

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

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

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук
Генералова Алла Николаевна

Москва-2022

Оглавление

Список основных сокращений	6
Введение	8
Глава 1. Обзор литературы	13
1.1. Регенеративная медицина и тканевая инженерия	13
1.2. Материалы для формирования скаффолдов	15
1.2.1. Синтетические полимеры	16
1.2.2. Природные полимеры	18
1.3. Гидрогели	22
1.3.1. Ковалентно сшитые гидрогели	23
1.3.1.1. Получение гидрогелей при участии химических реакций	24
1.3.1.2. Фотоиндуцированные реакции сшивки, типы фотоинициаторов	27
1.3.1.3. Основные фотоиндуцируемые реакции для получения гидрогелей	31
1.3.2. Нековалентно сшитые гидрогели	33
1.4. Методы формирования скаффолдов	35
1.4.1. Формование (молдинг)	35
1.4.2. Трёхмерная (3D) печать	36
1.4.3. Газовое вспенивание	38
1.4.4. Замораживание-оттаивание	39
1.4.5. Электроспиннинг	39
1.4.6. Выщелачивание порогенов	40
1.4.7. Формирование ориентированных каналов в процессе осаждения	40
Глава 2. Материалы и методы	42
2.1. Материалы	42
2.2. Методы	42
2.2.1. Модификация ГК, характеристика мГК	42
2.2.1.1. Полимераналогичная реакция ГК с глицидилметакрилатом (ГМА)	42
2.2.1.2. Калибровка перманганата калия и определение содержания двойных связей в ГМА	43
2.2.1.3. Определение СЗ в мГК перманганатометрией	44
2.2.1.4. ИК-Фурье спектроскопия мГК	44
2.2.1.5. ЯМР спектроскопия мГК	44
2.2.2. Получение гидрогелей и скаффолдов на их основе	45
2.2.2.1. Получение ХТ нанопибриллярных гелей (НФГ) низкотемпературным термоиндуцированным разделением фаз в незамерзающих условиях	45
2.2.2.2. Получение ХТ гидрогелей с системой направленных каналов (ГНК)	46
2.2.2.3. Изготовление фотоотверждаемых композиций (ФОК) из мГК	47
2.2.2.4. Изготовление скаффолдов на основе мГК методом молдинга	47

2.2.2.5. 3D-печать скаффолдов на основе ХТ и мГК.....	48
2.2.2.6. Получение полых трубчатых скаффолдов на основе мГК.....	48
2.2.3. Методы исследования физико-химических свойств гидрогелей и композиций для их получения.	49
2.2.3.1. Исследования гидрогелей методами микроскопии.....	49
2.2.3.2. Определение времени желирования водно-спиртовых растворов хитозана	49
2.2.3.3. Определение температуры размягчения (T_{sp}) НСт-алкогелей хитозана	50
2.2.3.4. Тест на набухаемость гидрогелей.....	50
2.2.3.5. Механические тесты.....	51
2.2.3.6. Оптический тест	51
2.2.3.7. Рентгенофазовый анализ.....	51
2.2.3.8. Реологические исследования.....	51
2.2.3.9. Оценка степени ферментативной деградации реакцией Моргана-Эльсона .	52
2.2.3.10. Оценка наработки радикалов в ходе облучения.....	53
2.2.3.11. Статистический анализ	53
2.2.4. Биологические испытания гидрогелей и скаффолдов на их основе.....	53
2.2.4.1. МТТ-тест.	53
2.2.4.2. Исследования <i>in vitro</i> ХТ ГНК	54
2.2.4.3. <i>In vitro</i> исследования ХТ НФГ	55
2.2.4.4. <i>In vitro</i> испытания мГК скаффолдов.....	55
2.2.4.5. Исследование жизнеспособности клеток при биопечати.....	55
2.2.4.6. <i>In vivo</i> исследования скаффолдов на основе НФГ и мГК	55
2.2.4.7. <i>In situ</i> фотоиндуцируемая сшивка ФОК.....	56
2.2.4.8. <i>In vivo</i> исследования скаффолдов на основе мГК на модели ЧМТ мышей..	56
2.2.4.9. Гистологическое исследование	57
Глава 3. Результаты и их обсуждение	59
3.1. Нановолокнистые гели (НФГ) на основе ХТ.....	59
3.1.1. Особенности формирования алкогелей ХТ	60
3.1.2. Влияние различных параметров на свойства НФГ	62
3.1.2.1. Влияние температуры	62
3.1.2.2. Влияние концентрации ХТ	63
3.1.2.3. Влияние концентрации спирта.....	64
3.1.3 Механизм формирования термообратимых алкогелей.....	66
3.1.4. Свойства и структура НФГ	67
3.1.4.1. Механические свойства гелей	67
3.1.4.2. Оптические свойства.....	68
3.1.4.3. Морфология гелей	69
3.1.4.4. Рентгенофазовый анализ.....	71

3.1.5. Получение гелевых изделий	72
3.1.6. <i>In vitro</i> испытания	74
3.1.7. <i>In vivo</i> испытания	76
3.2. Гидрогели с системой направленных каналов (ГНК) на основе ХТ	76
3.2.1. Структура ГНК и особенности её формирования	79
3.2.1.1. Влияние концентрации основания и кислоты	80
3.2.1.2. Влияние концентрации ПВС	82
3.2.1.3. Вторичные каналы	84
3.2.1.4. Кривообработка гелей	85
3.2.2. <i>In vitro</i> испытания	86
3.3. Скаффолды на основе фотоиндуцированной сшивки гиалуроновой кислоты	88
3.3.1. Введение двойных связей в ГК с использованием ГМА	88
3.3.2. Разработка метода определения двойных связей	89
3.3.2.1. Реакция KMnO_4 с ГМА	89
3.3.2.2. Определение СЗ мГК	91
3.3.3. Влияние условий и состава реакционной смеси на СЗ мГК	93
3.3.3.1. Влияние pH на СЗ в мГК, механизм реакции	93
3.3.3.2. Влияние времени и температуры на СЗ в мГК	95
3.3.3.3. Влияние соотношения компонентов и времени на СЗ в мГК	96
3.3.4. Получение фотоотверждаемых композиций	97
3.3.5. Получение скаффолдов	99
3.3.5.1. Получение скаффолдов литьем в формы	99
3.3.5.2. Экструзионный метод получения скаффолдов	100
3.3.5.3. Экструзия полых композиций	101
3.3.6. Влияние СЗ на свойства растворов мГК и скаффолдов на её основе	103
3.3.6.1. Влияние СЗ на вязкость растворов и композиций мГК	103
3.3.6.2. Влияние СЗ на степень ферментативной деградации	104
3.3.6.3. Влияние СЗ на механические характеристики сшитых мГК гидрогелей ...	105
3.3.7. <i>In vitro</i> результаты	107
3.3.7.1. <i>In vitro</i> исследование скаффолдов, полученных методом экструзионной 3D-печати	107
3.3.7.2. <i>In vitro</i> исследование полых трубчатых скаффолдов	108
3.3.8. <i>In vivo</i> эксперименты	109
3.3.8.1. <i>In vivo</i> эксперименты гидрогелей, полученных методом отливки в формы	109
3.3.8.2. Изучение влияние скаффолдов на модель ЧМТ мышей	110
3.3.8.3. Получение скаффолдов <i>in situ</i> фотоотверждением в окне прозрачности тканей организма	113
Глава 4. Выводы	119

Благодарности.....	120
Список использованной литературы.....	122

Список основных сокращений

ТИК	- тканеинженерные конструкции
ПЭГ	- полиэтиленгликоль
ПВС	- поливиниловый спирт
ПЭГДА	- полиэтиленгликоль диакрилат
FDA	- Food and Drug Administration (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США)
ХТ	- хитозан
ГК	- гиалуриновая кислота
УФ	- ультрафиолетовое излучение
ЭДК	- 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид
ИК	- инфракрасное излучение
ФМН	- флавинмононуклеотид
АФК	- активные формы кислорода
АТ	- аддитивные технологии
НКТР	- нижняя критическая температура растворения
ЛС	- лазерная стереолитография
ГМА	- глицидилметакрилат
ТЭА	- триэтиламин
ТЭАБ	- тетраэтиламмоний бромид
ТЭОА	- триэтаноламин
ДМАБ	- диметиламинобензальдегид
ДМФА	- диметилформамид
ДФПГ	- 2,2-дифенил-1-пикрилгидразин
DMEM	- клеточная среда Dulbecco's Modified Eagle Medium
МТТ	- краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид
мГК	- модифицированная гиалуриновая кислота
СЗ	- степень замещения
СЭМ	- сканирующая электронная микроскопия
ЯМР	- ядерный магнитный резонанс
НФГ	- нанофибриллярные гели
T_{fr}	- температура замерзания (смеси соразтворителей)
T_q	- температура охлаждения
НСт-алкогель	- нестабилизированный алкогель
$T_{ст}$	- температура стабилизации
Ст-алкогель	- стабилизированный алкогель
NIPS	- фазовое разделение, индуцированное нерастворителем (nonsolvent induced phase separation)
ГНК	- гидрогели с системой направленных каналов
ФОК	- фотоотверждаемая композиция
SWR	- степень набухания
SR	- степень усадки
T_{sp}	- температура размягчения
ЧМТ	- черепно-мозговая травма

- TIPS - фазовое разделение, индуцированное температурой (temperature induced phase separation)
- LT-TIPS - низкотемпературный TIPS (low temperature TIPS)
- LT-TIPS-NF - LT-TIPS в незамерзающих условиях (LT-TIPS under non-freezing conditions)

Введение

Актуальность исследования. В современной медицине все большее значение приобретает тканевая инженерия, которая представляет собой технологию замещения участков тканей и органов, поврежденных или утраченных вследствие травм и иных причин, путем имплантации структур, называемых матрицами или скаффолдами, в комбинации с определенными 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 с высокой адгезией к клеткам. В последнее время большое внимание уделяют материалам на основе природных полимеров и их производных, среди которых особый интерес привлекают природные полисахариды хитозан и гиалуроновая кислота. Получение скаффолдов, отвечающих необходимым требованиям и обладающих специальными свойствами, которые определяются особенностями каждого из этих полимеров, позволит значительно расширить набор материалов для применения в тканевой инженерии.

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 скаффолдов. Таким образом, создание скаффолдов на основе хитозана, обеспечивающих регенерацию тканей, представляет актуальную задачу.

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 кандидата в материалы для стимулирования заживления ран и регенерации тканей. Создание скаффолдов из гиалуроновой кислоты в виде гидрогелей, организованных за счет нековалентной сшивки, как в случае хитозана, не позволяет решить проблему слабой

механической прочности гидрогелей на основе гиалуроновой кислоты. Поэтому актуальным направлением представляется разработка методов получения скаффолдов на основе гиалуроновой кислоты за счет реакции ковалентной сшивки, которая может быть проведена в том числе и под действием света. Фотоиндуцированные реакции сшивки позволяют создавать материалы с требуемыми физико-химическими свойствами при сохранении биосовместимости и способности к биodeградации. Изготовление таких скаффолдов на основе гиалуроновой кислоты можно легко адаптировать под методы аддитивных технологий (лазерная 3D-печать), кроме того, формирование конструкции может быть реализовано непосредственно в живом организме без предварительной стадии *in vitro*.

Цель исследования: получение скаффолдов с заданными физико-химическими свойствами и требуемой архитектурой 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 внутреннюю морфологию и модуль Юнга 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 глицидилметакрилатом и изучить влияние этого параметра на свойства модифицированной гиалуроновой кислоты и скаффолдов на её основе.

5) Получить скаффолды на основе модифицированной гиалуроновой кислоты в процессе фотоиндуцируемой сшивки излучением синего диапазона спектра при участии эндогенного соединения флавиномононуклеотида (витамин B2) в качестве фотоинициатора методами формования и экструзионной 3D-печати.

6) Провести фотоиндуцируемое формирование скаффолдов на основе модифицированной гиалуроновой кислоты при участии в качестве фотоинициатора

водорастворимого производного фталоцианина *in situ* 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 при температурах выше их точки замерзания.

- Установлено, что формирование нековалентно сшитых гидрогелей с системой параллельно ориентированных каналов при получении скаффолдов для направленного роста клеток (на примере линии глиомы С6) происходит в условиях фронтального желирования композиций хитозана с поливиниловым спиртом с использованием NaOH в качестве осадителя.

- Разработан экспресс-метод на основе реакции с перманганатом калия со спектрофотометрическим подтверждением результатов для определения двойных связей в составе модифицированной гиалуроновой кислоты.

- 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 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 (матрицы, решетки, полые структуры), в том числе и с живыми клетками (на примере линии HaCaT).

- Разработан подход для получения трубчатых конструкций на основе модифицированной гиалуроновой кислоты методом 3D экструзионной печати с последующим формированием конструкций в водной среде при проведении реакции фотоиндуцируемой сшивки в условиях диффузии инициатора флавиномононуклеотида из раствора.

- 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. Хитозановые мультিকанальные гидрогели не цитотоксичны и способны обеспечивать направленный рост клеток внутри каналов, что может играть важную роль при регенерации разрывов периферических нервов или кровеносных сосудов. Разработанная двухстадийная методика получения хитозановых нанопфибриллярных гидрогелей позволяет не только хорошо адаптировать её под современные технологии получения трёхмерных изделий, но и эффективно регулировать их свойства, подстраивая под свойства замещаемых тканей организма. Оптимизация реакции модификации гиалуроновой кислоты глицидилметакрилатом, быстрое определение степени замещения и масштабный анализ условий контролируемого получения определённой степени замещения и её влияния на свойства конечных продуктов позволяет максимально эффективно с низкими затратами получать биосовместимые скаффолды из модифицированной гиалуроновой кислоты с нужными характеристиками для различных видов мягких тканей. Такие скаффолды можно использовать и как носители для культивирования клеток и формирования новой ткани, и как имплантаты для стимуляции регенерации травмированных тканей.

Основные положения, выносимые на защиту

- Условия формирования термообратимых алкогелей из водно-спиртовых растворов хитозана и получение на их основе гидрогелей с настраиваемым модулем Юнга.
- Закономерности получения гидрогелей с системой ориентированных микроканалов при фронтальном осаждении композиций хитозана с поливиниловым спиртом для направленного роста клеток.
- Исследование свойств гиалуроновой кислоты, модифицированной глицидилметакрилатом, для создания скаффолдов методами фотоиндуцируемой сшивки с флавиномононуклеотидом 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, изготовление

и подбор состава фотоотверждаемых композиций, 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.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Регенеративная медицина и тканевая инженерия

Регенеративная медицина – возникшая относительно недавно и активно развивающаяся междисциплинарная отрасль знаний, посвящённая процессам замены, реконструкции и регенерации тканей и органов с целью восстановления нормального функционирования организма пациента. Регенеративная медицина является перспективной альтернативой трансплантации донорских органов, обладающей рядом проблем и недостатков:

- Ограниченное число донорских органов, подходящих пациенту для пересадки по различным биологическим маркерам;
- Вынужденный пожизненный приём иммунодепрессантов для подавления отторжения аллотрансплантата;
- Вероятность отторжения донорских органов, несмотря на приём иммунодепрессантов;
- Возможность передачи различных опасных заболеваний от донора реципиенту;
- Существование чёрных рынков по продаже донорских органов, полученных криминальным путём.

Следует отметить, что использование эмбриональных и иных типов стволовых клеток из абортного материала или других пациентов не избавляет от проблем гистосовместимости и, следовательно, иммунного отторжения, а также от ряда этических проблем, связанных с их получением. Однако даже эти проблемы могут быть решены через культивирование собственных стволовых клеток пациента или через репрограммирование уже дифференцированных клеток [1].

Стратегии регенеративной медицины можно разделить на две категории: 1) стимуляция естественных регенеративных механизмов и пересадка выращенных *in vitro* собственных клеток пациента (Схема 1.1.a); 2) выращивание полноценных тканей или органов *in vitro* на специальных конструкциях с последующей трансплантацией в организм в случае неспособности последнего самостоятельно справиться с повреждениями (Схема 1.1.б,в) [2]. Второй подход также больше известен как тканевая инженерия.

Тканевая инженерия описывает методы создания конструкций, представляющих аналог живых тканей/органов, из сочетания биосовместимых материалов, собственных клеток пациента и различных биоактивных веществ. Такие тканеинженерные конструкции (ТИК) должны максимально имитировать физико-химические свойства тканей организма,

не вызывать реакции отторжения [3], впоследствии замещаться собственной тканью организма и деградировать под действием ферментов, либо удаляться хирургически. Одним из ключевых предметов исследований тканевой инженерии является создание скаффолдов – трёхмерных каркасов ТИК с заданной микро- и макроархитектурой. Скаффолды необходимы для поддержания роста и жизнедеятельности внедряемых в них клеток, соединения повреждённых органов и имитации межклеточного матрикса; при этом заселение скаффолдов клетками возможно как после создания скаффолда (Схема 1.1.б), так и во время его изготовления (Схема 1.1.в). Существует два подхода создания таких каркасов – децеллюляризация уже готовых донорских органов и создание скаффолдов *de novo* из различных материалов.

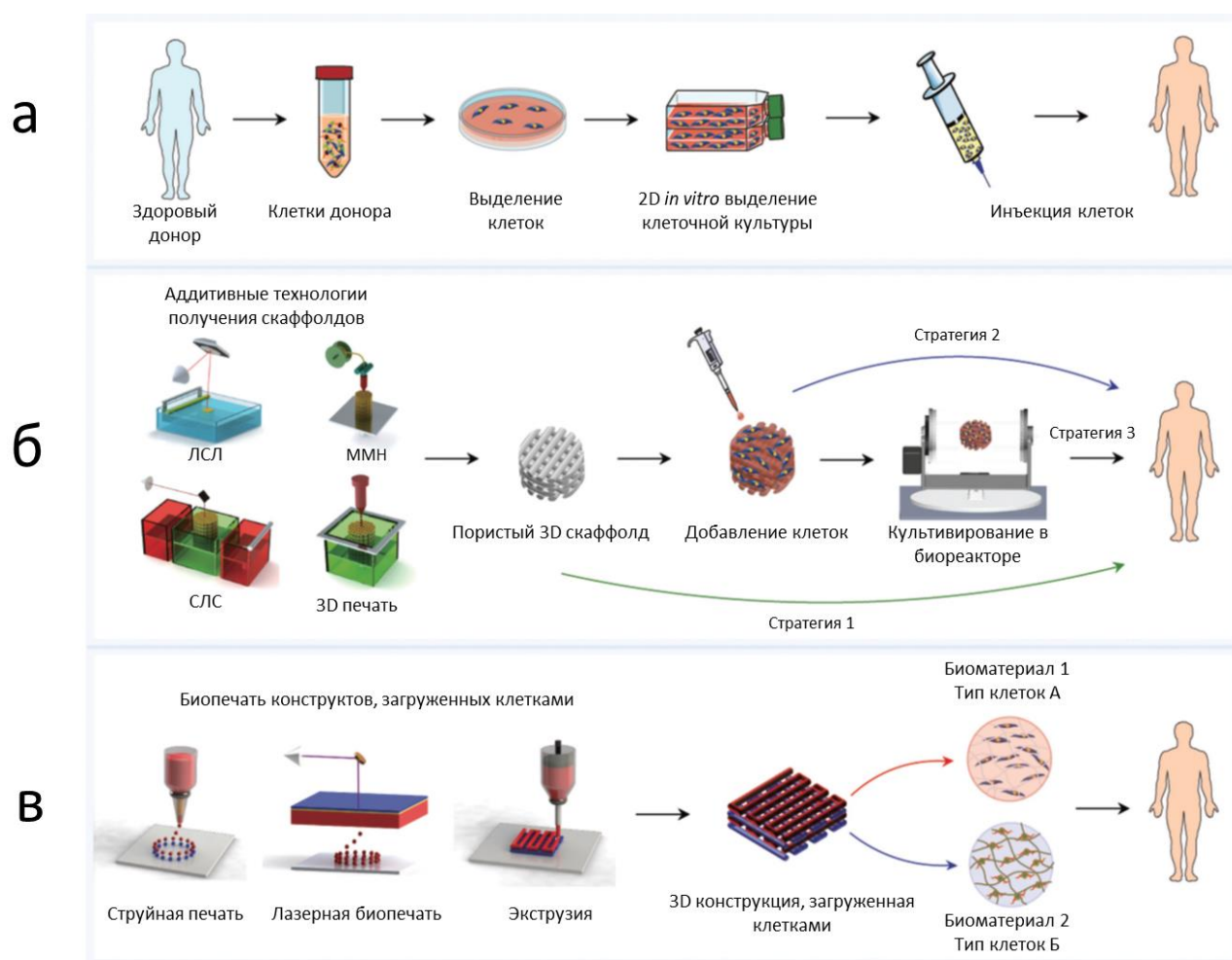


Схема 1.1. Основные подходы в регенеративной медицине и тканевой инженерии: а) терапия, основанная на инъекции клеток; б) терапия, основанная на имплантации скаффолдов без клеток (стратегия 1), после добавления клеток (стратегия 2) или после инкубации с клетками в биореакторе (стратегия 3); в) терапия, основанная на имплантации конструкций, загруженных клетками. ЛСЛ – лазерная стереолитография, ММН – моделирование методом наплавления, СЛС – селективное лазерное спекание. [4]

При децеллюляризации орган обрабатывается детергентами, которые смывают иммуногенные клетки и белки донора, оставляя лишь внеклеточный матрикс. На полученных каркасах в специальных биореакторах культивируют уже собственные клетки пациента [5] или их могут сразу помещать в организм пациента. Уже существует возможность получать децеллюляризованные внеклеточные матриксы из различных органов, например лёгких [6], печени [7] и даже сердца [8]. Поскольку при децеллюляризации удаляются иммуногенные белки, вполне возможно использование донорских органов от животных, например свиньи [9]. В последнее время также ведутся активные работы по созданию децеллюляризованных носителей на основе растений [10], поскольку сосудистая система растений может напоминать сосудистую систему млекопитающих. Однако на данный момент наилучшими скаффолдами всё ещё являются децеллюляризованные человеческие органы.

