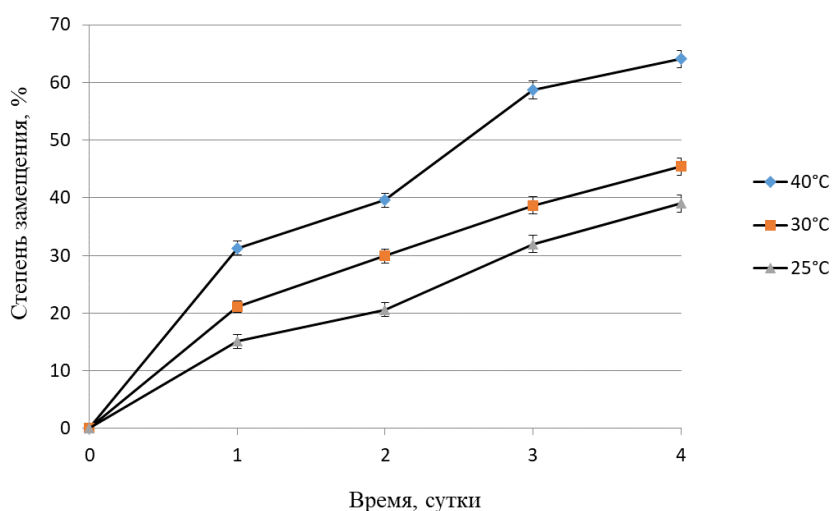


Рисунок 6. Зависимость СЗ в мГК от времени и температуры.

Найдено, что в щелочной среде СЗ в образцах была почти в 2 раза ниже (21%), чем в кислой и нейтральной среде (~39%) при остальных одинаковых



условиях. Согласно литературным данным, при щелочном pH наряду с реакцией присоединения винильных групп протекает гидролиз (Схема 1.), что снижает СЗ в конечном продукте (~21%). Увеличение продолжительности реакции более 4 суток практически не влияло на СЗ. Повышение температуры проведения процесса с 25° до 30° или 40°C позволило уменьшить время реакции и повысить СЗ (Рис. 6.). При увеличении концентрации ГМА в системе можно достичь СЗ на уровне 70%.

### 3.4. Получение скаффолдов

Для получения скаффолдов изготавливали специальные фотоотверждаемые композиции (ФОК) – вязкие растворы на основе мГК, способные к фотоиндуцированной сшивке под действием лазерного излучения. Для активации процесса сшивки использовали фотоинициатор II типа – эндогенный нетоксичный флавиномононуклеотид (витамин В<sub>2</sub>, (ФМН)) совместно с соинициатором триэтаноломином. Скаффолды из мГК получали, применяя различные лазерные технологии: фотоотверждение в открытой с двух сторон силиконовой форме (спейсер), зажатой между двумя стёклами, экструзионную 3D-печать и экструзию композиции мГК в раствор с фотоинициаторами для получения полых трубчатых структур. Во всех случаях ФОК облучали светом из синего диапазона спектра (450 нм) для активации пары инициатор/соинициатор (ФМН/триэтанолламин) и запуска реакции радикальной сшивки привитых винильных групп. Работу проводили совместно с Федеральным научно-исследовательским центром “Кристаллография и фотоника” Российской академии наук.

Скаффолды, полученные облучением ФОК в силиконовом спейсере, использовали для изучения свойств в зависимости от СЗ и оценки внутренней морфологии с помощью СЭМ (Рис. 7.). Следует отметить, что пористая структура скаффолдов наблюдается только после инкубации образцов в воде.