Несмотря на наилучшую биосовместимость среди всех материалов для скаффолдов и потенциальное решение проблемы ограниченного числа донорских органов, децеллюляризованные ткани обладают рядом недостатков:

- Невоспроизводимость состава и структуры каркаса;
- Относительно быстрая биодegradация носителей;
- Высокая стоимость (большое количество анализов до и после децеллюляризации для выявления патологий и оценки гистосовместимости).

Второй подход, создание скаффолдов *de novo*, является наиболее многообещающим и перспективным на данный момент, так как не только решает самую главную проблему трансплантологии, связанную с ограниченным числом донорских органов, но и позволяет создавать хорошо воспроизводимые скаффолды с легко регулируемыми свойствами. Помимо этого, такая стратегия предоставляет огромный спектр способов и материалов, с помощью которых можно создавать матрицы с заданными свойствами в зависимости от поставленных задач.

1.2. Материалы для формирования скаффолдов

Для получения скаффолдов и ТИК, пригодных для имплантации в организм, материалы для их изготовления должны удовлетворять ряду требований [11]:

- Биосовместимость – неиммуногенность, апирогенность и минимальная реакция организма на имплантацию как скаффолдов, так и продуктов их распада;
- Биодegradируемость (ферментативная или неферментативная) с последующим замещением скаффолда собственными тканями организма (в некоторых

случаях возможно хирургическое удаление или пожизненная имплантация, но это нежелательно);

- Воспроизведение механических свойств имитируемых тканей;
- Обеспечение адгезии клеток к поверхности скаффолда, сохранение функций клеточных линий при культивировании, стимуляция взаимодействий между клеток (биоактивность);
- Наличие взаимосвязанной высокопористой структуры для эффективного обмена веществ и возможности миграции клеток по объёму ТИК;
- Экономическая доступность с возможностью масштабирования;

По этой причине главной задачей тканевой инженерии является создание универсального материала, который отвечал бы всем перечисленным требованиям. Наибольший интерес в качестве скаффолдов для тканевой инженерии представляют собой гидрогели благодаря большому содержанию воды, наличию структуры, напоминающей межклеточный матрикс и механическим свойствам, во многом схожим со свойствами мягких тканей организма. Для формирования гидрогелевых скаффолдов могут быть использованы как синтетические, так и природные полимеры и их производные, а также различные композитные материалы на их основе.

1.2.1. Синтетические полимеры

Синтетические полимеры представляют собой огромный класс соединений с самыми различными свойствами и характеристиками. Такое разнообразие и возможность подбора свойств полимеров позволяет просто и быстро создавать скаффолды любой сложности, а технологию производства можно легко оптимизировать и масштабировать. Кроме того, в отличие от природных полимеров, где источник получения оказывает огромное влияние на состав вещества, синтетические обладают хорошей воспроизводимостью свойств, что гарантирует стабильное качество изделий на их основе. Однако, поскольку они зачастую не имеют аналогов в живых организмах и, соответственно, системы ферментов, способных их разлагать, их биодegradация чаще всего определяется простым гидролизом, что может значительно увеличивать или, наоборот, уменьшать время их пребывания в организме. Кроме того, будучи нетоксичными в виде полимера, их мономеры и другие продукты биодegradации могут оказывать цитотоксический эффект. Одними из самых часто используемых синтетических полимеров для получения гидрогелевых скаффолдов являются полиэтиленгликоль (ПЭГ), поливиниловый спирт (ПВС), поливинилпирролидон [12] (Схема 1.2.а-в).

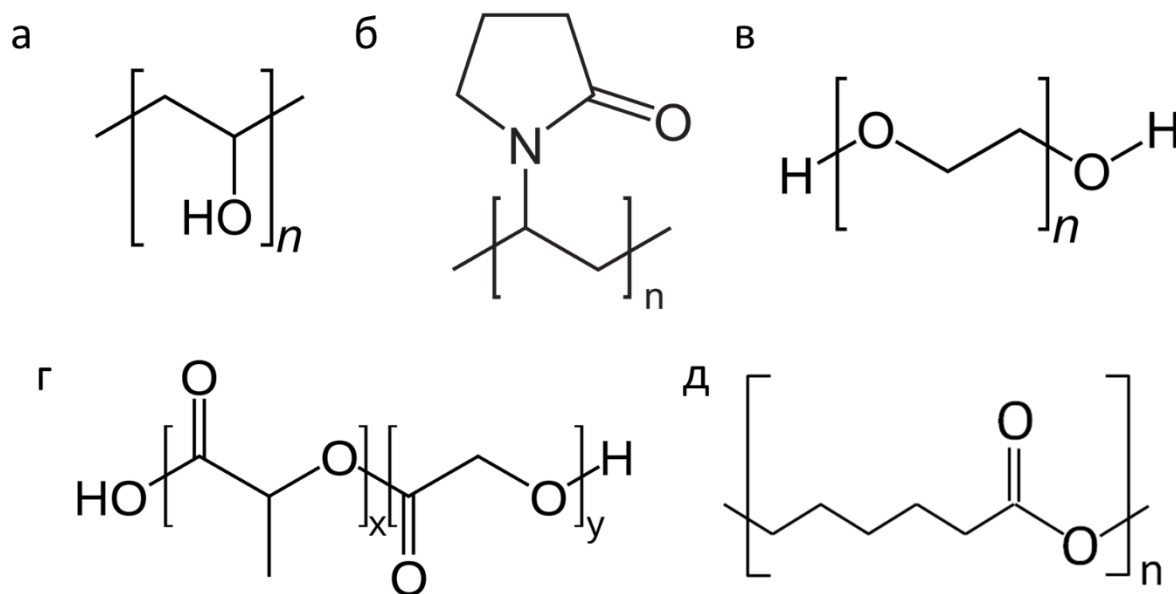


Схема 1.2. Примеры синтетических полимеров: а) ПВС; б) поливинилпирролидон; в) ПЭГ; г) сополимер лактида и гликолида; д) поликапролактон.

ПЭГ представляет собой гидрофильный полиэфир, состоящий из звеньев этиленоксида, соединённых простыми эфирными связями. Благодаря антиадгезивным свойствам ПЭГ используют для поверхностной модификации скаффолдов для предотвращения сорбции белков. Кроме того, конъюгация с другими полимерами (ПЭГилирование) снижает их гидрофобность [13]. Модификация концов ПЭГ различными группами, например, акрилатными (полиэтиленгликоль диакрилат, ПЭГДА) открывает возможность получения гидрогелей на его основе через реакции радикальной сшивки, в том числе и фотоиндуцированной [14].

ПВС является гидрофильным полимером с высоким коэффициентом набухания в водной среде. ПВС получают деацетилированием поливинилацетата, поскольку его мономер, виниловый спирт, является нестабильным соединением. Благодаря наличию боковых гидроксильных групп ПВС можно легко модифицировать, изменяя его свойства [12]. Кроме того, водные растворы ПВС способны желироваться при температурах ниже 0 °С и формировать криогели. ПВС используется в качестве материала для контактных линз, раневых повязок, средства для доставки лекарственных средств, кроме того показана возможность применения в качестве скаффолдов для хрящевой ткани [15,16]. Однако его применение ограничено из-за неполной деградации в организме.

Поливинилпирролидон – гидрофильный биосовместимый полимер, состоящий из звеньев N-винилпирролидона. Поливинилпирролидон уже много лет используется в качестве биоматериала, например, как кровезаменитель или добавка к лекарственным

средствам. Под воздействием различных стимулов, например, нагрев, давление или облучение, поливинилпирролидон способен формировать нековалентно сшитые прозрачные гибкие гидрогели. Однако гидрогели на основе чистого поливинилпирролидона практически не находят своего применения в тканевой инженерии, что связано с неудовлетворительными механическими свойствами. Для улучшения этих свойств создаются смешанные композиции поливинилпирролидона с другими полимерами, такими, как ПВС, хитозан, карбоксиметилцеллюлоза. В этом случае гидрогели формируются за счёт водородных связей между карбонильными группами поливинилпирролидона и функциональными группами этих полимеров [17].

Полигликолид, полилактид, поликапролактон и их сополимеры (Схема 1.2.г,д) относятся к алифатическим полиэфирам – полимерным соединениям, мономеры которых соединены сложноэфирными связями. Несмотря на гидрофобную структуру и невозможность получить гидрогели из чистого полимера, их можно использовать в качестве блок-сополимеров с другими гидрофильными синтетическими полимерами, например, с ПЭГ, для изменения механических характеристик и скорости деградации [18]. Полиэфиры обладают высокой биосовместимостью, хорошо поддаются обработке и способны деградировать в организме через неспецифический гидролиз; по этой причине они допущены FDA к применению в медицине в области ортопедии и в качестве шовных материалов. Следует отметить, что скорость гидролиза полиэфиров сильно зависит от количества гидрофобных групп в молекуле. Так, самой высокой скоростью гидролиза обладает полигликолид (2-3 месяца), полилактид деградирует медленнее за счёт наличия метильной группы (~ 6 месяцев), а конструкции на основе поликапролактона способны оставаться в организме до 2 лет [13]. Биodeградацию полиэфиров можно точно контролировать, получая сополимеры между лактидом, гликолидом, капролактоном и другими соединениями [19,20]. Большим недостатком полиэфиров являются гидрофобная поверхность и продукты гидролиза (гидроксикислоты), сильно снижающие pH, что может приводить к локальному воспалению.

1.2.2. Природные полимеры

В отличие от синтетических, полимеры природного происхождения чаще характеризуются хорошей биосовместимостью и биodeградацией, а соединения эндогенного происхождения (т.е. синтезируемые организмом человека) *a priori* обладают этими качествами, поскольку их эндогенность также означает наличие систем ферментов в организме, способных их расщеплять. К природным полимерам, используемым для

получения скаффолдов, относятся белки (коллаген, кератин, фиброин шёлка и др.) и полисахариды (альгиновая кислота, агароза, хитозан, гиалуроновая кислота и др.) [12].

Коллаген представляет собой фибриллярный белок, функциональной единицей которого является тропоколлаген – левозакрученная спираль, состоящая из трёх правозакрученных полипептидных α -цепей. При объединении молекул тропоколлагена в присутствии протеогликанов формируется структура, составляющая основу соединительной ткани всего организма, что делает коллаген самым распространённым белком в мире. При децеллюляризации органов именно из коллагена состоят получаемые внеклеточные матрицы. Поскольку α -цепи коллагена состоят из триад аминокислот, в которой всегда есть один глицин и ещё две любых других аминокислоты (чаще это пролин или гидроксипролин), а также возможно много вариаций укладки тропоколлагена (не только в фибриллы), существует большое разнообразие типов коллагена, всего их 28 [21]. Для формирования скаффолдов в основном используется коллаген I типа, поскольку он нерастворим в воде и обладает самыми высокими показателями модуля упругости, 100-300 МПа для одной фибриллы [22]. Скаффолды из коллагена можно получать экструзией и высушиванием гелей, а также методами электроспиннинга [23]. В некоторых случаях использование растворителей или термообработка приводят к необратимой денатурации цепей коллагена, то есть, превращению в желатин. Материалы на основе желатина хорошо растворяются в воде и обладают малой механической прочностью, что вынуждает прибегать к ковалентной внутри- и межмолекулярной сшивке белковых цепей бифункциональными реагентами.

Ещё одним фибриллярным белком, пригодным для создания скаффолдов, является кератин. Существуют два больших семейства кератина в зависимости от вторичной структуры белка: α -кератин (формирует α -спирали) и β -кератин (формирует β -складки). α -кератин содержится в шерсти и волосах, а также в ороговевших частях кожи млекопитающих. Этот белок в нативном состоянии абсолютно нерастворим в воде в нейтральных условиях благодаря высокому содержанию гидрофобных аминокислот и цистеина, который формирует дисульфидные связи [24]. Кератины, экстрагируемые из человеческих волос, имеют аминокислотные мотивы, стимулирующие адгезию и пролиферацию клеток, и покрытия на его основе показали лучшие результаты роста различных клеточных культур, чем на культуральных пластиках и коллагене. Пористые скаффолды на основе кератина можно получать методом замораживания с последующей лиофилизацией. Кроме того, в организме человека нет кератиназ, что значительно удлиняет время жизни кератиновых скаффолдов [25].

Интерес также представляет фиброин шёлка – белок, секретируемый некоторыми насекомыми и паукообразными при формировании паутины. В основном фиброин шелка получают из тутового шелкопряда (*Bombyx mori*). Благодаря гетеродимерной структуре и повторяющимся аминокислотным последовательностям, образующим антипараллельные β -складки, этот фибриллярный белок демонстрирует исключительные механические характеристики: предел прочности составляет 300-740 МПа, а по жёсткости и предельной деформации превосходит кевлар. Также материалы на основе фиброина шёлка неиммуногенны и демонстрируют высокую биосовместимость и биоактивность в отношении адсорбированных на их поверхности клеток. Высокая технологичность фиброина позволяет создавать тканые и нетканые материалы, губки, гидрогели, плёнки, микрочастицы. [26]

Несмотря на все положительные качества фибриллярных белков, их большим недостатком является необходимость в тщательной обработке и очистке сырья от сопутствующих белков, которые способны вызвать сильный иммунный ответ организма и возможное отторжение материала [27]. В отличие от белков полисахариды не требуют такой тщательной обработки.

Одним из известных полисахаридов, подходящих для создания ТИК, является альгиновая кислота – полисахарид, состоящий из нерегулярно чередующихся L-гулуруновой и D-маннуруновой кислот, соединённых β -(1-4) связями. Она содержится во многих родах красных, бурых и зелёных водорослей, что обуславливает высокое непостоянство состава в зависимости от вида водоросли и даже условий их роста. В литературе чаще употребляется термин “альгинат”, соль альгиновой кислоты (в частности, с натрием, Na^+), поскольку при экстракции сырьё обрабатывают гидроксидом или карбонатом натрия. В медицине альгинаты в основном используют в качестве оральных систем доставки лекарственных средств, раневых повязок и слепочного материала в стоматологии. Альгинаты представляют интерес как биоматериал благодаря своей уникальной способности формировать гидрогели в присутствии поливалентных катионов металлов, чаще всего ионов кальция (Ca^{2+}). Такие мягкие условия позволяют проводить быстрое желирование с живыми клетками. Таким образом, например, можно получать микросферы с клетками, капаю клеточную суспензию в композиции из альгината натрия в раствор хлорида кальция [28]. Из-за особенностей желирования возможно формирование альгинатных скаффолдов одновременно с получением частиц гидроксиапатита в толще скаффолда, что является перспективной стратегией для получения ТИК для регенерации костной ткани [29].

Другим перспективным полисахаридом является хитозан (ХТ) – полусинтетический полисахарид, получаемый реакцией деацетилирования хитина, основного вещества панцирей членистоногих и клеточной стенки грибов. Степень деацетилирования определяет соотношение звеньев D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина в конечном продукте (Схема 1.3.), и чем она выше, тем выше гидрофильность, биосовместимость и скорость деградации ХТ.

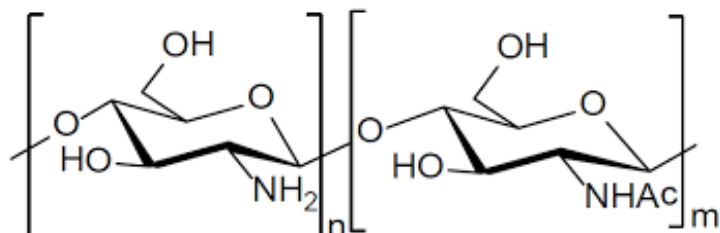


Схема 1.3. Структурная формула хитозана.

При щелочном и нейтральном pH хитозан нерастворим в воде, а при pH ниже 6 происходит протонирование аминогрупп D-глюкозамина, появление на них положительного заряда и, как следствие, растворение полимера за счёт интенсивной гидратации. pH-зависимое поведение позволяет формировать гидрогели путём осаждения кислых растворов ХТ растворами щелочей или газообразным аммиаком. Такой способ получения гидрогелей технологичен и не требует дополнительных сшивающих реагентов, однако практически не позволяет вводить клетки на стадии формирования скаффолда [30]. Этот материал можно легко адаптировать для применения в 3D-печати [31]. Хитозан допущен FDA к использованию в медицине в качестве внешних раневых повязок, но не для внутреннего применения.

Гиалуроновая кислота (ГК) является ещё одним перспективным эндогенным материалом для тканевой инженерии. ГК представляет собой линейный полисахарид, состоящий из повторяющихся неразветвленных звеньев глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина (Схема 1.4.).

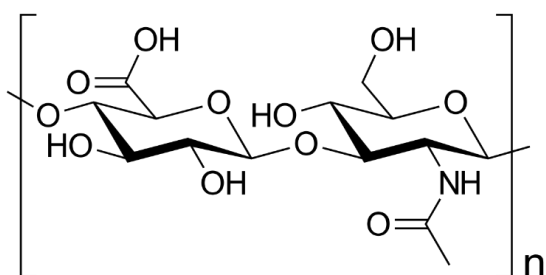


Схема 1.4. Структурная формула гиалуроновой кислоты.

ГК содержится в соединительной, эпителиальной и нервной тканях, а также во многих биологических жидкостях (слюне, синовиальной жидкости и др.), кроме того наряду с коллагеном она является одним из основных компонентов внеклеточного матрикса [32]. Функционально ГК также принимает активное участие в пролиферации и миграции клеток [33]. Однако ГК обладает ключевым недостатком: изготовление скаффолдов на её основе затруднено, что связано с чрезвычайно высоким коэффициентом набухания и неспособностью гидрогелей на её основе удерживать заданную форму. Формирование скаффолдов возможно за счёт получения композитных материалов с другими полимерами, которые образуют нековалентные связи с ГК, например, с коллагеном, фиброином шёлка или поливиниловым спиртом [34–36]. Однако, нековалентное сшивание не способно решить проблему слабой механической прочности гидрогелей ГК, как и её быстрой деградации внутри организма, поэтому целесообразной представляется разработка методов получения скаффолдов ГК за счёт ковалентной внутри- и межмолекулярной реакции сшивки цепей ГК. Для этих целей подходят те же бифункциональные реагенты, что и для желатина и некоторых других природных полимеров. Более перспективной и технологичной стратегией является модификация ГК фоточувствительными группами, способными сшиваться между собой под действием облучения. Данный метод сочетает в себе функциональность традиционных методов сшивания с временным контролем фотоактивации, что расширяет арсенал техник получения скаффолдов, например с помощью лазерной печати или фотоотверждением *in situ*. Самым распространённым способом модификации ГК для получения фоточувствительных производных является полимераналогичная реакция ГК с соединениями, содержащими винильные группы, в частности с ангидридом метакриловой кислоты или глицидилметакрилатом. Введение в композицию фотоинициаторов и облучение её УФ или синим светом вызывает генерацию радикалов, запускающих процесс сшивания [37–39].

1.3. Гидрогели

Наибольший интерес в качестве скаффолдов для тканевой инженерии представляют собой гидрогели и конструкции на их основе. Гидрогель — это сшитая трёхмерная сетка из полимера, не обладающая текучестью и способная поглощать большие объёмы воды или биологических жидкостей организма, во много раз превышающие массу сухого вещества. Высокая степень набухания обусловлена сильной гидратацией молекул полимера. Наиболее часто встречаемыми гидрофильными группами являются гидроксильные (-OH), карбоксильные (-COOH), карбамидные (-CONH-), амино- (-NH₂) и сульфогруппы (-SO₃H) [40,41]. За счёт образования сшивок между этими группами, будь то ковалентные или

нековалентные связи, полимерная сетка не растворяется в воде и способна лишь к ограниченному набуханию, что придаёт гидрогелю стабильную форму и устойчивость к механическим воздействиям. За счёт большого процента воды в составе гидрогеля, которая способствует диффузии растворённых в ней питательных веществ и газов, и малого содержания полимера, чаще всего приводящего к высокой пористости системы, становится возможной инкапсуляция клеток в гидрогелевые скаффолды. Кроме того, структура, напоминающая межклеточный матрикс, и механические свойства, во многом схожие со свойствами мягких тканей, делают такой тип скаффолдов особенно привлекательными для изготовления ТИК, имитирующих этот вид тканей. Несмотря на подобные преимущества, гидрогели обладают и существенным недостатком: конструкции нужной формы на их основе плохо поддаются изготовлению современными технологиями обработки, например 3D-печатью [42].

Как уже было сказано ранее, гидрогели могут быть сформированы двумя типами связей, ковалентными и нековалентными [43]. Гидрогели, образованные нековалентными связями, также известны как обратимые гели, поскольку при изменении параметров окружающей среды (температура, рН, ионная сила и др.) способны вновь растворяться за счёт ослабления взаимодействий между полимерными цепями. В отличие от них, гидрогели, сшитые ковалентными связями, являются необратимыми за счёт высокой энергии разрыва такого типа связей.

1.3.1. Ковалентно сшитые гидрогели

Ковалентно сшитые гидрогели можно сформировать посредством трёхмерной полимеризации или реакции сшивки водорастворимых полимеров. В первом случае гидрофильный мономер полимеризуется в присутствии полифункционального сшивающего агента и радикалов. Генерацию радикалов в растворе могут обеспечивать радикальные инициаторы (бензоил пероксид, 2,2-азо-изобутиронитрил, персульфат калия), окислительно-восстановительные системы (пероксиды/амины) и высокоэнергетическое излучение (УФ-, гамма- или электронное излучения) [44]. Такой тип получения гидрогелей чаще всего приводит к формированию материала, содержащего большое количество непрореагировавших мономеров, которые в большинстве случаев представляют собой высокотоксичные соединения, а потому требуется тщательная и длительная (вплоть до нескольких недель) очистка таких гидрогелей методом экстракции. Этого можно избежать, если использовать системы с высокой степенью конверсии мономеров или же нетоксичные мономеры, например, олигомеры и макромономеры (ПЭГДА). Помимо этого, необходимость длительной отмывки от мономеров можно избежать, используя реакцию

сшивания уже сформированных нетоксичных водорастворимых полимеров, к которым, например, относятся полиакриловая кислота, ПВС, поливинилпирролидон, природные биополимеры и многие другие соединения. Эффективнее всего сшивать полимер, содержащий различные функциональные группы. Существует большой спектр реакций и методов, приводящих к формированию ковалентных связей между такими группами.

1.3.1.1. Получение гидрогелей при участии химических реакций

Одним из самых известных и распространённых способов сшивки является добавление к раствору полимера специальных бифункциональных сшивающих агентов (например, эпихлоргидрин, карбодиимиды, глутаровый альдегид, генипин и др.), которые реагируют за счёт двух активных концевых групп [45–47]. Такой универсальный метод позволяет быстро и просто создавать гидрогели с повышенной механической прочностью.

Наиболее часто для ковалентной сшивки биополимеров используют глутаровый альдегид, способный реагировать с различными нуклеофильными группами. В частности, глутаровый альдегид удобно использовать для сшивания белков, обладающими множеством нуклеофильных боковых групп, таких как тиольные, фенольные, имидазольные и аминогруппы. Ранее предполагалось, что сшивка белков происходит через образование иминов (основания Шиффа) с аминогруппами, однако это основание нестабильно при кислых рН, в то время как сшитые глутаровым альдегидом белки проявляли высокую стабильность даже при экстремальных температурах и рН. Исследования показали, что глутаровый альдегид может образовывать множество различных форм в водных растворах при разных рН, начиная от простой линейной молекулы и мономерных полуацетальных гетероциклических структур и заканчивая олиго- и полимерами с ненасыщенными связями и/или циклами, формирующимися за счёт внутри- и межмолекулярной полимеризации. В зависимости от наличия тех или иных форм глутарового альдегида и их соотношения, реакции сшивки могут варьироваться. Может протекать реакция аминогрупп с альдегидными группами, находящимися вблизи двойных связей, с образованием основания Шиффа, стабилизированного близостью ненасыщенных связей, и сопряжённое присоединение по Михаэлю аминогрупп к двойным связям, и формирование четвертичных пиридиновых соединений при щелочном рН, и многие другие реакции [48]. Несмотря на быструю и эффективную сшивку, гидрогели, полученные таким методом, зачастую обладают высокой жёсткостью и хрупкостью из-за неконтролируемости реакции; также есть необходимость в обработке таких гидрогелей восстанавливающими реагентами, что связано с нестабильностью и высокой реакционной способностью иминогрупп.

Для получения менее хрупких гидрогелей используются карбодиимиды, среди которых наиболее часто применяют водорастворимый 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид (ЭДК). Этот тип бифункциональных реагентов за счёт карбодиимидной связи ($-N=C=N-$), предпочтительно при $pH < 7$, реагирует с карбоксильными группами, образуя активное промежуточное соединение О-ацилизоомочевину. О-ацилизоомочевина способна замещаться нуклеофильной атакой первичных аминогрупп с образованием амидной связи, при этом выделяется безвредное карбодиимидное производное в виде мочевины (Схема 1.5.). Таким образом можно сшивать белки, которые содержат и карбоксильные, и аминогруппы, или полимеры с разными функциональными группами. Вследствие нестабильности О-ацилизоомочевины для увеличения выхода реакции совместно с карбодиимидами часто используют N-гидроксисукцинимид или сульфо-N-гидроксисукцинимид. ЭДК присоединяет N-гидроксисукцинимид к карбоксильной группе через сложноэфирную связь, что способствует формированию более стабильного, нежели О-ацилизоомочевина, производного, способного также эффективно реагировать с первичными аминогруппами при физиологическом pH. В случае отсутствия реакции О-ацилизоомочевина превращается в стабильную N-ацилмочевину, и это свойство можно использовать для сшивания поликислот поликарбодиимидами [49,50].

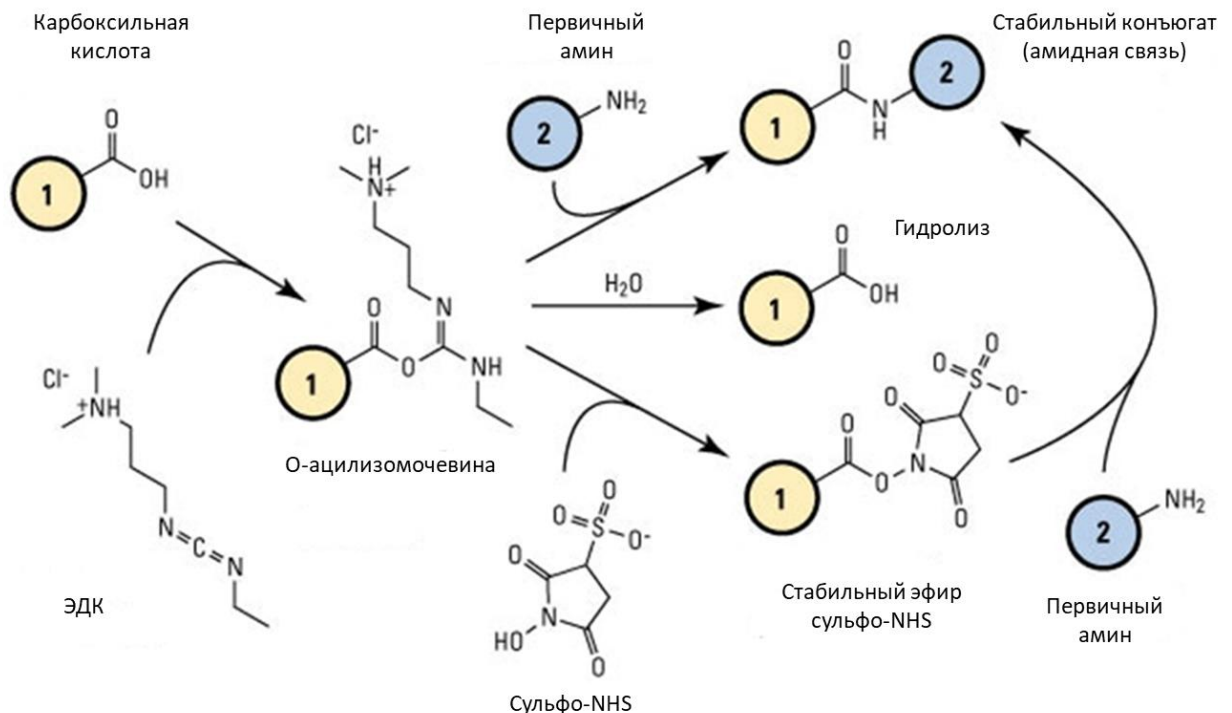


Схема 1.5. Механизм карбодиимидного сшивания. (NHS) – N-гидроксисукцинимид. [51]

Сшивающие агенты чаще всего представляют собой токсичные соединения, которые перед использованием необходимо экстрагировать из гелей, что усложняет и повышает

стоимость их получения, кроме того, зачастую такие реакции неспецифичны и могут генерировать нежелательные побочные продукты. Генипин является уникальным природным сшивающим реагентом, получаемым из генипоза, сахара растения *Gardenia jasminoides*, и считается наиболее пригодным для получения ТИК за счёт низкой цитотоксичности. “Мягкое” сшивание по аминогруппам (Схема 1.6.) и хорошие механические характеристики делают его весьма перспективным реагентом, но из-за высокой цены его не используют в массовом производстве [52].

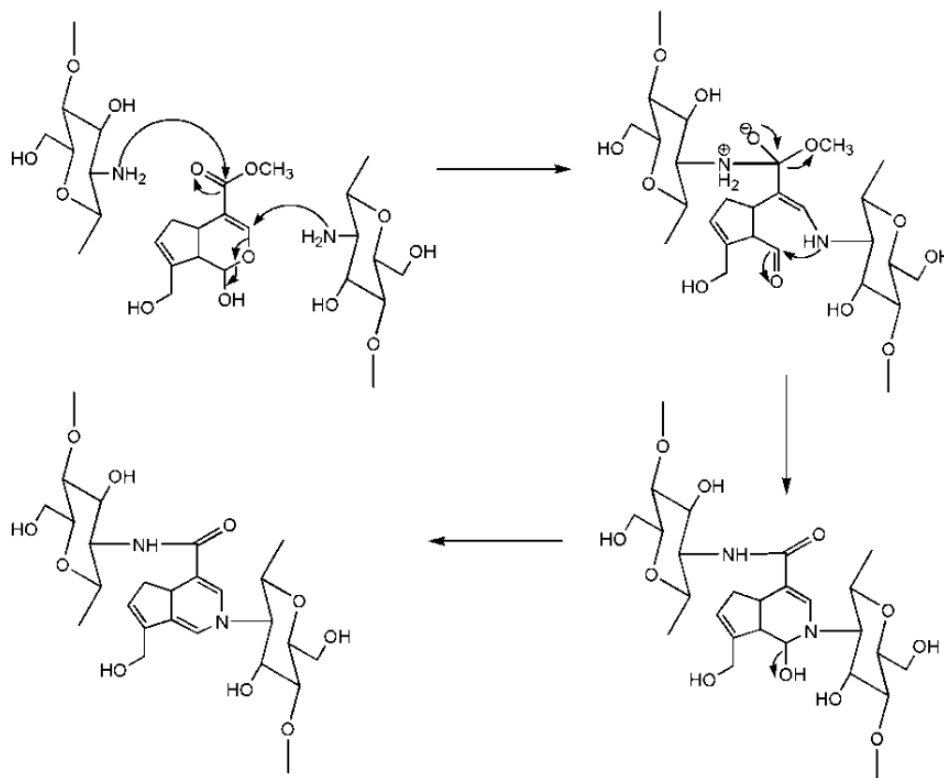


Схема 1.6. Реакция сшивания ХТ генипином. [53]

Другим подходом к проведению ковалентной сшивки является функционализация полимеров – введение активных групп, способных под действием специфичных условий вступать в реакцию сшивания.

Одним из примеров такого подхода являются реакции с участием природных ферментов [40]. Для активации сшивки к полимеру прививаются субстраты выбранных ферментов; в некоторых случаях этого даже не требуется, как, например, с желатином и коллагеном, обладающими аминокислотами-субстратами для фермента трансклутаминазы [54]. Наиболее известной и распространённой является система с пероксидазой хрена в качестве фермента и тиольными или фенольными группами в качестве субстрата, благодаря высокой стабильности и простой процедуре очистке этой пероксидазы [55].

Преимуществами такого метода являются природное происхождение ферментов и физиологические условия сшивки, соответствующие условиям работы ферментов.

Другим способом функционализации является клик-химия. Так называется тип химических реакций в присутствии или без катализатора, протекающих с высокой скоростью, эффективностью, стереоспецифичностью и селективностью в мягких условиях с нетоксичными побочными продуктами. Отличительной чертой клик-химии является получение химических соединений из модульных элементов, что призвано имитировать природные процессы, однако её можно использовать и для проведения сшивки между уже сформированными полимерами [40]. К клик-реакциям относятся: реакции циклоприсоединения (азид-алкильное циклоприсоединение (Схема 1.7.) и реакция Дильса-Альдера); нуклеофильные реакции с раскрытием кольца (эпоксиды, азиридины, циклические сульфаты и др.); химия карбониллов (формирование эфиров оксимов, гидразонов и ароматических гетероциклов); эпоксидация, дигидроксиляция и азид-фосфиновое взаимодействие (реакция Штаудингера) [56]. Однако, клик-химия не лишена недостатков. Некоторые реакции требуют присутствия металлов в качестве катализатора, например, меди, которая способна вызывать гепатоз, неврологическую и почечную дисфункцию; многие группы, вступающие в клик-реакции, зачастую являются нестабильными, например азиды и фосфины. Кроме того, дороговизна получения производных, способных вступать в клик-реакции, делает такой способ получения гидрогелей коммерчески малодоступным.

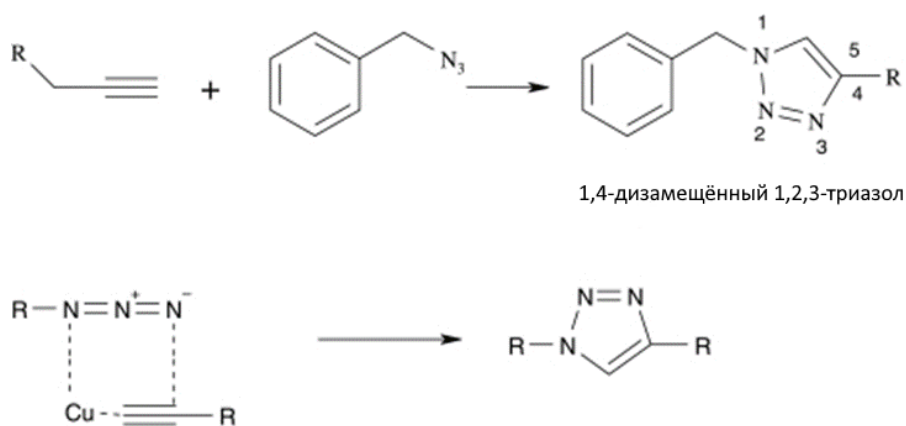


Схема 1.7. Пример клик-реакции: катализируемая медью реакция 1,3-циклоприсоединения по Хьюсгену. [56]

1.3.1.2. Фотоиндуцированные реакции сшивки, типы фотоинициаторов

Ещё одним из самых активно развивающихся и перспективных подходов к реакции ковалентной сшивки является реакция сшивания, индуцированная светом (фотосшивка). Этот процесс представляет собой соединение функциональных групп полимера по

радикальному механизму под действием света из УФ, видимого или ближнего ИК диапазона спектра излучений; при этом поглощение кванта света, приводящего к образованию радикалов, может происходить как самими функциональными группами или инициаторами (фотоинициаторами) реакции, так и специальными фотосенсибилизаторами, передающими затем энергию излучения на эти группы или инициаторы [57]. В зависимости от структуры и принципа действия различают два типа механизмов фотоинициации. Фотоинициаторы типа I под действием света подвергаются гомолитическому распаду на две радикальные молекулы (Схема 1.8.). К этому типу относятся различные пероксиды, перекисные эфиры, α -гидроксикетоны, азоинициаторы иминосульфоны, производные фосфинов. Фотоинициаторы типа II при поглощении кванта света могут как необратимо распадаться на радикалы по механизму типа I, так и выступать в роли фотосенсибилизаторов, перенося энергию на другие соединения (при их наличии в системе), выступающими таким образом в роли со-инициатора (например, соли иодония, третичные амины). Так, в присутствии со-инициаторов фотоинициаторы типа II вступают в реакции отщепления водорода или переноса протона/электрона, в ходе которой со-инициаторы и фотоинициаторы превращаются в радикалы и запускают реакцию фотосшивки (Схема 1.8.). Добавление в систему активаторов (например, N-винилкарбазол) в качестве третьего компонента позволяет регенерировать такие фотоинициаторы в их основное состояние, благодаря чему их концентрация может быть значительно ниже концентрации фотоинициаторов типа I. За счёт участия дополнительных соединений и конкурирующих реакций этот тип более медленный и менее эффективный. К фотоинициаторам типа II относятся ароматические кетоны, камфорохинон, эозин- γ , эритрозин, бенгальский розовый, рибофлавин [58].

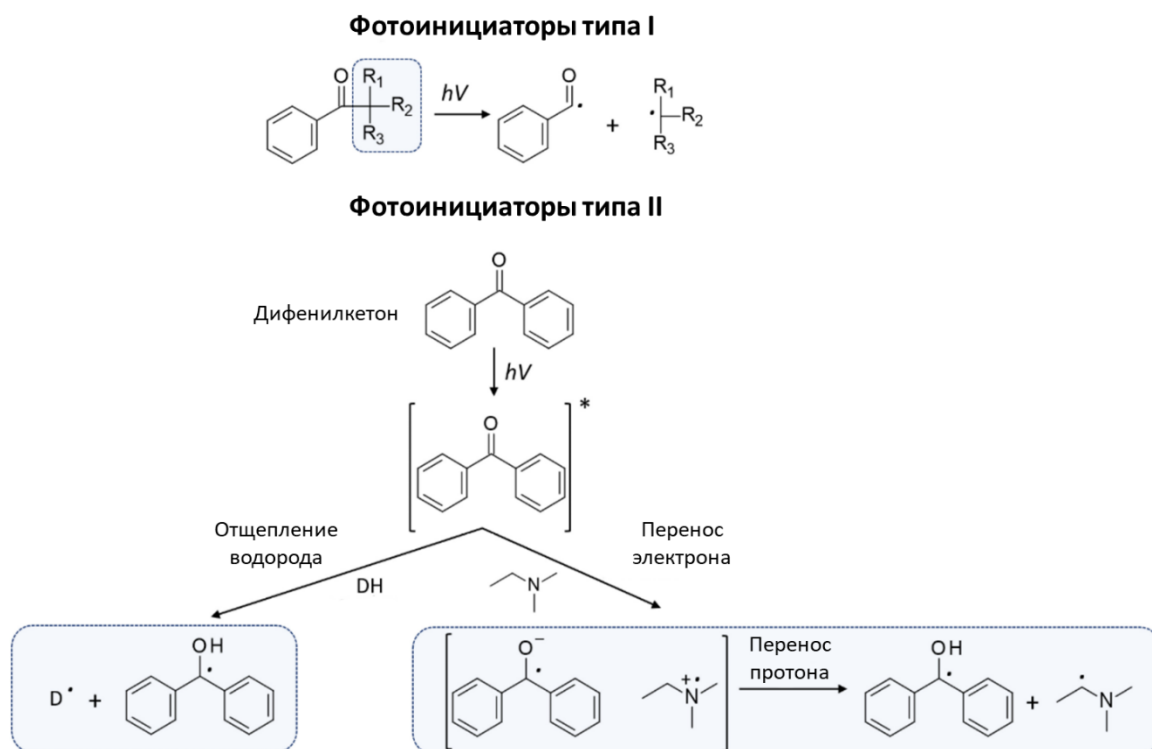


Схема 1.8. Формирование радикалов фотоинициаторов типа I и типа II. [58]

Несомненно, особый интерес в качестве фотоинициаторов II типа благодаря своему эндогенному происхождению представляет собой рибофлавин или его производное флавинмононуклеотид (ФМН), также известный как витамин В2. Помимо эндогенности и отсутствия темновой цитотоксичности, особенностью рибофлавина является его механизм формирования радикалов при облучении. Под действием излучения (УФ или видимый свет из синего спектра) рибофлавин переходит в возбуждённое синглетное состояние, которое затем за счёт интеркомбинационной конверсии переходит в возбуждённое триплетное состояние, после чего, в зависимости от содержания кислорода в системе, окислительный процесс может протекать по двум типам механизма. В случае низкого содержания кислорода активируется 1-ый тип, в ходе которого рибофлавин в возбуждённом триплетном состоянии передаёт энергию на субстрат, в результате чего формируется свободнорадикальная форма рибофлавина, которая затем реагирует с кислородом, приводя к образованию активных форм кислорода (АФК). В механизме 2-ого типа, когда содержание кислорода высоко, рибофлавин сразу передаёт энергию молекулам кислорода, что приводит к образованию ещё большего числа АФК, в том числе синглетного кислорода, который в свою очередь реагирует с субстратом (Схема 1.9.) [59]. В случае использования рибофлавина или флавинмононуклеотида в качестве фотоинициатора предпочтительным

является механизм 1-ого типа, поскольку радикалы рибофлавина являются долгоживущими, что приводит к большей степени конверсии при реакции сшивки.