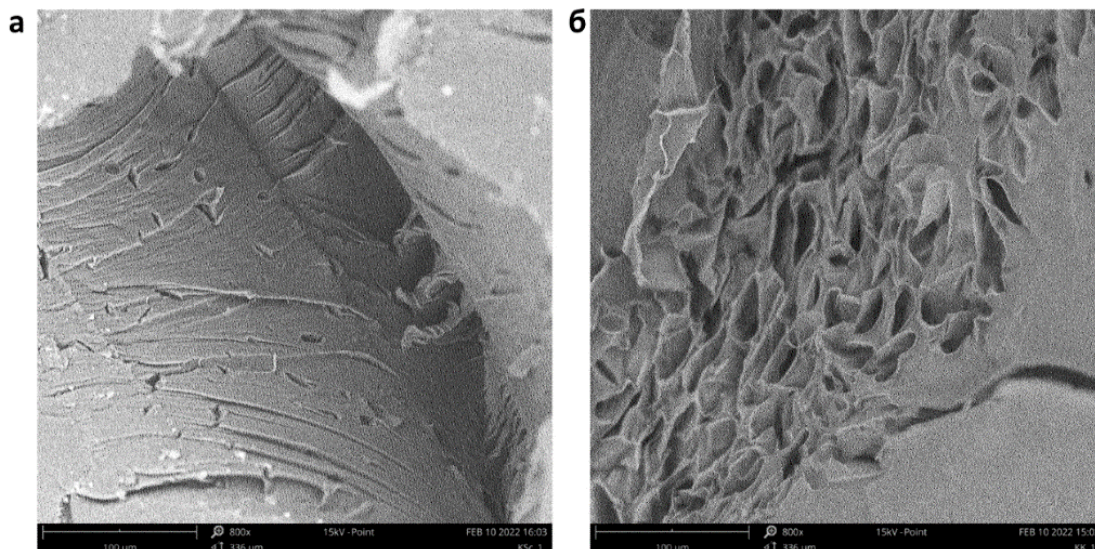


Рисунок 7. СЭМ изображение лиофильно высушенных гидрогелей мГК а) без предварительной инкубации в воде, б) после набухания в воде. Масштабная линейка 100 мкм.

В ходе работы был разработан подход к формированию полых трубчатых скаффолдов облучением вязкого раствора мГК при экструзии из шприца в ванну с раствором фотоиницирующей системы (Рис. 8). Толщина стенок таких скаффолдов определяется диффузией фотоинициаторов и зависит от времени облучения. Разработанный способ также позволяет формировать трубчатые скаффолды с включёнными в них живыми клетками на стадии приготовления ФОК.

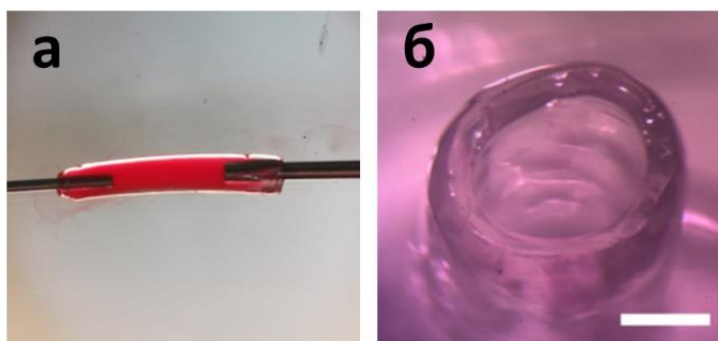


Рисунок 8. Фотографии полых трубчатых скаффолдов: а) при пропускании окрашенной жидкости; б) поперечный срез. Масштабная линейка 1 мм.

### 3.5. Влияние СЗ на свойства растворов мГК и скаффолдов на их основе

Вязкость оказывает большое влияние на параметры 3D-печати. Значительное снижение кинематической вязкости разбавленных растворов мГК при повышении СЗ, вероятно, связано с уменьшением концентрации заряженных групп после реакции модификации и увеличением количества гидрофобных звеньев ГМА (Рис. 9.а). Данная тенденция сохраняется и для динамической вязкости ФОК.

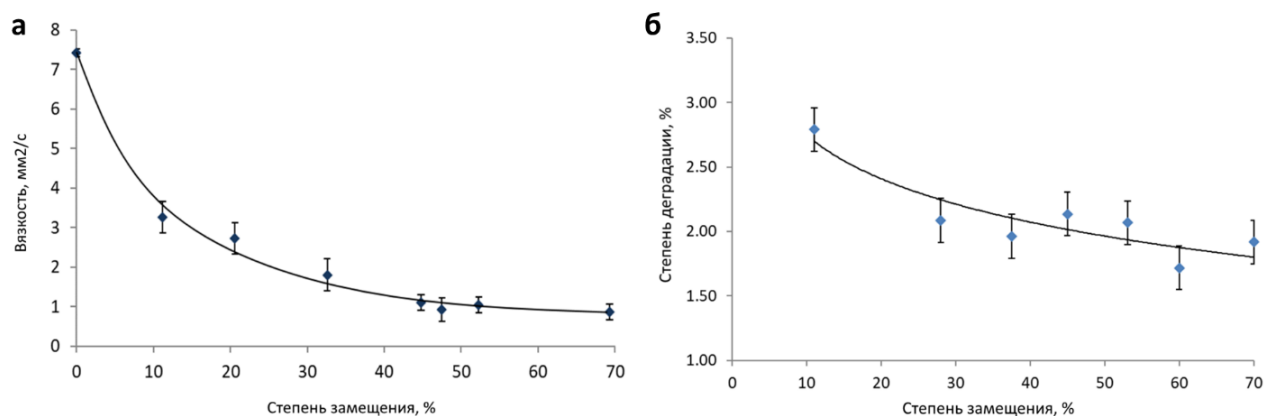


Рисунок 9. а) Зависимость кинематической вязкости водных растворов мГК (0,5 масс.%) от СЗ. б) Зависимость степени ферментативной деградации мГК в фотосшитых гидрогелях на её основе от СЗ.

При экструзионной 3D-печати оптимальным диапазоном СЗ мГК оказался 30–55%. Такая СЗ обеспечивает вязкость, необходимую для получения скаффолдов в виде изделия с требуемыми свойствами.

Коэффициент набухания полученных скаффолдов имел зависимость от СЗ, схожую с зависимостью вязкости: резкое падение с 2000% до 500%.

Найдено, что происходит снижение степени ферментативной деградации растворов мГК в присутствии гиалуронидазы с 56% до 27% при увеличении СЗ с 0% (немодифицированная ГК) до 69%. Аналогичная зависимость наблюдалась и для скаффолдов мГК (Рис. 9.б). Таким образом, вариация СЗ позволяет контролировать биodeградацию мГК.

Модуль Юнга при сжатии увеличивался с повышением СЗ, резко возрастая после СЗ 46% почти до 2 МПа. Гидрогели из мГК с СЗ 46% имели модуль Юнга равный  $0,8 \pm 0,15$  МПа, который попадает в диапазон модулей Юнга мягких тканей в физиологических условиях, включая кровеносные сосуды (0,701-10,7 МПа). Это определяет перспективность использования данных скаффолдов для замещения мягких тканей.

### 3.6. *In vitro* результаты

Все полученные виды скаффолдов на основе мГК продемонстрировали отсутствие цитотоксичности, а также прикрепление и рост клеток на их поверхности.

Исследование жизнеспособности клеток, введенных в ФОК, из которой получали трубчатые скаффолды методом экструзии, проводили на клеточной линии кератиноцитов человека HaCaT. Клетки имели высокую степень выживаемости и равномерное распределение внутри стенок трубчатых скаффолдов (Рис. 10).