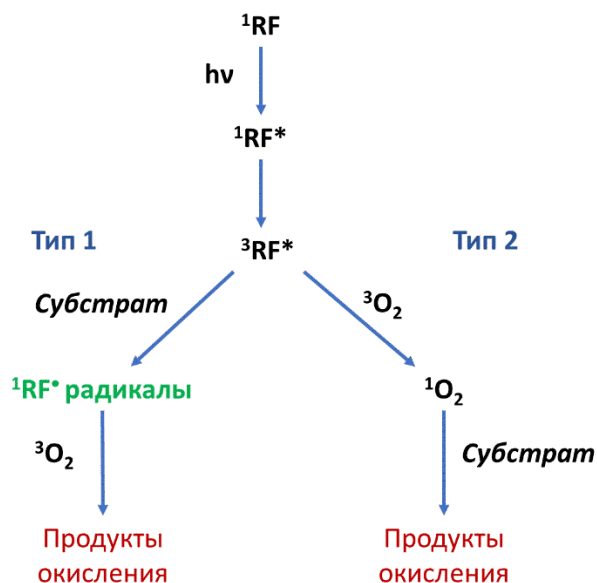


Схема 1.9. Схема окисления соединений рибофлавином (RF) под действием облучения [59].

Большинство фотоинициаторов и фотосенсибилизаторов требуют для инициации реакции сшивания ближнее УФ (320-390 нм) или коротковолновое видимое излучение (390-450 нм). Такое излучение можно использовать для изготовления гидрогелей *in vitro*, однако делает трудноосуществимым или практически невозможным малоинвазивное желирование композиций *in situ*, непосредственно в организме. Такое коротковолновое излучение имеет невысокую проникающую способность (< 4 мм), а также в случае использования света из УФ диапазона может наблюдаться фотоповреждающий эффект на клетках и тканях организма. Таким образом, для изготовления скаффолдов *in situ* и желирования гидрогелей с инкорпорированными живыми клетками перспективнее всего использовать фотосенсибилизаторы и фотоинициаторы, возбуждаемые той длиной волны излучения, которая способна проникать сквозь ткани организма и оказывать минимальное повреждающее воздействие на них. Этот диапазон длин волн излучения, обладающий максимальной глубиной проникновения в ткани организма и минимальным рассеянием, является так называемым “окном прозрачности”, и представляет собой длинноволновое излучение из видимого спектра и ближнего ИК излучения (650-950 нм) [60].

Было разработано множество систем фотоиницирования на основе красителей, поглощающих в видимом диапазоне спектра, или обычных УФ фотоинициаторов со смещением поглощения в красную область спектра, однако до сих пор фотополимеризация и фотосшивка с использованием излучения более 550 нм остаётся трудно решаемой

задачей, поскольку фотоны такого излучения являются низкоэнергетическими, и, следовательно, менее эффективными. Среди наиболее перспективных фотосенсибилизаторов, поглощающих в дальней красной или ближней ИК областях, являются макроциклические соединения, представленные порфиринами и фталоцианинами. Для повышения эффективности используются многокомпонентные фотоиницирующие системы, в которых помимо таких макроциклов в качестве фотосенсибилизаторов и со-инициаторов также используются ингибиторы синглетного кислорода (например, производные фосфина или азид натрия) и термические инициаторы [61]. Ещё одним способом являются модификации порфиринов и фталоцианинов для улучшения их характеристик, например, получение производных порфиринов с различными двухвалентными металлами (металаты), способных к окислительно-восстановительной активности за счёт ионов металлов [62].

1.3.1.3. Основные фотоиндуцируемые реакции для получения гидрогелей

Кроме различных фотоинициаторов и фотосенсибилизаторов, существуют также разные типы фотосшивки, и для биомедицинского применения подходят следующие типы: на основе свободнорадикальной цепной полимеризации, на основе тиол-еновой поликонденсации и окислительно-восстановительной радикальной полимеризации

Свободнорадикальная цепная полимеризация представляет собой процесс образования цепи полимера из мономеров с участием свободных радикалов. Этот процесс можно разделить на три основные стадии – инициирование, рост цепи и обрыв цепи. На первой стадии за счёт химического разложения или термо- или фотоинициирования происходит превращение инициатора в свободные радикалы и их взаимодействие с мономерами, что в свою очередь приводит к образованию мономерного радикала. На второй стадии происходит присоединение мономерного радикала к другому мономеру с образованием макрорадикала, который затем последовательно присоединяет к себе всё новые момеры, образуя растущую полимерную цепь. Орыв цепи происходит, когда встречаются два макрорадикала, при этом может происходить либо рекомбинация, когда два макрорадикала объединяются в один полимер, либо диспропорционирование, в ходе которого один из макрорадикалов отщепляет от второго атом водорода. Модификация полимеров функциональными группами, содержащими двойные связи (например, метакрильными, акрильными, акриламидными), позволяет проводить их фотосшивку по механизму свободнорадикальной полимеризации [63]. Такой способ сшивки является самым распространённым и наиболее подходящим для биомедицинского применения ввиду наименьшей токсичности и наилучшей растворимости компонентов в водной среде.

Недостатком этого способа является ингибирование кислородом, который неизбежно присутствует в композициях для получения скаффолдов, полученных с использованием клеток [64].

Тиол-еновая поликонденсация (и основанная на ней фотосшивка) представляет собой присоединение тиольной группы к винильной в присутствии радикалов (сформированные фотоинициатором в случае фотосшивки). Стадия инициирования происходит аналогично свободнорадикальной цепной полимеризации с образованием тиольного радикала при взаимодействии радикала инициатора с тиольной группой. Рост цепи проходит по двум стадиям: вначале происходит присоединение тиольного радикала к винильной группе, а затем образовавшийся углеводородный радикал присоединяется к другим винильным группам. При этом формирование полимера происходит по ступенчатому механизму, в ходе которого происходит передача цепи при переносе с углеводородного радикала на тиольную группу с образованием нового тиольного радикала [65]. Наличие тиольной группы практически полностью исключает ингибирование реакции кислородом по сравнению с остальными радикальными реакциями, однако из-за особенностей механизма гидрогели невозможно формировать в присутствии клеток – тиольная группа легко реагирует с белками [66].

Окислительно-восстановительная фотосшивка является перспективным способом получения сшитых гидрогелей за счёт использования фотосенсибилизаторов. При этом в присутствии кислорода фотосенсибилизаторы могут вступать в дополнительные реакции с образованием синглетного кислорода, супероксидов и даже пероксида водорода, способных окислять гидроксильные, сульфидные и аминогруппы [67]. Таким образом, в отличие от вышеупомянутой свободнорадикальной цепной полимеризации, где кислород выступает ингибитором реакции, в случае окислительно-восстановительной фотосшивки присутствие кислорода, наоборот, является предпочтительным. Однако, стоит отметить, что продукция активных форм кислорода в ходе фотосшивки может негативно сказаться на свойствах полимера и оказать цитотоксическое действие. Примером этого типа фотосшивки являются полимеры, модифицированные фенольными соединениями, например, тирозином или тирамином [63].

Активация фотополимеризации излучением с определённой длиной волны не только позволяет эффективно контролировать степень сшивки гидрогеля и проводить её в комфортных для клеток физиологических условиях, но и открывает целый спектр лазерных аддитивных технологий (АТ) [4,42]. Кроме того, возможность фотоотверждения светом из красного или ближнего ИК диапазона позволяет проводить желирование *in situ*, непосредственно в организме [68].

1.3.2. Нековалентно сшитые гидрогели

Несмотря на перечисленные преимущества, реакция сшивания, основанная на формировании ковалентных связей, обладает и недостатками. Она может существенно влиять на различные свойства полимера, например, сорбционную емкость и биологическую активность, реагенты зачастую обладают выраженной цитотоксичностью, кроме того, для получения ковалентно сшитых гидрогелей нередко требуются сложные многокомпонентные растворы или многоступенчатые модификации прекурсоров, что делает их получение дорогостоящим и ограничивает их применение для решения ряда медико-биологических задач. Таких проблем можно избежать с помощью гидрогелей, полученных за счёт нековалентных взаимодействий.

Нековалентно сшитыми являются гидрогели, полимерная сетка которых образована водородными, ионными, гидрофобными или Ван-дер-Ваальсовыми связями, или их комбинацией. Характер нековалентных взаимодействий даёт возможность создавать такие композиции, которые формируют сшитые гидрогели в ответ на какой-либо стимул, например, изменение температуры, pH, ионной силы, добавление солей определённых металлов.

Так, самым известным примером реакции ионного сшивания является желирование альгината в присутствии двухвалентных ионов, в частности, кальция, формирующих ионные связи с карбоксильными группами глюкозуриновых сахаридов в составе альгината [29]. Гидрогели из альгината кальция являются перспективной системой для создания костных имплантатов за счёт желирования гидроксиапатитом ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), минеральным компонентом костей. Кроме образования комплексов поливалентных металлов с функциональными группами полимеров, подобное сшивание можно проводить и за счёт формирования полиэлектролитных комплексов из двух полимеров, несущих противоположные заряды например, из ХТ и ГК [69]. Отрицательно заряженными могут быть кислотные группы, например карбоксильная и сульфогруппы, диссоциирующие в водной среде при $\text{pH} \geq 7$; положительный заряд чаще всего несут аминогруппы, способные к протонированию при $\text{pH} < 7$. За счёт ионных взаимодействий между заряженными цепями полимеров и свободными ионами, а также степени диссоциации и гидратации полиэлектролитные гидрогели способны к выраженному обратимому изменению объёма и степени набухаемости в ответ на различные внешние стимулы, такие как изменение pH, ионной силы и электрического поля. Такую зависимость свойств от воздействий окружающей среды можно применить для создания так называемых “умных” скаффолдов,

способных, например, высвободить лекарственные соединения при помещении в среду организма или электрической стимуляции [70].

Некоторые полимеры способны формировать гидрогель при обработке растворами, меняющими их pH, так называемые pH-чувствительные гидрогели. Чаще всего при этом полимеры, находившиеся в растворённом виде в воде за счёт ионизированных групп, теряют заряд, который обеспечивал электростатическое отталкивание цепей, и агрегируют. К таким полимерам можно отнести ХТ, способный растворяться в воде при pH ниже 4 и желироваться при осаждении щелочными растворами [71]. Кроме того, возможна разработка композиций, способных к отверждению при помещении в среду с pH, соответствующей среде организма. pH-чувствительные гидрогели обладают также способностью к динамическому набуханию и контракции в ответ на изменения pH в окружающей среде, как и гидрогели, на основе полиэлектролитных комплексов. Примером таких материалов является композиция ХТ с глицерофосфатом, каррагинаны, производные целлюлозы, поливинилпирролидон [72].

Существуют полимеры, способные желироваться при изменении температуры. Наиболее перспективным является подход, при котором термоиндуцированная сшивка полимеров происходит при нагревании до температуры организма, то есть такие композиции изготавливают на основе соединений с нижней критической температурой растворения (НКТР). НКТР – это температура, ниже которой система полимер-растворитель является однофазной (то есть, представляет собой гомогенный раствор), а выше происходит разделение фаз на полимер и растворитель. Наиболее известным термочувствительным полимером с НКТР является синтетический поли-N-изопропилакриламид и его сополимеры, также полимерами с НКТР являются поливинилкапролактан, полуксамеры (блок-сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля) и эфиры целлюлозы [73].

Отдельным случаем термоиндуцированного желирования является криожелирование – формирование гелей в результате кристаллизации воды в растворе полимера и последующего оттаивания. При формировании кристаллов льда происходит увеличение объёма водной фазы, сопровождающееся увеличением концентрации полимера на границе раздела фаз, что приводит к образованию нековалентных связей или переплетению цепей полимера. Наиболее известным примером соединения, способного формировать гидрогели в процессе замораживания, является ПВС. В ходе замораживания происходит сближение гидроксильных групп полимера, между ними возникают водородные связи, что приводит к образованию кристаллитов [74].

Несмотря на лучшую биосовместимость и возможность создания “умных” скаффолдов, нековалентно сшитые гидрогели уступают ковалентно сшитым в стабильности и механической прочности, хуже выдерживают нагрузки *in vivo* и быстрее деградируют внутри организма.

1.4. Методы формирования скаффолдов.

Основной задачей тканевой инженерии является создание двухмерных и трёхмерных структур скаффолдов с архитектурой любой степени сложности. Важна как общая форма изделий, которая должна соответствовать формам замещаемого органа или ткани, так и микроструктура, которая влияет на адгезию и выживание клеток, эффективное поступление питательных веществ, кислорода и секрецию межклеточного матрикса [75,76]. Наиболее привлекательной микроструктурой для клеток являются системы взаимосвязанных пор и/или каналов. Их размер и степень взаимосвязанности определяет поведение клеток. Например, в работе, посвящённой культивированию клеток на сшитых желатиновых гидрогелях, при малом диаметре пор (50-150 мкм) преобладал рост клеток, что приводило к высокой конфлюэнтности, в то время, как при большем диаметре пор (350-500 мкм) преобладала секреция внеклеточного матрикса [77]

На данный момент существует большое количество методов, позволяющих формировать скаффолды в зависимости от поставленных задач.

1.4.1. Формование (молдинг)

Самым простым методом получения скаффолдов, не требующим высокотехнологичного и дорогостоящего оборудования, является литьё композиций в специальные формы (молды). В этом методе молд при атмосферном или повышенном (для наилучшего заполнения формы) давлении заполняют полимерной композицией, которая желируется, и полученную гидрогелевую конструкцию извлекают из молда. Этот тип методов является репликативным, то есть, получаемые изделия представляют из себя точную реплику (копию) формы молда. Однако, таким способом невозможно в одну стадию создавать конструкции с закрытыми внутренними полостями или сложной формы, для этого необходимо формовать несколько частей будущего скаффолда и соединять их или использовать метод импринтинга с введением в гидрогель необходимых наполнителей, удаление которых из гидрогеля оставляет в нём полости нужной формы [78]. Для получения скаффолдов с микроструктурным рельефом поверхности используется микромолдинг – литьё и фиксация композиций в молдах с поверхностью, покрытой микроструктурными элементами [79].

1.4.2. Трёхмерная (3D) печать

Проблему формирования скаффолдов со сложной топографией поверхности могут решить быстро развивающиеся в настоящее время аддитивные технологии (АТ), также известные как 3D печать. В основе АТ лежат методы послойного наращивания объектов 3D принтерами, алгоритм которых задаётся компьютерными программами. Общий подход этих методов состоит в том, что трёхмерные объекты создаются послойным нанесением двухмерных структур друг на друга, что позволяет создавать объекты практически любых форм, включая различного рода внутренние полости. Это свойство АТ является наиболее важным при создании индивидуальных ТИК для каждого пациента. Ограничивающим фактором данного набора методов являются свойства веществ, из которых формируют скаффолд, так как для каждого типа материала требуется отдельный способ обработки перед 3D-печатью, а также различные модификации самого 3D принтера. Данные ограничения особенно актуальны для многих биоматериалов, необходимых для решения задач тканевой инженерии.

Существуют два основных подхода к созданию гидрогелевых скаффолдов методами АТ: экструзионная 3D печать и 3D печать на основе методов литографии (Схема 1.10.).

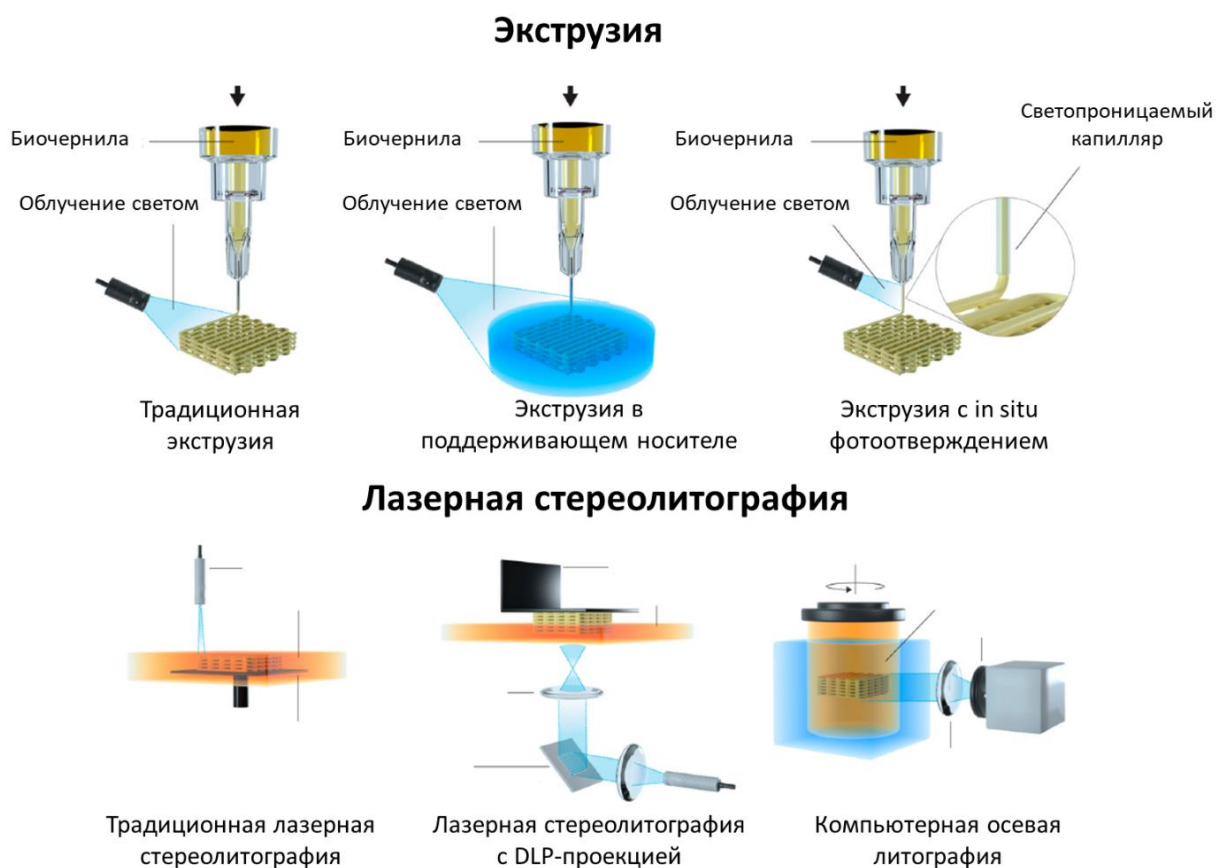


Схема 1.10. Методы экструзии и лазерной стереолитографии и их вариации. DLP – digital light processing, цифровая обработка светом. [63]

Метод экструзионной 3D печати основывается на экструзии вязкой жидкости (раствор, паста или дисперсия) из шприца на платформу или в жидкую среду подходящей плотности. Этот процесс может происходить как при комнатной температуре, так и при повышенной [80]. Отверждение экструдированного материала может происходить различными способами. Так, при использовании природных термочувствительных полимеров, таких как агароза или желатин, горячий раствор полимера (температура выше 60 °C) выдавливается в более холодный носитель из силиконового масла (комнатная температура), что сопровождается быстрым застыванием с образованием гидрогеля [81]. Другой подход основан на экструзии полимеров в среду, содержащую сшивающие агенты. Например, растворы альгиновой кислоты экструдировать в растворы хлорида кальция [82].

Ключевым преимуществом данной технологии является использование природных полимеров, применение которых невозможно для других методов АТ, таких как методы послойного наплавления или селективного лазерного спекания. Однако гели из большинства природных биополимеров обладают достаточно низкой жёсткостью, что делает невозможным создание сложных форм, особенно со свисающими структурами, и может привести к разрушению всей конструкции, если не использовать временные опорные материалы.