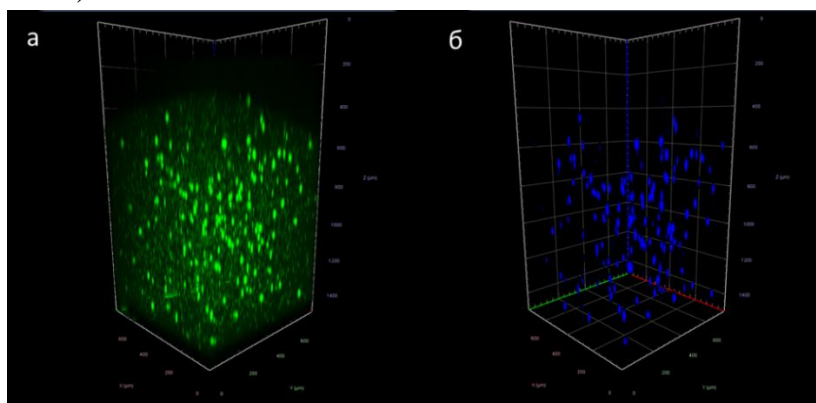


Рисунок 10. Изображения, полученные с использованием конфокальной микроскопии, трубчатых скаффолдов с включенными живыми клетками HaCaT после 6 дней инкубации, полученная Z-наложением фотографий и окрашенная: а) Кальцеином АМ; б) Hoechst 33342.

### 3.7. *In vivo* эксперименты

Гидрогели, полученные облучением ФОК в силиконовом спейсере, имплантировали мышам подкожно в область спины. Гистологический анализ показал слабую воспалительную реакцию и формирование тонкого слоя грануляционной ткани вокруг скаффолда без признаков рубцевания (Рис. 11.).

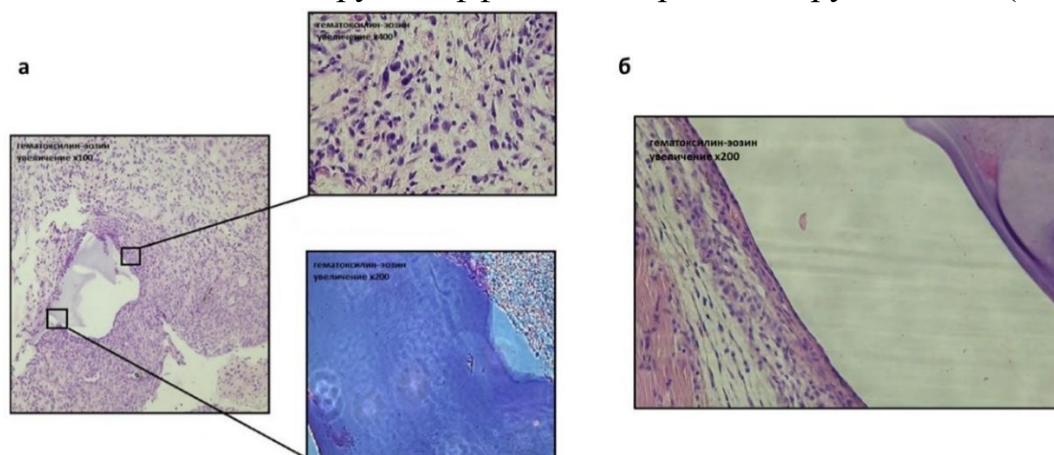


Рисунок 11. Гистологические срезы подкожно имплантированных мГК гидрогелей с окружающими их тканями. а) Срез через 2 недели после имплантации, на верхней вставке продемонстрирована макрофагальная резорбция имплантированного материала, на нижней вставке показана окраска скаффолда в базофильный (синий) цвет. б) Срез через 4 недели после имплантации.

Несмотря на отсутствие признаков интеграции скаффолда в ткани организма, данный эксперимент показал, что получаемые гидрогелевые скаффолды на основе мГК биосовместимы и вызывают минимальную воспалительную реакцию при имплантации.

Скаффолды, не содержащие и содержащие нейротрофические факторы мозга, использовали для изучения влияния трансплантации и воздействия нейротрофических факторов BDNF и GDNF на функционирование центральной нервной системы после моделирования черепно-мозговой травмы (ЧМТ) у мышей. Работу проводили совместно с Нижегородским государственным университетом имени Н. И. Лобачевского. Трансплантация как пустых скаффолдов, так и скаффолдов с нейротрофическими факторами достоверно снижала развитие неврологического дефицита у животных с ЧМТ. При этом в тесте на обучение животные, содержащие скаффолды с GDNF, показали результаты лучше, чем у всех остальных групп (Рис. 12.).

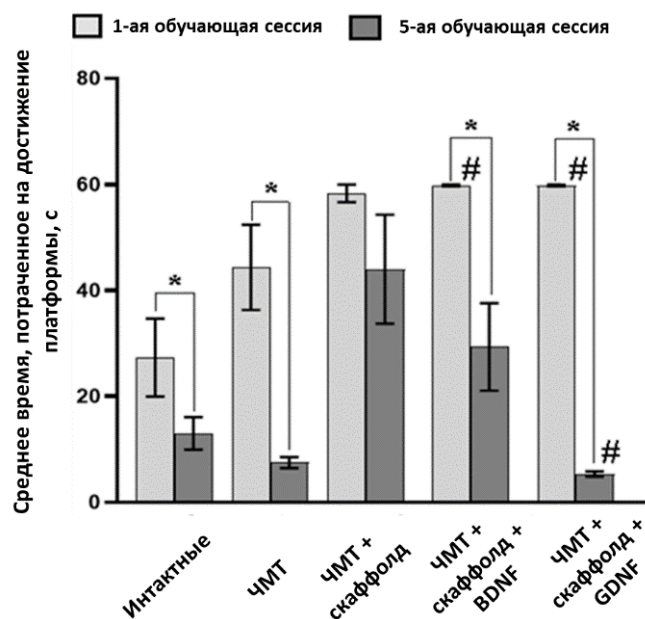


Рисунок 12. Анализ обучающей способности мышей в тесте Морриса (водный лабиринт) после ЧМТ с последующей трансплантацией скаффолдов; \* - по отношению к 1-ой обучающей сессии, # - по отношению к интактной группе,  $p < 0,05$ , тест Манна-Уитни.

Гистологическое исследование тканей коры головного мозга вокруг имплантированных скаффолдов, нагруженных нейротрофическими факторами, продемонстрировало позитивную динамику в морфологических изменениях мозговых тканей. Спустя 6 месяцев после имплантации наблюдалось уменьшение отёчности и отсутствие выраженных воспалительных реакций, а также присутствовали признаки регенеративных процессов на всём промежутке наблюдений, особенно в случае введения GDNF в скаффолды.

### 3.8. Получение скаффолдов *in situ* фотоотверждением в окне прозрачности тканей организма.

В данной работе продемонстрирована возможность внедрения малоинвазивной технологии, основанной на фотоиндуцированном формировании гидрогелевых структур *in situ*. Стояла задача исследования этого процесса, которая включала подбор состава ФОК, условий ее введения и фотоотверждения в глубине ткани под действием видимого света. Для активации процесса использовали фотоинициатор II типа водорастворимый пиридин-замещённый фталоцианин, имеющий пик поглощения в диапазоне 590-740 нм. Гидрогели формировали при подкожном введении ФОК с помощью шприца, и облучении светом с длиной волны 670 нм. В течение всего эксперимента (2 месяца) жизнеспособность мышей с подкожно фотоотверждёнными гидрогелями не менялась, не выявлено внешних

признаков интенсивного воспаления или аллергической реакции. С помощью системы IVIS spectrum – доклинической системы 2D и 3D *in vivo* визуализации – скаффолд можно было визуализировать, благодаря флуоресценции водорастворимого фталоцианина (Рис.13). Работа на системе IVIS spectrum проведена совместно с Инновационным центром “Сколково”.