Биопечать представляет собой раздел 3D рисования, в котором живые клетки инкорпорируют в гель непосредственно в процессе создания композиции. Клетки при этом сразу добавляют в экструдированную жидкость, обычно из раствора альгината натрия, фибрина или желатина. Раствор с клетками можно экструдировать из шприца под давлением, наносить под действием электростатических сил или лазерного излучения. Биопечать позволяет точно контролировать пространственное распределение клеток и ростовых факторов в скаффолде при комнатной температуре и в мягких условиях.

Лазерная стереолитография (ЛС) – метод, основанный на отверждении фотополимерных смол под действием лазерного луча; при этом отверждение не должно происходить за пределами зоны облучения лазером. Для этого метода часто используют гелий-кадмиевые лазеры с УФ излучением. Основные требования к фотополимерам заключаются в наличии звеньев, способных к гомолитическому распаду и сшивке при облучении, наиболее распространёнными из которых являются акриловые, метакриловые и эпокси-группы [83]. В приборах для ЛС отверждение фотополимера происходит на специальной платформе, которая после формирования первого слоя конструкции

погружается вниз. При этом жидкий фотополимер должен равномерно покрыть верхние части сформированной двумерной конструкции. После нанесения новый слой подвергается фотоотверждению лазером. В этом подходе движение платформы осуществляется сверху вниз, но также существует вариант, при котором движение платформы происходит снизу вверх. Для такого подхода используют прозрачные пластины на дне ёмкости с фотополимером, через которые проходит лазерный пучок. После завершения конструирования жидкость сливается, а объект подвергается дополнительной обработке УФ облучением для удаления непрореагировавших групп [84].

Преимуществами метода ЛС являются высокое разрешение за счёт узконаправленного лазерного пучка (до 1 мкм), способность к созданию сложнейших форм с внутренней структурой и легкость удаления непрореагировавшего материала, в отличие от метода 3D печати. Самой главной проблемой ЛС остаётся чрезвычайно узкий набор биосовместимых полимеров, способных к фотосшивке, а также токсичность фотоинициаторов и продуктов радикальной полимеризации. По этой причине метод ЛС в основном используется для создания анатомических моделей и молдов, в которых отпечатываются уже биodeградируемые и биосовместимые конструкции. Из биосовместимых и фотополимеризуемых материалов наиболее распространён полипропилен фумарат, а также его композиции с диэтиленфумаратом [85]. Последние достижения в области ЛС направлены на увеличение количества материалов, пригодных для данного метода за счёт модификации различных полимеров фоточувствительными акриловыми или метакриловыми группами, например, ПЭГДА, метакрилаты желатина, агарозы и ГК [86–88].

Помимо молдинга и АТ существует ещё также ряд методов, нацеленных на формирование в скаффолдах определённой микроструктуры и морфологии [89]: газовое вспенивание, замораживание-оттаивание, электроспиннинг, выщелачивание и т.д.

1.4.3. Газовое вспенивание

Суть метода заключается в барботаже газа через раствор композиции для получения скаффолда или введении в неё газа под давлением с последующей экструзией композиции в нормальной атмосфере, приводящей к резкому расширению газа и вспениванию материала. Чаще всего для таких целей используют атмосферный воздух и различные инертные газы (азот, аргон), поскольку они безопасны и нетоксичны как для производства, так и для клеток, а также такие газы недороги [90–92]. Особого внимания заслуживают методы, основанные на использовании сверхкритического диоксида углерода, который благодаря своему состоянию обладает и плотностью жидкости, что препятствует

схлопыванию пор, и высокой диффузионной способностью газа, что позволяет эффективно проникать в композицию [93,94]. Вторым вариантом получения вспененных материалов является добавление химических реагентов, которые при контакте со средой материала или термообработке распадаются с выделением газа [95,96]. Несмотря на простоту и дешевизну методик вспенивания, они не позволяют эффективно контролировать размер и распределение пор, которые зачастую оказываются слишком крупными (> 300 мкм) [97]. Частично эту проблему решает использование микрофлюидных технологий, позволяющих на микроуровне регулировать размер пузырьков газа/жидкости и скорость их подачи в композицию [98].

1.4.4. Замораживание-оттаивание

При заморозке композиции (это могут быть как растворы, так и гели) кристаллы растворителя вытесняют молекулы основного материала на границы кристаллов, что приводит к уплотнению и агрегации вещества и формированию стенок будущих пор [99]. Замороженный растворитель удаляют лиофильным высушиванием [100,101]. Для этого метода чаще всего используют водные растворы, поэтому далее будут описаны процессы только с формированием кристаллов льда. В некоторых случаях получение скаффолда может происходить без высушивания, как, например, в случае с растворами кератина, где несколько циклов заморозки-оттаивания приводит к формированию водородных и дисульфидных связей между молекулами кератина [102]. Процесс в таком случае представляет собой криожелирование, а получаемые гели – криогели [103]. Размер, распределение и морфология пор сильно зависят от температуры заморозки, концентрации и типа растворителя, направления роста кристаллов льда [104,105]. Так, например, предварительное образование корки льда (сайт нуклеации) на дне молда приводит к появлению ламеллярных кристаллов льда, растущих перпендикулярно сайту, и, соответственно, столбчатых пор, в то время как отсутствие сайтов нуклеации приводит к образованию губчатой структуры с системой хаотично расположенных пор [106].

1.4.5. Электроспиннинг

Электроспиннинг, также известный как электроформование или электропрядение, — это способ получения микро- и наноразмерных волокон полимера посредством вытягивания струи полимерного раствора в электростатическом поле. При приложении высокого напряжения капли полимерного раствора, выходящие из сопла, становятся заряженными, одноимённые заряды отталкиваются, противодействуя силе натяжения и вызывая сильное вытягивание капли до состояния нити, после чего нить попадает на

подложку на противоположном электроде [107]. Если полимер растворён в легколетучем растворителе, то на подложку будут попадать уже сухие волокна. При наслаивании достаточно большого количества слоёв на подложку можно получить высокопористый нетканый материал. Несмотря на возможность создания микро- и наноразмерной архитектуры и высокопористых структур, для получения нитей желаемой толщины и качества нужно учитывать множество параметров: напряжение, скорость подачи раствора, концентрацию полимера и растворителя, вязкость раствора, тип и качество растворителя, температуру и влажность воздуха и т.д., что делает данную методику достаточно чувствительной к изменениям условий и состава композиций [108]. Кроме того, при получения скаффолдов на основе многих гидрофильных полимеров (желатин, ХТ, альгинат) их необходимо фиксировать или химически сшивать для предотвращения немедленного растворения при попадании в водную среду [109,110].

1.4.6. Выщелачивание порогенов

В композицию можно вводить частицы (т.н. порогены), которые после формирования и фиксации скаффолда из него выщелачиваются, оставляя после себя поры. В качестве порогенов чаще всего используются соли (NaCl) и сахара, поскольку они легко растворяются и вымываются в водной среде [111–113]. Для достижения наибольшей прочности и связанности всех частей скаффолда очень важно, чтобы толщина наносимого слоя была больше размера частиц порогена и меньше 150 мкм. Данная методика позволяет легко контролировать размер и унимодальность пор за счёт подбора порогена. Однако разность плотностей приводит часто к неравномерному распределению порогена в композиции, что влияет на плохую взаимосвязанность системы пор и их гетерогенность [114]. Данная проблема была решена Ни С. С соавторами путем использования магнитных частиц из сахарозы, задающих размер, распределение и форму пор под действием магнитного поля [113] [115]. Кроме того, полное покрытие полимером порогенов может значительно затруднить их диффузию при выщелачивании, например при введении NaCl в растворы полилактидов в хлороформе [116].

1.4.7. Формирование ориентированных каналов в процессе осаждения

Данная методика стоит обособлено от остальных способов, поскольку механизмы появления пор до сих пор до конца не изучены, а сама методика применима для ограниченного количества материалов. При определённых условиях осаждения некоторых полимеров происходит формирование канальной системы ориентированной параллельно вектору диффузии осадителя. Подобная микроархитектура описана в литературе для

коллагена, альгината и ХТ. В случае использования коллагена [117] материал формирует разветвлённую сеть каналов при высаливании. Альгинатные гели с параллельно ориентированными неразветвлёнными каналами [118,119] получают в ходе длительного многостадийного процесса с использованием катионов тяжёлых металлов (барий, медь, цинк, стронций) под действием электрического поля с последующей сшивкой бифункциональными реагентами для стабилизации геля и отмывкой от ионов металлов. ХТ гидрогели с аналогичной альгинатным структурой получают при осаждении щелочными растворами как с сшивкой, так и без неё [120–122]. Такие ориентированные каналные структуры можно использовать для регенерации кровеносных сосудов, а неразветвлённые варианты – для регенерации разрывов нервов.

Данный литературный обзор продемонстрировал основные типы материалов для тканевой инженерии, способы их обработки и методы их формования. Несмотря на большое разнообразие подходов, создание ТИК, наилучшим образом удовлетворяющих задачам тканевой инженерии, всё ещё остаётся нерешённой проблемой, поэтому разработка новых составов, методов и технологий формования скаффолдов для увеличения разнообразия инструментария тканевой инженерии является наиболее перспективной стратегией в данной области исследования. Материалы на основе природных полисахаридов и их производных, таких как хитозан и гиалуроновая кислота, привлекают особое внимание. Получение скаффолдов, отвечающих необходимым требованиям и обладающих специальными свойствами, которые определяются особенностями каждого из этих полимеров, позволит значительно расширить набор материалов для применения в тканевой инженерии.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Материалы

Хитозан (ХТ, $M_n \approx 300-500$ кДа, степень деацетилирования 91%) фирмы Shijiazhuang Yishengtang Medical Product Co. Ltd. (Китай) использовали без дополнительной очистки. Натриевую соль гиалуроновой кислоты (ГК, $M_n \approx 100$ кДа), поливиниловый спирт (ПВС, $M_n \approx 89-98$ кДа, степень гидролиза 99%), глицидилметакрилат (ГМА), триэтиламин (ТЭА), тетраэтиламмоний бромид (ТЭАБ), триэтанолламин (ТЭОА), полиэтиленгликоль диакрилат (ПЭГДА, $M_n = 575$), перманганат калия ($KMnO_4$), тетраборат натрия декагидрат ($Na_2B_4O_7 \times 10H_2O$), 4-диметиламинобензальдегид (ДМАБ), N-ацетил-D-глюкозамин фирмы Merck использовали без дополнительной очистки. Ацетон, диметилформамид (ДМФА), диметилсульфоксид, изопропиловый спирт, этанол (EtOH, 95%), гидроксид натрия (NaOH), бромид калия (KBr), соляная кислота концентрированная (HCl), ледяная уксусная кислота из компании Химмед (Россия) применяли без дополнительной очистки. 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ, 97%) был приобретён в Hangzhou Dingyan Chem Co., Ltd (Китай). Бычья тестикулярная гиалуронидаза получена из препарата “Лидаза” (НПО МИКРОГЕН, Россия) Использовали реактивы отечественных производителей флавиномононуклеотид (ФМН) из препарата “Рибофлавин Мононуклеотид” производства Фармстандарт, амфотерицин В (5 мг/мл) производства ОАО Синтез. Использовали пенициллин-стрептомицин (5000 ед/мл пенициллина G и 5000 мкг/мл стрептомицина), фосфатно-солевой буфер (pH 7,4), клеточную среду Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) с 10% фетальной бычьей сывороткой и 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (краситель МТТ) компании PanEco. Золетил 100 получен из Virbac (Франция), “Рометар” получен из Spofa (Чешская республика), гематоксилин-эозиновый набор для окрашивания получен из Abscam (США). Водорастворимый пиридин-замещённый фталоцианин $\{(4,4',4'',4'''\text{-}(29N,31N\text{-фталоцианин-}1,8,15,22\text{-тетраил-}k4N29,N30,N31,N32)\text{тетраakis}[1\text{-метилпиридинато}(2-)]\}\text{цинк}(4+)\text{ тетраиодид}$ ($M_m = 1453$ г/моль) синтезирован и любезно предоставлен коллегами из Университета технологий Тампере, Финляндия [123].

2.2. Методы

2.2.1. Модификация ГК, характеристика мГК

2.2.1.1. Полимераналогичная реакция ГК с глицидилметакрилатом (ГМА)

Для проведения реакции конъюгации ГК растворяли в деионизированной воде в концентрации 0,78 масс.%. После полного растворения ГК добавляли органический растворитель ДМФА в объёмном соотношении вода/ДМФА=1,5/1 для получения водно-

органической среды. Для предотвращения возможного роста микроорганизмов в реакционную смесь также добавляли на 100 мл воды 500 мкл пенициллин-стрептомицина и 128 мкл амфотерицина В. Для изучения влияния рН среды, а также влияния катализаторов фазового переноса в реакционную смесь после введения ДМФА добавляли следующие соединения: для получения нейтральной среды (рН 6,5) либо не добавляли никаких присадок, либо вводили катализатор ТЭАБ, который не меняет рН, в массовом соотношении ГК/ТЭАБ = 1/0,64; для создания щелочной среды (рН 10) добавляли ТЭА, который не только является катализатором фазового переноса, но и обладает высоким рН, в объёмном соотношении вода/ТЭА = 100/2,9; для создания кислой среды (рН 3) добавляли концентрированную HCl в объёмном соотношении вода/HCl = 100/0,28. После тщательного перемешивания всех компонентов вводили ГМА. Для изучения влияния ГМА на степень замещения (СЗ) реагент вводили в различном соотношении ГК/ГМА (г/мл): 1/6, 1/8, 1/12, 1/14, 1/18, 1/24, 1/35. После растворения ГМА реакционную смесь оставляли при постоянном перемешивании в шейкере-инкубаторе ES 20/60 (Biosan, Латвия) при 25, 30 или 40 °С на время от 1 до 7 суток. Для остановки реакции и выделения модифицированной ГК (мГК) продукт осаждали в 7-кратном избытке ацетона и центрифугировали осадок 5 минут при 6000 об/мин. Для очистки продукта осадок растворяли в дистиллированной воде, помещали в диализные мешки и диализовали против 10-кратного избытка дистиллированной воды в течение 4 суток с ежедневной сменой воды. После очистки продукт полностью замораживали и лиофильно высушивали в течение 2 суток до полного удаления воды.

2.2.1.2. Калибровка перманганата калия и определение содержания двойных связей в ГМА

Для калибровки KMnO_4 были подготовлены растворы KMnO_4 в деионизированной воде в диапазоне концентраций 0,00625-0,1 мг/мл. Для всех образцов были получены спектры поглощения в диапазоне длин волн 390-710 нм. Значения поглощения характеристического пика при 525 нм каждого образца были использованы для построения калибровочного графика зависимости поглощения растворов KMnO_4 от его концентрации [124].

Для определения содержания двойных связей ГМА растворяли в деионизированной воде для получения раствора 0,5 об.%. Водный раствор ГМА добавляли к раствору KMnO_4 (0,25 мг/мл) в диапазоне от 10 до 70 мкл, тщательно перемешивали и снимали спектр поглощения через 5 минут после смешивания. Добавление раствора ГМА вызывает изменение цвета смеси с фиолетового до коричнево-жёлтого, что сопровождается уменьшением пиков KMnO_4 . Был построен график зависимости поглощения от

концентрации оксида марганца (MnO_2), накопление которого отслеживали по поглощению при 420 нм для каждого образца. Также значения поглощения при 525 нм для каждого из образцов, содержащих различный объём ГМА, были использованы для построения графика зависимости поглощения от остаточного содержания $KMnO_4$ с учётом содержания MnO_2 . Концентрацию ГМА и, соответственно, двойных связей, необходимых для полного восстановления перманганат-ионов рассчитывали экспериментально и теоретически и использовали в дальнейшем при оценке степени замещения (СЗ) мГК остатками ГМА [124]. Все спектры поглощения были получены с использованием спектрофотометра Evolution 201 (Thermo Fisher Scientific, США).

2.2.1.3. Определение СЗ в мГК перманганатометрией

Для количественного определения СЗ мГК 1 мл стандартного раствора $KMnO_4$ (0,0625 мг/мл) титровали водным раствором мГК (5 мг/мл) до полного изменения окраски (от фиолетового к жёлтому) со спектрофотометрическим подтверждением по исчезновению пиков поглощения $KMnO_4$ в области 450-600 нм с использованием спектрофотометра UV/Vis Evolution 201 (Thermo Fisher Scientific, США).

СЗ в ГК двойными связями была определена как отношение количества привитых звеньев ГМА к суммарному количеству дисахаридных звеньев в исследуемых образцах. Концентрация двойных связей, при которой наблюдается полное восстановление стандартного раствора $KMnO_4$ (0,0625 мг/мл), является постоянной величиной и составляет 0,593 мкмоль. Количество дисахаридных звеньев определяли по тому количеству мГК, которая требовалось для полного восстановления стандартного раствора $KMnO_4$.

2.2.1.4. ИК-Фурье спектроскопия мГК

Образцы для ИК-Фурье спектроскопии подготавливали следующим образом: лиофилизированную мГК перемешивали с KBr и тщательно перетирали в агатовой ступке. Полученный порошок спрессовывали в ручном прессе (Pike technologies, США) в 7 мм таблетки, которые исследовали с использованием ИК-Фурье спектрометра Varian Excalibur 3100 (Varian Medical, США).

2.2.1.5. ЯМР спектроскопия мГК

1H ЯМР анализ образцов ГК и мГК был проведён на ЯМР спектрометре Bruker Avance 700 MHz с 5 мм PAXI 1H -13C/D/15N Z-GRD пробой. Образцы растворяли в дейтериевой воде и остаточный сигнал воды подавляли с использованием моделирования

возбуждения с градиентами. Программное обеспечение Bruker TopSpin (version 3.5) было использовано для обработки и визуализации ЯМР спектров.

С помощью ^1H ЯМР спектроскопии было рассчитано количество конъюгированных групп ГМА в мГК. СЗ рассчитывали как отношение относительного интеграла пиков протонов ГМА (~ 6.2 или ~ 5.8 ppm) к метильным протонам ГК (~ 2 ppm), умноженное на 100 [125].

2.2.2. Получение гидрогелей и скаффолдов на их основе

2.2.2.1. Получение ХТ наночибриллярных гелей (НФГ) низкотемпературным термоиндуцированным разделением фаз в незамерзающих условиях.

ХТ диспергировали в дистиллированной воде. Ледяную уксусную кислоту или концентрированную HCl добавляли для протонирования свободных аминогрупп остатков D-глюкозамина. Смесь перемешивали до получения гомогенного раствора. Затем этанол медленно добавляли к раствору при постоянном перемешивании, для предотвращения выпадения ХТ в осадок. Концентрацию ХТ ($C_{\text{ХТ}}$, масс.%) в начальном водном растворе регулировали в зависимости от объёмной доли этанола (ϕ_{EtOH} , об.%) и конечной концентрации ХТ в финальном растворе. Получаемые растворы обозначали как ХТ- n /EtOH- m , где n и m это $C_{\text{ХТ}}$ и ϕ_{EtOH} в процентах, соответственно (Таблица 2.1.). T_{fr} – температура замерзания смеси воды и EtOH без ХТ и кислоты.

Таблица 2.1. Композиции для получения ХТ алкогелей.

Образец геля	$m_{\text{ХТ}}$, мг	V_{EtOH} , мл	$V_{\text{H}_2\text{O}}$, мл	V_{HCl} , мкл	$T_{\text{fr H}_2\text{O/EtOH}}$, °C
ХТ-2/EtOH-47,5	200	5	5	114	-29.7
ХТ-1/EtOH-47,5	100	5	5	57	-29.7
ХТ-0,5/EtOH-47,5	50	5	5	29	-29.7
ХТ-3/EtOH-47,5	300	5	5	171	-29.7
ХТ-2/EtOH-38	200	4	6	114	-21.6
ХТ-1/EtOH-38	100	4	6	57	-21.6
ХТ-2/EtOH-28,5	200	3	7	114	-13.9
ХТ-1/EtOH-28,5	100	3	7	57	-13.9

Композицию, содержащую уксусную кислоту вместо HCl, готовили так же, как ХТ-2/EtOH-47,5, используя 100 мкл ледяной уксусной кислоты вместо HCl. Растворы обрабатывали ультразвуком в RK 52 H Sonorex Super (Bandelin Electronic GmbH & Co. KG)

при температуре ниже 30°C в течение 20 минут. Затем растворы разливали в специально изготовленные для работы силиконовые формы (молды), культуральные планшеты или полые цилиндры с поршнем, переносили в охлаждающую камеру и инкубировали при заданной температуре охлаждения, T_q ($-36^\circ\text{C} \leq T_q < 10^\circ\text{C}$), до формирования нестабилизированного алкогеля (НСт-алкогель). НСт-алкогель извлекали из молда, переносили в коагуляционную ванну (стадия нейтрализации: водно-спиртовой 1,5 масс. % раствор NaOH, при этом ϕ_{EtOH} в растворе NaOH равна ϕ_{EtOH} в исследуемом растворе ХТ, объём щелочного раствора в 1,5 раза превышал объём начального раствора ХТ) и инкубировали при температуре стабилизации ($T_{\text{ст}}$), равной T_q в течение ночи, затем ещё 8 ч при $T_{\text{ст.}} = -2^\circ\text{C}$. Затем образцы промывали водно-спиртовым раствором (при этом объёмная доля этанола ϕ_{EtOH} была равна ϕ_{EtOH} в исследуемом растворе ХТ) или дистиллированной водой до нейтрального значения рН. В результате получали стабилизированный алкогель (Ст-алкогель) или гидрогель, соответственно. Все гели обозначали как ХТ-*n*/ EtOH-*m* в соответствии с теми растворами, из которых они были получены.