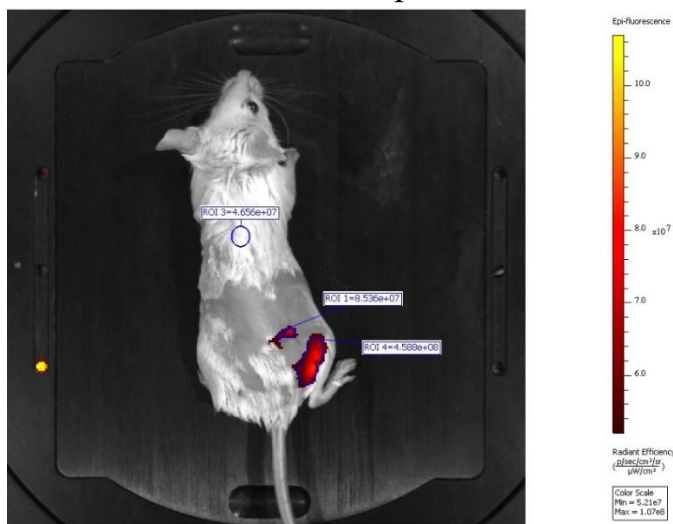


Рисунок 13. Визуализация скаффолда через месяц после начала эксперимента с использованием доклинической системы *in vivo* визуализации IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer, США).

Таким образом, проведена успешная реакция фотосшивки в условиях тканей организма, которые оказывают существенное влияние на требования к фотокомпозиции. Показано, что ФОК, включающая мГК и фотоинициатор на основе фталоцианина, который выступает также в качестве визуализирующей метки, имеет большой потенциал для развития технологии 3D печати *in situ* при облучении светом из «окна прозрачности» биоткани.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан двухстадийный метод желирования водно-спиртовых растворов хитозана при охлаждении до температуры, превышающей температуру замерзания смеси растворителей, с последующей их фиксацией водно-спиртовым раствором щёлочи для получения скаффолдов с контролируемой системой взаимосвязанных наноразмерных пор и фибрилл, определяющих их свойства. В данном методе заложен простой способ управления размерами, формой, внутренней морфологией и модулем Юнга скаффолдов путем изменения концентрации компонентов исходной смеси и осадителя.

2. Установлено, что формирование скаффолдов на основе гидрогелей хитозана с ориентированными каналами для направленного роста клеток

происходит без использования токсичных сшивающих агентов в присутствии осадителя при добавлении поливинилового спирта, который определяет процесс каналообразования и свойства каналов.

3. Показано, что ключевым параметром при модификации гиалуроновой кислоты с использованием полимераналогичной реакции с глицидилметакрилатом является концентрация введённых винильных групп (степень замещения). Она зависит от параметров реакции, определяет свойства исходной фотокомпозиции и влияет на реакции внутри- и межмолекулярной фотосшивки модифицированной гиалуроновой кислоты.

4. Разработан количественный экспресс-метод определения винильных групп в молекулах различных полимеров на основе реакции с перманганатом калия, результаты которой подтверждаются спектрофотометрически.

5. Продемонстрировано, что в зависимости от степени замещения, состава фотокомпозиции, дозы и времени облучения фотоиндуцируемая реакция сшивки модифицированной гиалуроновой кислоты в присутствии эндогенного фотоинициатора флавиномононуклеотида, позволяет получать скаффолды различной архитектуры (сплошные, полые и решётчатые структуры) при использовании лазерных технологий.

6. Показано, что фотоиндуцируемая излучением из красного диапазона спектра реакция сшивки модифицированной гиалуроновой кислоты в присутствии производного фталоцианина в роли фотоинициатора позволяет создавать 3D структуры заданных размеров непосредственно в живом организме малоинвазивным способом.

7. Результаты *in vitro* и *in vivo* исследований полученных скаффолдов на основе хитозана и модифицированной гиалуроновой кислоты продемонстрировали отсутствие цитотоксичности и биосовместимость с тканями живых моделей (мышей).

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Sochilina A. V., Savelyev A. G., Demina P. A., Sizova S. V., Zubov V. P., Khaydukov E. V., Generalova A. N. Quantitative detection of double bonds in hyaluronic acid derivative via permanganate ion reduction //Measurement Science and Technology. – 2019. – Т. 30. – №. 7. – С. 075102.
2. Sochilina A. V., Budylin N. Y., Gamisonia A. M., Chalykh A. E., Zubov V. P., Vikhrov A. A. Multichannel hydrogel based on a chitosan–poly (vinyl alcohol) composition for directed growth of animal cells //Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2019. – Т. 184. – С. 110495.
3. Später T., Mariyanats A. O., Syachina M. A., Mironov A. V., Savelyev A. G., Sochilina A. V., Menger M. D., Vishnyakova P. A., Kananykhina E. Y., Fatkhudinov T. Kh., Sukhikh G. T., Spitkovsky D. D., Katsen-Globa A., Laschke M. W., Popov V. K. *In vitro*

- and *in vivo* analysis of adhesive, anti-inflammatory, and proangiogenic properties of novel 3D printed hyaluronic acid glycidyl methacrylate hydrogel scaffolds for tissue engineering //ACS Biomaterials Science & Engineering. – 2020. – Т. 6. – №. 10. – С. 5744-5757.
4. Сочилина А. В., Савельев А. Г., Акасов Р. А., Зубов В. П., Хайдуков Е. В., Генералова А. Н. Получение модифицированной гиалуроновой кислоты с контролируемым содержанием винильных групп с целью создания скаффолдов методом фотоиндуцируемой реакции сшивки //Биоорганическая химия. – 2021. – Т. 47. – №. 4. – С. 486-494.
  5. Savelyev A. G., Sochilina A. V., Borodina T. N., Akasov R. A., Kapitannikova A. Yu., Sholina N. V., Zvyagin A. V., Generalova A. N., Khaydukov E. V. Facile Cell-Friendly Hollow-Core Fiber Diffusion-Limited Photofabrication //Frontiers in bioengineering and biotechnology. – 2021. – Т. 9.
  6. Sochilina A. V., Akasov R. A., Arkharova N. A., Klechkovskaya V. V., Mironov A. V., Prostyakova A. I., Sholina N. V., Zubov V. P., Generalova A. N., Vikhrov, A. A. Fabrication of moldable chitosan gels via thermally induced phase separation in aqueous alcohol solutions //International Journal of Biological Macromolecules. – 2022. – Т. 215. – С. 501-511.
  7. Savelyev A. G., Sochilina A. V., Akasov R. A., Mironov A. V., Semchishen V. A., Generalova A. N., Khaydukov E. V., Popov V. K. Extrusion-based 3D printing of photocurable hydrogels in presence of flavine mononucleotide for tissue engineering //Современные технологии в медицине. – 2018. – Т. 10. – №. 1. – С. 88-92. .
  8. Novozhilova M. O., Mishchenko T. A., Savelyev A. G., Sochilina A. V., Khaydukov E. V., Vedunova M. V. Evaluation of the effectiveness of scaffolds based on hyaluronic acid glycidyl methacrylate as a possible platform for brain treatment //Opera Medica et Physiologica. – 2020. – Т. 7. – №. 4. – С. 22-34.
  9. Sochilina A. V., Savelyev A. G., Demina P. A., Ierusalimsky N. V., Khochenkov D. A., Akasov R. A., Sholina N. V., Khaydukov E. V., Generalova A. N. Controlled modification of hyaluronic acid for photoinduced reactions in tissue engineering //Journal of Physics: Conference Series. – IOP Publishing, 2018. – Т. 1124. – №. 3. – С. 031014.
  10. Sochilina A. V., Savelyev A. G., Sholina N. V., Karimov D. N., Nechaev A. V., Khaydukov E. V., Generalova A. N. Nanohybrid scaffolds with luminescent remote control //EPJ Web of Conferences. – EDP Sciences, 2018. – Т. 190. – С. 04022.
  11. Khaydukov E. V., Rocheva V. V., Savelyev A. G., Khaydukov K. V., Asharchuk I. M., Nechaev A. V., Khochenkov D. A., Sochilina A. V., Semchishen V. A., Generalova A. N. Emerging upconversion nanoparticles for industry and biomedical application //EPJ Web of Conferences. – EDP Sciences, 2018. – Т. 190. – С. 03005.
  12. Мариянац А. О., Акасов Р. А., Миронов А. В., Сочилина А. В., Савельев А. Г., Хайдуков Е. В., Попов В. К. 3D принтинг гиалуроновых матриц для тканеинженерных конструкций //Гены и Клетки. – 2019. – Т. 14. – №. 5. – С. 145-146.