Два контрольных геля были получены методом фазового разделения при добавлении нерастворителя (nonsolvent induced phase separation, NIPS). Контрольный образец ХТ-2/EtOH-87 был получен осаждением раствора ХТ-2/EtOH-47,5 5 95% EtOH в течение ночи, затем был обработан водно-спиртовым раствором 1,5 масс.% NaOH. Контрольный образец ХТ-2/EtOH-0 получали обработкой раствора ХТ-2/EtOH-0 водным раствором 1,5 масс.% NaOH в течение ночи. Оба контрольных образца промывали дистиллированной водой до нейтрального значения рН.

2.2.2.2. Получение ХТ гидрогелей с системой направленных каналов (ГНК)

ХТ растворяли в водном растворе HCl (1,5 об.%) при комнатной температуре и интенсивном перемешивании 15 минут. К полученному раствору добавляли концентрированный раствор ПВС (10 масс.%) и деионизированную воду и перемешивали 20 минут. Получали раствор, содержащий 2 масс.% ХТ, 0,36–0,54 об.% HCl и различные концентрации ПВС: 0, 0,375, 0,75, 1,5, 3,0, и 6,0 масс.%. Конечные композиции разливали в 24-луночные планшеты (SPL Life Sciences) или открытые полые цилиндры с поршнем ($d_{\text{внутр}} = 12$ или 21 мм, $h = 50$ или 60 мм) и выдерживали при комнатной температуре. Затем равный объём раствора NaOH различной концентрации (0,5–6,0 масс.%) заливали на поверхность композиций для осуществления фронтального желирования. Образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 8 часов. Полученные гидрогели извлекали из форм, обрабатывали деионизированной водой до нейтрального значения рН и

обозначали как ХТ/ПВС-*n*, где *n* это массовая концентрация ПВС [122]. Некоторые образцы ГНК (ХТ/ПВС-1,5) затем подвергались процедуре заморозки-оттаивания (-20 °С/комнатная температура) для изучения влияния криообработки.

2.2.2.3. Изготовление фотоотверждаемых композиций (ФОК) из мГК

Для формирования гидрогелевых скаффолдов в процессе фотоиндуцируемой сшивки изготавливали специальные ФОК в деионизированной воде или в физиологическом растворе (NaCl 0,9%) в стерильных условиях в том случае, если получаемые гидрогели использовались для *in vitro* или *in vivo* исследований. ФОК для получения гидрогелей и скаффолдов методами молдинга и 3D-печати содержали: 20 масс.% мГК, 5 масс.% ПЭГДА, 0,03 масс.% ФМН, 0,5 масс.% ТЭОА. ФОК для скаффолдов, получаемых методом 3D-печати содержали мГК с диапазоном СЗ от 30 до 55%. Для получения полых трубчатых структур ФМН и ТЭОА не добавляли в ФОК. Для инкорпорирования клеток в трубчатые скаффолды при биопечати использовали культуру клеток кератиноцитов человека HaCaT. Для этого все компоненты ФОК вводили в большей концентрации (25 масс.% мГК, 6,25 масс.% ПЭГДА), чтобы при добавлении клеток и, соответственно, разведении были получены требуемые концентрации (20 масс.% мГК, 5 масс.% ПЭГДА). HaCaT были сняты 0,05% трипсином и осаждены на центрифуге (300 g, 5 минут), затем клеточный осадок ресуспензировали в 200 мкл полной среды DMEM. ФОК и клетки аккуратно смешивали в объёмном соотношении 80:20, получая при этом фотокомпозицию, содержащую ~1 млн клеток на 1 г ФОК. [126].

Для получения скаффолдов, фотоотверждаемых *in situ* в организме, были изготовлены в стерильных условиях ФОК, содержащие 20 масс.% мГК (СЗ > 40%), 200 мкМ водорастворимого пиридин-замещённого фталоцианина, 0,35 масс.% ТЭОА в физиологическом растворе (NaCl 0,9%).

Для полного растворения и гомогенизации композиции обрабатывали в ультразвуковой ванне в течение 1 часа, затем оставляли на 1 сутки в темноте и снова обрабатывали в ультразвуковой ванне RK 52 H Sonorex Super (Bandelin Electronic GmbH & Co. KG) при температуре ниже 30°C 1 час до приготовления гомогенной смеси. Процедуру повторяли до достижения гомогенности. Все манипуляции проводили при жёлтом свете, чтобы преждевременно не инициировать фотоотверждение.

2.2.2.4. Изготовление скаффолдов на основе мГК методом молдинга

Для получения мГК скаффолдов методом формования ФОК загружали в силиконовый спейсер толщиной 1 мм с внутренним отверстием (диаметр 5 мм),

помещенный на предметное стекло, затем ФОК накрывали сверху ещё одним предметным стеклом. Для ФОК, содержащих ФМН в качестве фотоинициатора, экспонирование проводили лазерным облучением синим светом при 450 нм (интенсивность 70 мВт/см²) в течение 30 мин, затем сборку переворачивали и повторяли экспонирование. После удаления верхнего покровного стекла и спейсера на нижнем покровном стекле оставался объем, представляющий собой сшитую гидрогелевую структуру.

2.2.2.5. 3D-печать скаффолдов на основе ХТ и мГК

Скаффолды в виде решётчатых структур печатали на 3D-принтере, разработанном во ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН. Сначала водно-этанольный раствор ХТ (ХТ-2/ЭТ-47,5) или ФОК на основе мГК загружали в шприц с фильерой в виде капилляра длиной 5 мм и диаметром 250 мкм. Экструзию раствора ХТ или ФОК запускали поршнем шприца. Скорость движения поршня, как и X-Y-Z позицию шприца, контролировали G-кодом в программе Repetier.

Желирование ХТ происходило за счёт экструзии водно-этанольного раствора на охлаждаемую подложку ($T_q = -11^\circ\text{C}$). После формирования решётчатой структуры полученную алкогелевую конструкцию помещали в охлаждённую до $T_q = -11^\circ\text{C}$ ванну с водно-спиртовым раствором 1,5 масс. % NaOH ($\varphi_{\text{EtOH}} = 47,5$ об. %) для фиксации. Полученный решётчатый скаффолд отмывали дистиллированной водой до нейтрального pH.

Фотоотверждение экструдированной ФОК проводили лазерным облучением синим светом при 450 нм (интенсивность 70 мВт/см²). После изготовления скаффолды дополнительно оставляли в герметичной емкости под лазерным облучением 450 нм интенсивностью 5 мВт/см² на 3 ч для обеспечения полного протекания реакции сшивки [132].

2.2.2.6. Получение полых трубчатых скаффолдов на основе мГК

В ходе исследования была разработана новая методика получения скаффолдов на основе мГК, представляющих собой полые трубчатые структуры. Схема установки была разработана во ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН. Для этого ФОК, не содержащие фотоинициаторы, загружали в стерильный шприц со съёмной иглой, которую заменяли на фильеру, внутренний диаметр которой (1300 или 2400 мкм) определял толщину трубочки. ФОК выдавливали в раствор, содержащий свободные радикалы фотоиницирующей системы ФМН/ТЭОА (0,066 мМ ФМН и 33,5 мМ ТЭОА), которую предварительно облучали лазером на 450 нм мощностью 900 мВт. В процессе экструзии

раствор также облучали лазером по всему объёму. Внутренний диаметр трубочек контролировали временем экспонирования (от 3 до 15 минут). Удаление несшитого ФОК из трубчатых структур проводили в фосфатно-солевом буфере, слегка сдавливая образец. Биопечать ФОК, содержащих NaCaT, проводили таким же образом, как и для ФОК без клеток, в стерильных условиях через фильеру с внутренним диаметром 2400 мкм.

2.2.3. Методы исследования физико-химических свойств гидрогелей и композиций для их получения.

2.2.3.1. Исследования гидрогелей методами микроскопии

Визуальную оценку получаемых гидрогелей проводили методами оптической и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), с дополнительной съёмкой цифровыми камерами.

Перед исследованиями проводилась специальная пробоподготовка. Для оценки диаметра пор и пористости ХТ гидрогелей с канальными системами методом оптической микроскопии получали тонкие поперечные срезы на криотоме Криостат CryoStar NX50. Для исследования структуры методом СЭМ образцы гидрогелей замораживали в жидком азоте и затем лиофилизировали при $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ в лиофилизирующем аппарате FreeZone 2,5 L Benchtop Freeze Dry System (Labconco, США); при этом получали лиофильно высушенные образцы.

Изучение продольных и поперечных срезов ГНК, подсчёт количества и диаметра пор, толщины поверхностной и канальных зон, и динамики желирования композиций ХТ/ПВС осуществляли методом оптической микроскопии с использованием инвертированного микроскопа Nikon TE-2000 (Nikon, Япония), камеры TopCam и программного обеспечения TopView. Процесс формирования каналов фиксировали фото- и видеосъёмкой с использованием тонких кювет с зазором толщиной 1 или 0,5 мм.

Структура высушенных образцов методом СЭМ была исследована с помощью низковольтной СЭМ на микроскопе FEI Scios (США) при ускоряющем напряжении 1 кВ во вторичном электронном режиме [127]. Для изучения микроструктуры поверхность образцов получали либо сколом (ГНК), либо отрывом от клейкой поверхности (НФГ и гидрогели на основе мГК).

Для подсчёта диаметра и распределения пор, а также размера фибрилл на образце выбиралось по три зоны под большим увеличением; полученные изображения зон были обчислены с использованием программного обеспечения ImageJ (NIH, v1.5, MD, США).

2.2.3.2. Определение времени желирования водно-спиртовых растворов хитозана

Водно-спиртовые растворы хитозана ($V = 2$ мл) переносили в герметично закрываемые стеклянные флаконы и охлаждали при 10°C в течение 30 мин, после чего охлаждали до температур, требуемых для получения НСт-алкогелей. Время желирования (τ , мин) определяли методом “сухого щупа”. После потери текучести исследуемого раствора, измеряемую методом перевёрнутого флакона [128], в образец опускали цилиндрический щуп ($d_{\text{щупа}} = 1$ мм) из нержавеющей стали. Если при извлечении щупа с глубины $\frac{1}{2}$ высоты образца масса щупа увеличивалась более чем на 0,1%, то образец возвращали в охлаждающую камеру. Данную процедуру повторяли через определенные промежутки времени. Формирование алкогеля считали завершённым, если при извлечении щупа изменение его массы было менее 0,1%. При этом фиксировали промежуток времени (τ , мин) от помещения образца в охлаждающую камеру до формирования НСт-алкогеля. Эксперимент повторяли по меньшей мере 3 раза, сокращая промежутки времени между испытаниями щупом в области достижения τ , определенного в предыдущем эксперименте.

НСт-алкогели, в которых след от извлеченного щупа закрывался полностью, частично или не закрывался, обозначали, как “мягкий”, “полутвердый” или “твердый” гель, соответственно.

2.2.3.3. Определение температуры размягчения (T_{sp}) НСт-алкогелей хитозана

T_{sp} определяли при нагревании НСт-алкогелей методом падающего шарика. Вначале, медный шарик с массой 305 мг, охлаждённый до T_q , располагали на поверхности геля во флаконе. Флакон (V образца = 2 мл) герметично закрывали и помещали в термостат, после чего нагревали со скоростью $0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, пока медный шарик не проваливался на дно флакона. Эту температуру фиксировали как T_{sp} .

2.2.3.4. Тест на набухаемость гидрогелей

Образцы цилиндрических гидрогелей с соотношениями $h = 12 \pm 0,10$ мм и $d = 16 \pm 0,15$ мм для ХТ образцов и $h = 1 \pm 0,05$ мм, $d = 5 \pm 0,1$ мм для образцов из мГК инкубировали в 20-кратном избытке дистиллированной воды в течение 7 суток с ежедневной заменой воды. Степень набухания (SWR) при $V_1 > V_0$ или степень усадки (SR) при $V_1 < V_0$, были посчитаны с использованием следующей формулы:

$$\% SWR \text{ или } SR = |V_1 - V_0|/V_0 \times 100\% \quad (1),$$

где V_0 это начальный объём образца гидрогеля, а V_1 это конечный объём образца после инкубирования. Линейные размеры были измерены с помощью электронно-цифрового микрометра 293 series, IP65 (Mitutoyo, Япония).

2.2.3.5. Механические тесты

Испытание прочности на сжатие гидрогелей проводили на устройстве ElectroPuls E-1000 Dynamic Test System (Instron, США). Скорость сжатия составляла 1 мм/мин ($T = 25^{\circ}\text{C}$, степень деформации = 15%) в вертикальном направлении. Образцы для механических тестов представляли собой цилиндры с $h = 12 \pm 0,10$ мм и $d = 16 \pm 0,15$ мм для ХТ гелей или $h = 1 \pm 0,05$ мм, $d = 5 \pm 0,1$ мм для мГК гидрогелей. Модуль Юнга на сжатие был рассчитан программой (Bluehill 3 TESTING Software), либо с использованием следующих уравнений:

$$E = tg \alpha \times \left(\frac{L_0}{A_0} \right) \times 100\% \quad (2),$$

где L_0 это высота образца, A_0 это площадь образца, $tg \alpha$ это отношение компрессионного напряжения к компрессионной деформации, посчитанное методом наименьших квадратов:

$$tg \alpha = \frac{F}{\Delta L} \times 100\% \quad (3),$$

где F это компрессионное напряжение, а ΔL это компрессионная деформация.

2.2.3.6. Оптический тест

Оптическая прозрачность алкогелей ХТ была определена спектрофотометрически на приборе UV/Vis Evolution 201 (Thermo Fisher Scientific, США) в режиме пропускания в диапазоне длин волн 400-950 нм. Также проводили съёмку образцов цифровой камерой Coolpix A1000 (Nikon, Japan). Образцы изготавливали в соответствии с пунктом 2.2.2.1. в пластиковых кюветках (длина оптического пути 10 мм).

2.2.3.7. Рентгенофазовый анализ

Для проведения рентгенофазового анализа ХТ гидрогелей и лиофилизированных гелей ХТ был использован дифрактометр Rigaku MiniFlex 600 X-ray (Япония) с источником излучения $\text{Cu K}\alpha$ (1.5406 \AA), работающим при 40 кВ и 15 мА. Все образцы сканировали в диапазоне углов 2θ от 8.00° до 80.00° на скорости $2^{\circ}/\text{мин}$.

2.2.3.8. Реологические исследования

Для измерения кинематической вязкости разбавленных растворов мГК были использованы вискозиметры ВПЖ-2 0,34 и ВПЖ-2 0,56. Для измерения вязкости определяли время истечения жидкости из камеры вискозиметра при 37°C , затем рассчитывали по формуле:

$$V = \frac{g}{9,807 \left(\frac{\text{мм}^2}{\text{с}^2}\right)} \times K \times T \quad (4),$$

где V – кинематическая вязкость жидкости в $\text{мм}^2/\text{с}^2$, K – постоянная вискозиметра в $\text{мм}^2/\text{с}^2$, T – время истечения жидкости в секундах, g – ускорение свободного падения в месте измерений в $\text{м}/\text{с}^2$. Константы вискозиметров составляли $0,003410 \text{ мм}^2/\text{с}^2$ для ВПЖ-2 0,34 и $0,008745 \text{ мм}^2/\text{с}^2$ ВПЖ-2 0,56. Ввиду широкого разброса вязкости образцов для мГК с СЗ выше 45% использовали вискозиметр ВПЖ-2 0,34, а для СЗ ниже 45% и немодифицированной ГК использовали ВПЖ-2 0,56.

Для измерения динамической вязкости композиций для изготовления скаффолдов, содержащих высокую концентрацию мГК (20 масс. %), использовали вискозиметр Brookfield DV2T (Ametek Brookfield, США), снабженный малообъемной измерительной системой CP-51 типа “конус-пластина”. Перед измерением образцы (0,5-0,7 мл) термостатировали в измерительной камере вискозиметра 15 минут при температуре $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ при помощи термостата Thermo Scientific Accel 500LC. Измерения делали при 0,1 об/мин. Измерение вязкости проводили с использованием программы Reocalc T. Для достижения постоянного сдвигового напряжения вращение продолжалось 300 секунд, пока соотношение скорости сдвига к напряжению сдвига не достигало равновесия.

2.2.3.9. Оценка степени ферментативной деградации реакцией Моргана-Эльсона

Оценка степени ферментативной деградации растворов мГК и гидрогелей на её основе проводили спектрофотометрически посредством реакции Моргана-Эльсона. Образцы (4 масс. % мГК или размолотые гидрогели массой ~26 мг) инкубировали в водном растворе тестикулярной гиалуронидазы (64 у.е.) объёмом 0,5 мл при 37°C 3 часа. Реакцию останавливали погружением пробирок с образцами в кипяток на 2 минуты. После охлаждения к образцам добавляли 0,4 мл 0.08 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ для достижения pH 9, после чего образцы немедленно инкубировали при 80°C 3 минуты. После охлаждения в течение 1 минуты при 20°C к образцам добавляли 0,5 мл 5% ДМАБ в уксусно-солянокислом растворе (для этого 1 г ДМАБ растворяли в 17,5 мл ледяной уксусной кислоты и 2,5 мл 10N соляной кислоты) и инкубировали в течение 20 минут при 37°C . После инкубации образцы центрифугировали и немедленно снимали спектры в диапазоне длин волн 490-700 нм. Пики при 545 нм и 585 нм соответствуют окрашенному продукту, при этом величина пика увеличивалась с повышением степени деградации. Степень деградации определяли следующим образом:

$$\text{СД} = \frac{C_{\text{м}}(\text{НАГ})}{C_{\text{м}}(\text{диссах})} \times 100 (\%), \quad (5),$$

где $C_m(\text{НАГ})$ - молярная концентрация N-ацетилглюкозамина, полученная при реакции Моргана-Эльсона, $C_m(\text{дисах})$ - молярная концентрация дисахаридных звеньев тестируемого образца. Для построения калибровочной кривой использовали растворы N-ацетилглюкозамина различной концентрации с инактивированной в кипятке тестикулярной гиалуронидазой.

2.2.3.10. Оценка наработки радикалов в ходе облучения

Эффективность наработки радикалов ФМН и ТЭОА была оценена с помощью стабильных радикалов ДФПГ. Раствор ДФПГ в этаноле (0,3 мг/мл) был смешан с водными растворами фотоинициаторов (ФМН/ТЭОА в молярных соотношениях от 1/1000 до 1/127) в равных объёмах и помещён в 2мм кварцевую кювету. Затем смесь облучали светом лазера на длине волны 450 нм (450 мВт/см^2), тщательно перемешивали и анализировали в UV/Vis спектрофотометре Cary 50 (США) в диапазоне 200-700 нм. Реакция между стабильными радикалами ДФПГ и радикалами фотоинициаторов приводила к падению пика поглощения ДФПГ при 520 нм, что приводило к изменению цвета от тёмно-фиолетового до бледно-жёлтого. Время, необходимое для расходования всех радикалов ДФПГ (фотообесцвечивание), определяло эффективность формирования свободных радикалов системы фотоинициатора ФМН/ТЭОА.

Оценку наработки радикалов в присутствии водорастворимого пиридин-замещённого фталоцианина проводили аналогичным образом. Для этого раствор ДФПГ в этаноле (0,3 мг/мл) был смешан с водным раствором пиридин-замещённого фталоцианина (0,1 мг/мл) и помещён в 2мм кварцевую кювету. Смесь облучали светом лазера на длине волны 670 нм (450 мВт/см^2), тщательно перемешивали и анализировали в UV/Vis спектрофотометре Cary 50 (США) в диапазоне 200-800 нм

2.2.3.11. Статистический анализ

Эксперименты проводились в трёх повторах, если не сказано иное, данные выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Непараметрический критерий U Манна-Уитни был использован для сравнения данных поведения мышей из разных групп, значение $p < 0,05$ было принято как статистически значимое.

2.2.4. Биологические испытания гидрогелей и скаффолдов на их основе.

2.2.4.1. МТТ-тест.

Оценку цитотоксичности методом экстрактов и количественную оценку роста клеток на поверхности гидрогелевых скаффолдов проводили с помощью МТТ-теста.

Экстракты получали инкубацией гидрогелей в DMEM, содержащем 10% фетальной бычьей сыворотки, в течение 24 часов, затем супернатант отбирали и добавляли к клеткам в различном соотношении. Клетки, инкубированные в среде без экстракта, использовали как контроль.

Для проведения МТТ-теста в лунки планшета, содержащие клетки с экстрактами скаффолдов или скаффолды с прикрепленными к ним клетками, добавляли краситель МТТ до финальной концентрации 0.5 мг/мл и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 3 ч. Затем скаффолды с окрашенными клетками переносили в чистые лунки, промывали в фосфатно-солевом буфере для удаления не прикрепившихся клеток и элюировали образовавшийся формазан с использованием диметилсульфоксида (150 мкл на лунку, 20 мин при комнатной температуре). Концентрацию формазана определяли спектрофотометрически с использованием фотомера Multiskan FC (Flow Laboratories США) при длине волны 570 нм. Скаффолды, не заселенные клетками, использовали в качестве контроля. Относительная жизнеспособность клеток была рассчитана с использованием следующего уравнения:

$$\% \text{ Жизнеспособность клеток} = (\text{OD}_{\text{тест}} - \text{OD}_{\text{фон}}) / (\text{OD}_{\text{контроль}} - \text{OD}_{\text{фон}}) \times 100\%, \quad (6)$$

где OD_{тест}, OD_{фон} и OD_{контроль} это оптические плотности образца, фона и контроля соответственно.

2.2.4.2. Исследования *in vitro* ХТ ГНК

Оценку цитотоксичности канальных гелей проводили *in vitro* с использованием клеточной линии глиомы С6. Для этого проводили пастеризацию образцов канальных гелей цилиндрической формы (h = 6 мм, d = 12 мм) 3 раза в течение 15 минут. Стерильные образцы выдерживали в среде DMEM 12 часов, затем размещали в 24-луночных планшетах. На верхнюю часть образцов наносили 100 мкл суспензии клеток глиомы С6 с концентрацией 1,0 x 10⁶ кл/мл, затем инкубировали 1 час 37 °С в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂. Затем в лунки вносили DMEM, содержащий 10% фетальной бычьей сыворотки и 1% антибиотиков, с таким расчётом, чтобы полностью покрыть образцы. Планшеты инкубировали при 37 °С в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂ в течение 1 недели. Смену среды проводили через каждые 3 суток. Характер роста иммобилизованных клеток оценивали методом оптической микроскопии на 3-ий, 5-ый и 7-ой дни с использованием реактива МТТ для визуализации клеток. Для этого в исследуемую лунку вносили 100 мкл раствора МТТ (5 мг/мл), планшеты инкубировали в течение 1,5 часа при 37°C. Затем получали тонкие продольные срезы, которые анализировали методом оптической микроскопии.

2.2.4.3. *In vitro* исследования ХТ НФГ

Цитотоксичность НФГ исследовали на клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 на гидрогелевых образцах ХТ-2/EtOH-47,5, аналогично ГНК. Кроме того, жизнеспособность клеток была также оценена визуально с помощью окраски кальцеином АМ. Образцы помещали в 24-луночную планшете и добавляли к ним клетки HepG2 (порядка $2,0 \times 10^5$ клеток на каждый образец), затем инкубировали при 37 °С в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂ в течение 1 недели. Затем образцы с клетками инкубировали с кальцеином АМ (50 мкМ в фосфатно-солевом буфере) 30 минут в CO₂-инкубаторе и отмывали чистым фосфатно-солевым буфером (рН 7,4), измеряли сигнал красителя с использованием конфокальной системы Leica TCS SPE (Leica, Германия).

2.2.4.4. *In vitro* испытания мГК скаффолдов

Решётчатые скаффолды мГК помещали на неадгезивную (агарозную) поверхность 24-луночного планшета и вносили в каждую лунку по 10^5 клеток иммортализованных фибробластов человека Vj-5ta (клетки были получены из Банка опухолевых штаммов ФГБУ “НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина” Минздрава России) в 1 мл среды DMEM, дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой. Клетки инкубировали при 37°С и 5% CO₂ в течение 14 сут, каждые третьи сутки проводили полную замену среды. Прикрепление и рост клеток контролировали с использованием инвертированного микроскопа Olympus SKX53 (Olympus, Япония).

2.2.4.5. Исследование жизнеспособности клеток при биопечати

Трубчатые скаффолды с инкорпорированными клетками инкубировали в среде DMEM, дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой, 2 мкМ L-глутамином, 100 мкг/мл стрептомицином и 100 ед/мл пенициллином (Gibco, США) при 37 °С в 5 % CO₂ увлажнённой атмосфере. По окончании инкубации (на 1 или 6 сутки) загруженные клетками трубчатые скаффолды окрашивали флуоресцентными красителями кальцеин АМ и Hoechst 33342, по 50 мкМ каждого красителя в фосфатно-солевом буфере, в течение 30 минут. После этого образцы трижды промывали в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4), и снимали флуоресцентный сигнал с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Motic AE31E (Китай), а также с помощью флуоресцентного лазер-сканирующего конфокального микроскопа Zeiss LSM 880 (Jena, Германия).

2.2.4.6. *In vivo* исследования скаффолдов на основе НФГ и мГК

Эксперименты для исследования реакции организма на имплантацию НФГ или гидрогелей мГК проводили на самках мышей BDF1 (C57Bl/6×DBA/2, 5-недельные, средний вес = 15-20 г). Все эксперименты проводили в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (Россия, 2010). Каждому животному проводили анестезию интраперитонеально с использованием 150 мкл смеси Золетила 100 (2,5 мг/кг тилетамин гидрохлорида и 2,5 мг/кг золазепам гидрохлорида) и Рометара (0,2 мг/кг ксилазин гидрохлорида). Анестезия длилась до 30 минут. Шерсть на спине мыши сбрасывали, и эту зону обрабатывали 70 об.% EtOH. Образцы гидрогелей (ХТ-2/EtOH-47,5, ~50 мг каждый) имплантировали подкожно на дорсальной части тела с правой стороны.

2.2.4.7. *In situ* фотоиндуцируемая сшивка ФОК

Эксперименты по *in situ* фотосшивке композиций на основе мГК проводили на самках мышей BDF1 (C57Bl/6×DBA/2) (5-недельные, средний вес = 15-20 г). Все эксперименты проводили в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (Россия, 2010), анестезия проводилась аналогично пункту 2.2.4.6. Дорсальная часть была предварительно побрита и обработана 70 об.% этанола. Для улучшения пропускания света на 670 нм и уменьшения рассеяния света кожу мышей покрывали глицерином. 150 мкл ФОК с водорастворимым пиридин-замещённым фталоцианином вводили подкожно шприцом через фильеру с внутренним диаметром 2400 мкм, после чего проводили экспонирование светом (670 нм) с 900 мВт/см² в течение 40 минут.

2.2.4.8. *In vivo* исследования скаффолдов на основе мГК на модели ЧМТ мышей

Для стерилизации гидрогелевые скаффолды на основе мГК, полученные 3D-печатью, погружали в водный раствор EtOH (74,1 об.%) и изопропанола (10 об.%) на 15 минут. После этого образцы облучали УФ светом (365 нм, 160 мВт/см²) 30 минут и затем высушивали в стерильных условиях. Перед имплантацией в мозг мышей скаффолды погружали в воду на 15 минут для гидратации, при этом некоторые образцы загружали нейротрофическими факторами. Для этого нейротрофические факторы BDNF (rhBDNF, 248-BDB, R&D Systems, США) и GDNF (rhGDNF, 212-GD, R&D Systems, США) растворяли в воде в концентрации 30 нг/мкл в течение часа. Затем скаффолды погружали в растворы нейротрофических факторов на 15 минут. Излишки жидкости аккуратно удаляли. С учётом набухания гидрогелей (SWR = 336%) конечная концентрация нейротрофических факторов составляла примерно 100 нг/мкл.

Эксперименты проводили на взрослых самцах C57BL/6 мышей (6-8 недельные, 25-28 г). Все эксперименты проводили в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (Россия, 2010). Перед хирургическими процедурами каждое животное анестезировали интраперитонеальной инъекцией Золетила 100 (70 мг/кг, Virbac Sante Animale, Франция) и Ксиланита (0,02 мг/кг, Нита-Фарм, Россия). В отсутствии проприоцептивных рефлексов шерсть на своде черепа животного удаляли и разрезали мягкую ткань. Краниотомию (2x2 мм в величину, 1-2 мм в толщину) проводили в правом полушарии рядом с центральным швом справа от пересечения лямбда и брегмы с помощью тонкого сверла, не трогая твёрдую мозговую оболочку. Механическую травму наносили методом падения груза весом 4 г по пластиковой трубке с высоты 0,8 м. Чтобы избежать повреждения челюсти, голову животного фиксировали на мягкой обкладке. После нанесения черепно-мозговой травмы (ЧМТ) кожу зашивали и обрабатывали антисептическим раствором. После процедуры животным давали восстановиться после анестезии перед возвращением в клетки с надлежащим послеоперационным уходом и неограниченным запасом еды и воды. На 7-ой день после ЧМТ экспериментальных мышей снова анестезировали и фиксировали, удаляли швы. Скаффолд располагали прямо в месте повреждения. Размер трансплантата был максимально близким к объёму повреждения. Разрез снова зашивали. Животных разделяли на следующие группы: 1) интактные животные, не проходившие операций; 2) животные с ЧМТ; 3) животные с ЧМТ и трансплантированными скаффолдами, пустыми или с нейротрофическими факторами.

Функциональное состояние ЦНС экспериментальных мышей в посттравматический период проводили с использованием шкалы для оценки тяжести неврологического дефицита, модифицированного для мышей [129] и теста Морриса (водный лабиринт) [130]. Морфологические исследования проводили на 7-ой, 14-ый, 21-ый дни и спустя 6 месяцев после трансплантации скаффолдов.

2.2.4.9. Гистологическое исследование

Для оценки реакции тканей организма на имплантированные ХТ или мГК образцы скаффолды были удалены вместе с окружающими их тканями. Образцы выдерживали в 10% формалине в нейтральном фосфатном солевом буфере (pH 7.4), обезвоживали этанолом и фиксировали в парафине. Гистологические срезы получали на микротоме HM 325 (Thermo Fisher Scientific, USA) и окрашивали гематоксилином и эозином для исследования клеток на универсальном микроскопе LEICA DM4000 B LE, оснащённый камерой LEICA DFC7000 T, с использованием программного обеспечения LAS V4.8 (Leica Microsystems, Швейцария).

Для оценки реакции мозговых тканей организма на имплантированные мГК скаффолды мозга экспериментальных животных хирургически удаляли и фиксировали в 10% растворе формалина при комнатной температуре 2 дня. После инкубационного периода мозговые ткани помещали в 15% (1-2 суток), а затем в 30% (следующие 1-2 суток) раствор сахарозы при комнатной температуре. Затем образцы помещали на платформу криостата Leica CM1520 (Leica, Германия) и постепенно заполняли криогелем. Для каждого образца делали срезы толщиной 15 мкм. Каждый пятый срез помещали в слайд и сушили на воздухе сутки. Полученные срезы окрашивали стандартным гематоксилин-эозиновым методом. Затем, срезы обезвоживали в спирте в градиенте концентрацией, очищали в ксилоле и помещали в среду для заливки гистологических образцов. Образцы изучали, используя микроскоп Zeiss Primo Star light (Zeiss, Германия) со встроенной камерой Axio CamMRc (Zeiss, Германия).

Глава 3. Результаты и их обсуждение

В настоящее время активно развивающимся направлением медицины является тканевая инженерия, направленная на восстановление и регенерацию повреждённых органов и тканей с помощью структурно-организованных скаффолдов. Одними из самых перспективных материалов для этой дисциплины за счёт высокой биосовместимости являются полисахариды природного происхождения, такие как, хитозан (ХТ) и гиалуроновая кислота (ГК). Несмотря на то, что эти полисахариды известны и активно изучаются, создание новых скаффолдов на их основе всё ещё остаётся актуальной задачей, поскольку уникальные свойства этих полисахаридов, которые могут привести к значительному прогрессу в области тканевой инженерии, не реализованы в полной мере

Так, существует много подходов к созданию гидрогелей на основе ХТ, однако получение скаффолдов с различной внутренней архитектурой и требуемой морфологией поверхности по-прежнему является важной задачей. В то же время получение стабильных нековалентно сшитых гидрогелей из ГК, способных сохранять заданную форму и жесткость в водной среде, крайне сложно реализовать, что связано с высокой степенью гидратированности молекул ГК. Перспективным является развитие методов модификации ГК для последующей реакции радикальной сшивки полимера, в частности, в процессе фотоиндуцируемых реакций при использовании лазерных технологий.

Настоящая работа посвящена разработке новых методов получения гидрогелей на основе природных полисахаридов ХТ и ГК для получения скаффолдов с программируемыми свойствами при использовании как репликативных (молдинг), так и аддитивных (3D-печать) технологий. Первая часть работы посвящена разработке новых методов формирования гидрогелей на основе нековалентных взаимодействий из ХТ с различной внутренней структурой: нанопибриллярной и ориентированной канальной. Вторая часть работы связана с модификацией ГК для получения производных, способных к реакции фотоиндуцированной сшивки, формированию различными методами скаффолдов на основе композиций из модифицированной ГК (мГК) с фотоиницирующей системой на основе эндогенного флавиномононуклеотида (ФМН) или водорастворимого производного фталоцианина, их характеристика и *in vitro* и *in vivo* тесты.

3.1. Нанопибриллярные гели (НФГ) на основе ХТ

Несмотря на широкий диапазон методов получения нековалентно сшитых ХТ гелей, большинство из них непрозрачны и механически непрочны [131]. Это связано с макропористой структурой и неравномерным распределением полимера в объёме геля. Эти недостатки могут быть преодолены получением гелей с нанопористой структурой,

состоящей из сетки нанофибрил. В литературе существует ограниченное количество методов получения таких гидрогелей. Эти методы чаще всего представляют собой либо желирование водных растворов ХТ фазовым разделением, индуцированным нерастворителем (nonsolvent induced phase separation, NIPS), с использованием водно-спиртовых растворов щёлочи в качестве нерастворителя [132], либо желирование водно-спиртовых или щелочных растворов ХТ фазовым разделением, индуцированным температурой (thermally induced phase separation, TIPS) [133,134]. Однако, даже гидрогели, полученные этими методами, также представляют собой непрозрачные гели.

В литературе известен метод формирования гелей ХТ посредством низкотемпературного термически индуцированного разделения фаз (low temperature thermally induced phase separation, LT-TIPS) [134]. Этот метод основан на криожелировании водно-спиртовых растворов ХТ (содержание этанола (ϕ_{EtOH}) = 30 об.%), растворённого уксусной кислотой. В ходе этого процесса происходит разделение фаз на границе жидкость-твёрдое тело и формирование ХТ алкогеля (гель, в котором вода частично или полностью заменена спиртом) с высоким содержанием нанофибрилл. Однако вследствие криожелирования (охлаждения ниже температуры замерзания раствора) структура геля остаётся высоко гетерогенной, а сам гель при этом непрозрачным с низкой механической прочностью.

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 разделение фаз на границе жидкость-жидкость при температуре выше точки замерзания (T_{f}) смеси соразтворителей (вода-этанол). Такая система позволит получить алкогели с более гомогенной структурой, высоким содержанием нанофибрилл и улучшенными механическими характеристиками.

3.1.1. Особенности формирования алкогелей ХТ

Алкогели были получены желированием водно-спиртовых растворов ХТ при понижении температуры (температура охлаждения, T_{q}) в специальных формах (молды). Образцы растворов и соответствующих им гелей обозначали как ХТ- n / EtOH- m , где n и m это $S_{\text{ХТ}}$ и ϕ_{EtOH} в процентах соответственно (Таблица 2.1.).

Установлено, что при инкубировании раствора ХТ-2/EtOH-47,5 при -18°C в течение ~ 20 мин формируется устойчивый (удерживающий форму) алкогель. Полученный алкогель (далее нестабилизированный алкогель, НСт-алкогель, Рис. 3.1.а) стабилен в замкнутой системе при отрицательных температурах, размягчается при нагревании и плавится при T

> 49°C. На воздухе (открытая система) процесс размягчения ускоряется, очевидно вследствие улучшения качества растворителя, связанного с испарением этанола. При обработке НСт-алкогеля водно-спиртовым раствором NaOH (осадитель) формируется опалесцирующий прозрачный алкогель (далее стабилизированный алкогель, Ст-алкогель, Рис. 3.1.а). Следует отметить, что в ходе данной операции объем гелевой фазы не изменяется, а гель сохраняет свою форму и упругие свойства по меньшей мере до температуры кипения растворителя. При этом в отличие от непрозрачных макропористых гидрогелей, полученных методами NIPS, например, гидрогеля ХТ-2/ЕtОН-87,0 (Рис. 3.1.в), исследуемый гидрогель, полученный гидратацией Ст-алкогеля, является опалесцирующим и прозрачным, и характеризуется однородной структурой с системой взаимосвязанных наноразмерных пор (Рис. 3.1.а,б). Полученный гидрогель является безусадочным и не набухает по меньшей мере в диапазоне рН от 5.5 до 8.0.

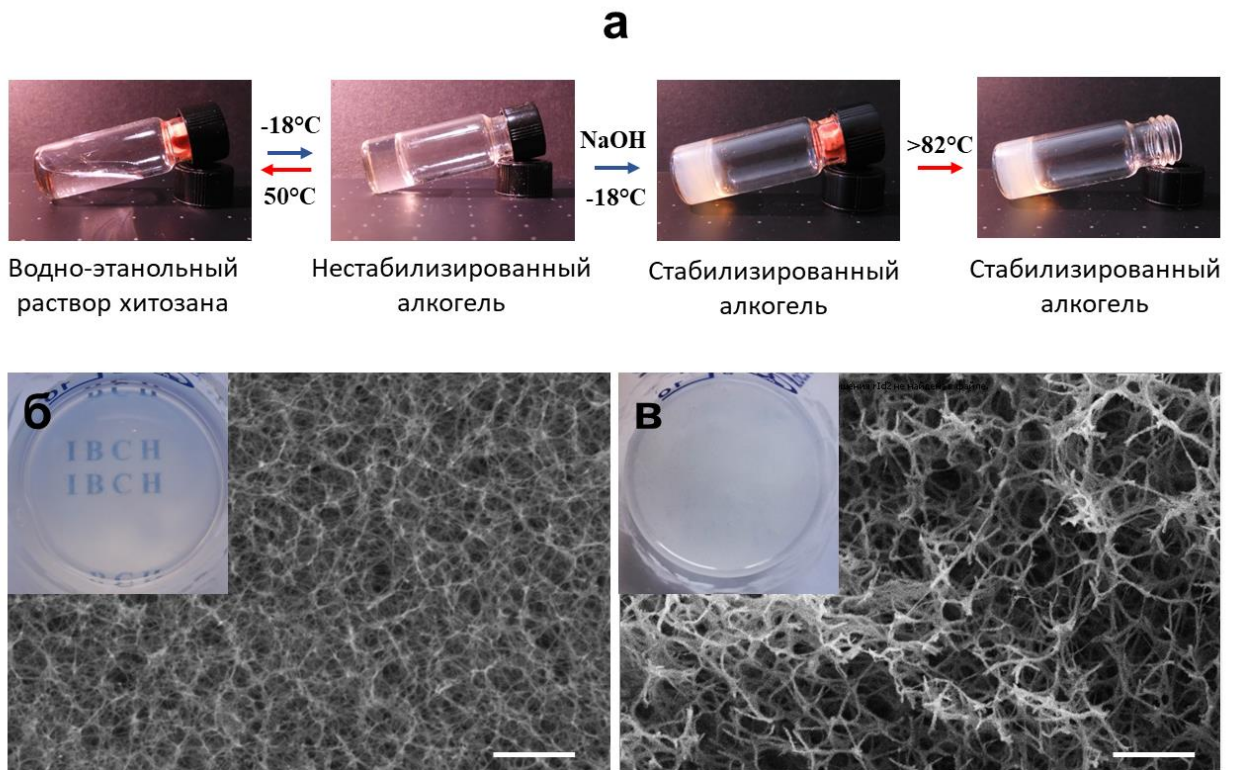


Рис. 3.1. а) Схема получения алкогелей и изображения, полученные сканирующей электронной микроскопией (СЭМ), лиофильно высушенных НФГ со вставками оптических изображений соответствующих гидрогелей: б) ХТ-2/ЕtОН-47,5; в) ХТ-2/ЕtОН-87,0. Масштабная линейка для СЭМ изображений 1 мкм. Гидрогели 10 мм в высоту и 37 мм в диаметре.

В ходе экспериментов выяснилось, что ключевым компонентом, влияющим на формирование нановолокнистого геля (НФГ), помимо спирта, является наличие

определённой кислоты в системе. Показано, что в отличие от растворов ХТ-2/ЕтОН-47,5 с НСl, такие же растворы с уксусной кислотой не способны формировать алкогели при температурах охлаждения (T_q) выше T_{fr} . Этот эффект может быть связан с различием в лиотропных свойствах ацетатных и хлоридных анионов [135], степенью диссоциации уксусной и соляной кислот или растворимостью соответствующих ХТ солей. В пользу последнего предположения свидетельствует тот факт, что ХТ растворим при концентрациях уксусной кислоты $< 16.5M$, в то время как в случае НСl высаливающий эффект наблюдается при концентрациях кислоты $1M$ и выше [136]. Таким образом, в дальнейших экспериментах исследовались только растворы ХТ с НСl.

В отличие от криожелирования уксуснокислого раствора ХТ в 30 об.% ЕтОН при использовании метода LT-TIPS [134], предложенный нами метод обеспечивает формирование термообратимого алкогеля на основе гидрохлорида ХТ при температуре существенно выше температуры замерзания его растворов. Таким образом был разработан новый способ желирования растворов ХТ, названный LT-TIPS в незамерзающих условиях (LT-TIPS under non-freezing conditions, LT-TIPS-NF).

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

3.1.2. Влияние различных параметров на свойства НФГ

3.1.2.1. Влияние температуры

Процесс LT-TIPS-NF исследовали на примере раствора ХТ-2/ЕтОН-47,5 в интервале температур от 10 до $-25^{\circ}C$. Было установлено, что при температуре охлаждения $T_q > 5^{\circ}C$ формирование алкогелей ХТ-2/ЕтОН-47,5 не наблюдается. При $5^{\circ}C \leq T_q \leq -25^{\circ}C$ формируются прозрачные с разной степенью опалесценции (в зависимости от T_q , таблица 3.1.) НСт-алкогели. Эти гели характеризуются термообратимыми свойствами, т.е. при нагревании они переходят в жидкое состояние, охлаждение из которого может снова приводить к образованию геля. Эти циклы нагрева-охлаждения могут быть проведены многократно в случае, если алкогель находится в герметичных условиях.

Было установлено, что понижение T_q сокращает время, необходимое для формирования алкогеля (Таблица 3.1.). Например, при понижении T_q с 5 до $-25^{\circ}C$ время желирования сокращается в ~ 29 раз. Понижение T_q приводит к повышению твердости и точки размягчения (T_{sp}) НСт-алкогеля СН-2/ЕтОН-47,5 (Таблица 3.1.). Очевидно, это

связано с повышением количества сайтов связывания между цепями полисахарида в результате снижения растворимости гидрохлорида ХТ при понижении T_q .

Таблица 3.1. Зависимость времени желирования (τ) и T_{sp} . НСт-алкогелей СН-2/ЕtОН-47,5 в зависимости от T_q .

T_q , °С	τ , min	T_{sp} , °С	Характеристики гелей
5	315 ± 15	$43,7 \pm 0,3$	слабо опалесцирующий, прозрачный, мягкий
-2	150 ± 10	$45,5 \pm 0,3$	слабо опалесцирующий, прозрачный, полутвердый
-10	24 ± 2	$47,8 \pm 0,4$	опалесцирующий, прозрачный, твердый
-18	19 ± 2	$49,4 \pm 0,4$	опалесцирующий, прозрачный, твердый
-25	11 ± 1	$51,6 \pm 0,5$	опалесцирующий, прозрачный, твердый

Кроме того, найдено, что для всех НСт-алкогелей $T_q < T_{sp}$, что указывает на изменение свойств при переходах из раствора в гель и обратно, т.е. реализуются различные процессы при желировании и размягчении [133]. T_{sp} увеличивается с увеличением ϕ_{EtOH} (Таблица 3.2.), что может быть обусловлено связыванием этанола с полисахаридной сеткой алкогеля, приводящей к стабилизации геля и повышению T_{sp} алкогеля. Схожее поведение было отмечено в статье Zhi Yang et al. для термообратимых гелей к-каррагинана, полученного из его водно-спиртовых растворов [137].

3.1.2.2. Влияние концентрации ХТ

Исследовали растворы с $C_{ХТ}$ в диапазоне от 0,1 до 2 масс. % и ϕ_{EtOH} 47,5 об. % при T_q равной +5, -18 и -36°С. Установлено, что растворы с $C_{ХТ} < 2$ масс. % не желируются при $T_q = +5$ в течение по меньшей мере 3 недель. Растворы с $C_{ХТ} \leq 0,5$ масс. % не желируются при $T_q > T_{fr}$. Очевидно, при данных $C_{ХТ}$ отсутствует необходимый уровень межмолекулярных взаимодействий, обеспечивающий образование устойчивых узлов сетки полисахарида. Однако растворы с $0,25 \leq C_{ХТ} \leq 0,5$ масс. % формируют НСт-алкогели при фазовом распаде на границе жидкость-твёрдое тело в ходе криожелирования ($T_q < T_{fr}$). Растворы с $0,75 \leq C_{ХТ} \leq 2$ масс. % эффективно желируются при отрицательных $T_q > T_{fr}$, при этом повышение $C_{ХТ}$ приводит к уменьшению времени желирования, повышению теплостойкости (T_{sp}) НСт-алкогелей и повышению T_q , обеспечивающей их формирование (Таблица. 3.2.). Так, T_{sp} для

алкогеля ХТ-1/ЕtОН-47,5 составляет $\sim 40^\circ\text{C}$ против $\sim 49^\circ\text{C}$ для алкогеля ХТ-2/ЕtОН-47,5, а время желирования составляет ~ 55 и ~ 20 мин ($T_q, -18^\circ\text{C}$), соответственно.

Таким образом, оптимальным диапазоном концентраций ХТ для протекания процесса желирования в незамерзающих условиях является $0,5 \text{ масс. \%} < C_{\text{ХТ}} \leq 2 \text{ масс. \%}$.

3.1.2.3. Влияние концентрации спирта

Процесс LT-TIPS-NF исследовали для 1 и 2 масс. % растворов ХТ при $20 \leq \phi_{\text{EtOH}} \leq 47,5$ об. % и $5 \leq T_q \leq -25^\circ\text{C}$. Установлено, что понижение ϕ_{EtOH} приводит к повышению времени желирования растворов ХТ и снижению теплостойкости НСт-алкогелей (Таблица 3.2.). Например, при $T_q = -10^\circ\text{C}$ формирование алкогеля ХТ-2/ЕtОН-47,5 наблюдается через ~ 24 мин, а алкогеля ХТ-2/ЕtОН-28,5 через ~ 55 мин, при этом T_{sp} снижается на $\sim 21^\circ\text{C}$.

Описанный эффект влияния этанола на желирование ХТ растворов хорошо согласуется с литературными данными о приготовлении термообратимых гелей из агарозы, к-каррагинана и желатина. Эти данные также демонстрируют повышение температуры желирования, температуры плавления и механической прочности гелей в результате увеличения концентрации различных соразтворителей (включая этанол) [137–140]. Согласно этим работам, соразтворитель исключается из окружения молекул биополимеров на стадии раствора. При этом количество молекул воды вокруг цепей полимеров уменьшается вследствие гидратации этанола, что приводит к ослаблению взаимодействий полимер-растворитель и усилению взаимодействий полимер-полимер, что, в свою очередь, приводит к агрегации молекул биополимеров. Очевидно, данный механизм реализуется и в случае ХТ (Таблица 3.2. и 3.3.). Исключение этанола из окружения ХТ молекул также было косвенно подтверждено подавлением процесса LT-TIPS-NF в системе ХТ/вода/этанол/глицерин ($\phi_{\text{глицерин}} \geq 5$ об.%). Глицерин способен связываться с ХТ [141], что предположительно приводит к разрыву прямых контактов между молекулами ХТ, препятствуя желированию.

Таблица 3.2. Зависимость времени формирования НСт-алкогелей (τ) и их теплостойкости (T_{sp}) от состава гелеобразующего раствора и T_q .

Образец геля	$T_q, ^\circ\text{C}$	τ , мин	$T_{\text{sp}}, ^\circ\text{C}$
ХТ-2/ЕtОН-47,5	-18	19 ± 2	$49,4 \pm 0,5$
ХТ-2/ЕtОН-47,5	-10	24 ± 2	$47,8 \pm 0,4$
ХТ-2/ЕtОН-47,5	+5	315 ± 15	$43,7 \pm 0,3$
ХТ-1/ЕtОН-47,5	-18	55 ± 3	$40,1 \pm 0,3$

ХТ-1/EtOH-47,5	+5	н/ж.	-
ХТ-0,75/EtOH-47,5	-25	180 ± 15	28,5 ± 0,3
ХТ-0,75/EtOH-47,5	-18	н/ж.	-
ХТ-0,5/EtOH-47,5	-36	сутки	24,5 ± 0,4
ХТ-0,25/EtOH-47,5	-36	сутки	17,2 ± 0,3
ХТ-2/EtOH-38,0	-18	23 ± 2	38,2 ± 0,5
ХТ-2/EtOH-38,0	-10	29 ± 2	36,1 ± 0,5
ХТ-2/EtOH-38,0	+5	н/ж	-
ХТ-1/EtOH-38,0	-20	2040 ± 30	20,9 ± 0,3
ХТ-1/EtOH-38,0	-18	н/ж	-
ХТ-2/EtOH-28,5	-10	55 ± 5	26,5 ± 0,3
ХТ-2/EtOH-28,5	+5	н/ж	-
ХТ-1/EtOH-28,5	-10	н/ж	-
ХТ-3/EtOH-38,0	+5	32 ± 5	42,5 ± 0,2
ХТ-4/EtOH-28,5	+5	40 ± 5	н/о

н/ж – нет желирования, н/о – не определяли

При $\phi_{EtOH} < 28,5$ об. % все исследованные растворы не желируются при $T_q > T_{fr}$. Очевидно, это связано с высоким уровнем сольватации и хорошей растворимостью гидрохлорида ХТ в условиях, описанных выше.

Результат от снижения ϕ_{EtOH} можно компенсировать повышением $C_{ХТ}$. Так растворы ХТ-2/EtOH-38 и ХТ-2/EtOH-28,5 не желируются при T_q 5°C, однако повышение $C_{ХТ}$ до 3 и 4 масс. %, соответственно, обеспечивает формирование алкогелей при данной T_q (табл. 3.2.). Повышение $C_{ХТ}$ приводит к снижению объемной доли воды, что на молекулярном уровне, вероятно, сопряжено со снижением среднего количества молекул воды в окружении молекул хитозана. Это приводит к повышению прямых контактов между молекулами хитозана, тем самым обеспечивая возможность формирования алкогеля при меньшем содержании этанола. Использование растворов с $C_{ХИТ} > 2$ масс.%, однако, является нежелательным, поскольку такие композиции обладают высокой вязкостью, что затрудняет работу с ними.

Таким образом, чем выше концентрация спирта, тем быстрее формируются алкогели, при этом их теплостойкость и механическая прочность повышается.

3.1.3 Механизм формирования термообратимых алкогелей

Схематическое изображение процесса формирования алкогелей представлено на схеме 3.1. Молекулы ХТ, как и других полукристаллических жесткоцепных полимеров, проявляют склонность к самопроизвольной агрегации в растворе (Схема 3.1. а) [142]. Введение в раствор этанола способствует этому процессу (Схема 3.1. б) за счет снижения термодинамического качества растворителя, диэлектрической проницаемости среды и плотности зарядов [143]. Выше критической концентрации этанола ХТ выделяется в отдельную фазу с формированием осадка или алкогеля (типичный пример NIPS). При концентрациях этанола ниже критической агрегаты и свободные молекулы ХТ длительное время находятся в растворе в равновесии (Схема 3.1. б). Снижение растворимости ХТ вероятно сопряжено с дальнейшим ухудшением термодинамического качества растворителя и усилением высаливающего эффекта HCl при низких температурах. В результате многочисленные прямые контакты между молекулами и агрегатами ХТ способствуют формированию полимерной сетки во всём объёме (Схема 3.1. в).

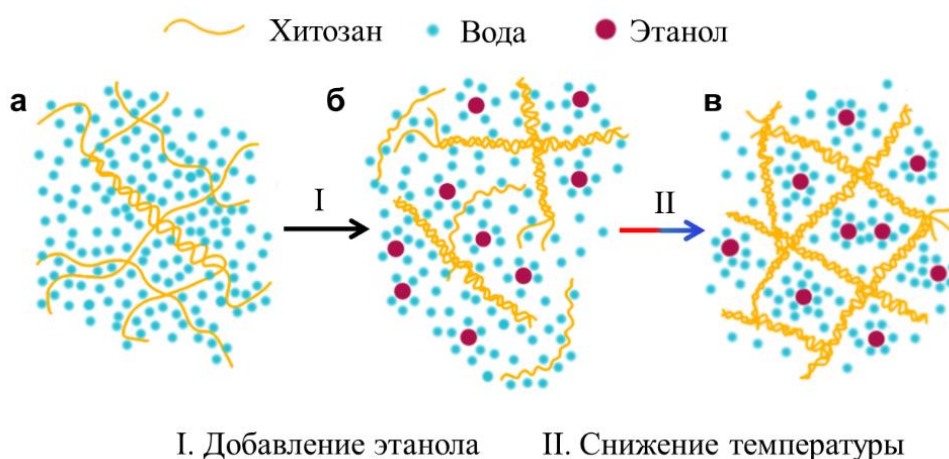


Схема 3.1. Схема формирования алкогеля ХТ. а) водный раствор ХТ; б) водно-этанольный раствор ХТ; в) алкогель ХТ.

Желирование водно-спиртовых растворов ХТ методом LT-TIPS-NF происходит при $T_q > T_{fr.}$, что исключает возможность протекания фазового распада на границе жидкость-твёрдое тело; при этом формируются термообратимые алкогели со взаимно-непрерывной сетчатой структурой, что характерно для материалов, получаемых при спинодальном распаде [144,145]. Фазовый распад на границе жидкость-жидкость препятствует формированию крупных структур, способных сильно рассеивать свет и значительно снижающих механическую прочность, что часто наблюдается при криожелировании и NIPS, и это является ключевым преимуществом разработанной методики.

3.1.4. Свойства и структура НФГ

3.1.4.1. Механические свойства гелей

Характеристики НСт-алкогелей и гидрогелей, полученных на их основе, представлены в таблицах 3.1. и 3.3. Повышение T_q (при постоянных ϕ_{EtOH} и $C_{хит}$) приводит к снижению твёрдости НСт-алкогелей (Таблица 3.1.). Вероятно, это связано с повышенной подвижностью и менее плотной упаковкой элементов гелевой структуры при более высокой T_q . Обработка алкогелей на стадии осаждения раствором NaOH ($T_{st} = T_q$) приводит к повышению модуля Юнга гелей. Данный эффект может быть вызван изменением структуры НСт-алкогелей при обработке щелочью за счет депротонирования аминогрупп хитозана, устранения электростатического отталкивания агрегатов хитозана, образования дополнительных внутри- и межмолекулярных водородных связей и усиления межмолекулярных гидрофобных взаимодействий [146].

Таблица 3.3. Зависимость механических свойств гидрогелей от состава гелеобразующего раствора.

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

* - Ст-алкоголь.

Примечательно, что образцы, полученные из растворов с постоянной концентрацией ХТ, но с разным содержанием спирта, после стабилизации осадителем (NaOH, при постоянной T_{st}) характеризуются сопоставимыми значениями компрессионного модуля Юнга (Таблица 3.3.). Понижение $C_{хит}$ (при постоянном ϕ_{EtOH}) ожидаемо приводит к снижению жесткости гелей, а при $C_{хит} < 1$ масс.% формирующиеся гели уже имеют значения модуля Юнга, сопоставимые со значениями для известных макропористых ХТ

гелей, полученных методами NIPS, которые приведены в таблице в качестве контрольных гелей (Таблица 3.3.). Следует также отметить, что замена этанола в составе Ст-алкогелей на воду приводит к снижению жесткости гелей, что, вероятно, связано с изменением упаковки элементов гелевой структуры за счет улучшения качества растворителя. Например, Ст-алкогель ХТ-2/EtOH-47,5 имеет значение модуля Юнга ~ 973 кПа, в то время как гидрогель ХТ-2/EtOH-47.5 ~ 539 кПа (Таблица 3.3.).

Таким образом, разработанная методика позволяет получать гели с настраиваемыми механическими свойствами, которые регулируются концентрацией ХТ и спирта в исходных растворах (Таблица 3.3.), а также температурой охлаждения (Таблица 3.1.).

3.1.4.2. Оптические свойства

Исследование оптических свойств показало, что все образцы алкогелей наиболее проницаемы для ближнего ИК излучения, при этом их проницаемость монотонно падает при сдвиге длины волны облучения в коротковолновую область спектра (Рис 3.2. е). Это, вероятно, определяется структурой гелей, и чем крупнее элементы структуры, тем большая длина волны излучения требуется для проникновения сквозь объём геля (Рис. 3.3.).

Установлено, что оптические свойства НФГ зависят не только от состава гелеобразующего раствора ($C_{\text{ХИТ}}$, ϕ_{EtOH}), но и от T_q (Таблица. 3.1.) и температуры на стадии стабилизации НСт-алкогеля раствором NaOH (T_{st}). Прозрачность Ст-алкогелей повышается при понижении $C_{\text{ХИТ}}$ и ϕ_{EtOH} (при постоянной T_q , рис. 3.2.). Стадия стабилизации также сопровождается снижением прозрачности, при этом повышение T_{st} , прежде всего до $T_{\text{st}} > 0^\circ\text{C}$, усиливает этот эффект (Рис. 3.2. д). Очевидно, это связано с повышенной подвижностью и менее плотной упаковкой элементов гелевой структуры при более высокой T_{st} , что позволяет им перестраиваться в более крупные элементы при контакте с осадителем. Таким образом, существует возможность управлять оптической прозрачностью получаемых гелей применительно к поставленным задачам. В частности, прозрачность гелей позволяет контролировать качество получаемых скаффолдов, а также упрощает наблюдение за колонизацией клеток на поверхности скаффолдов.

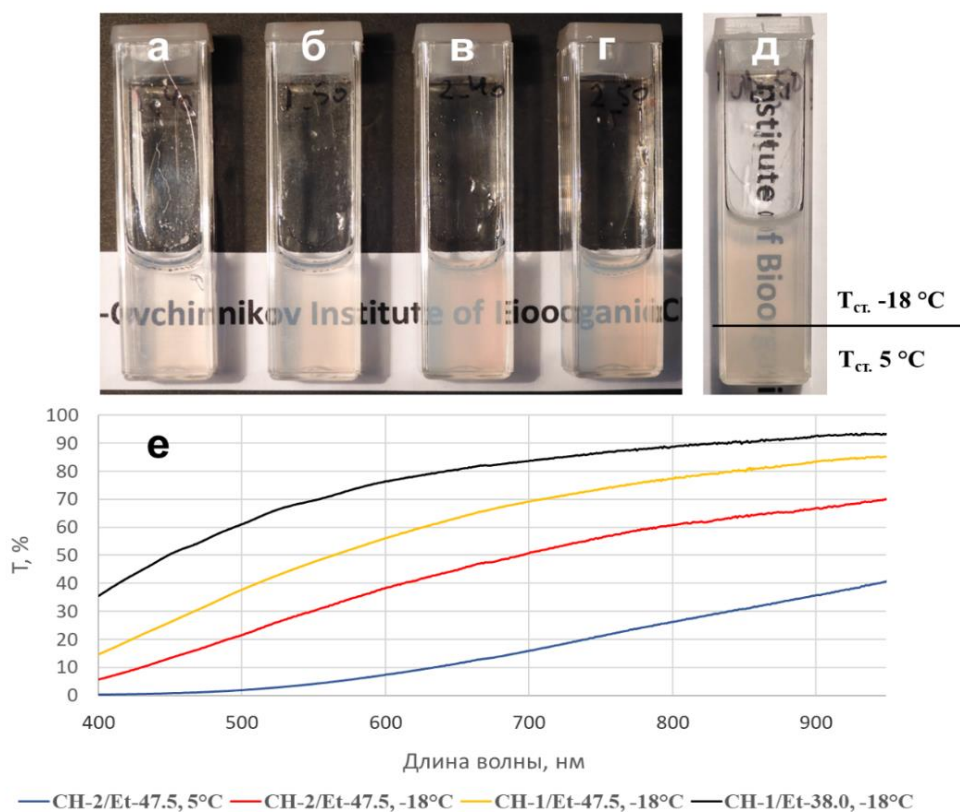


Рисунок 3.2. Фотографии Ст-алкогелей: а) ХТ-1/ЕtОН-38, б) ХТ-1/ЕtОН-47,5, в) ХТ-2/ЕtОН-38 и г) ХТ-2/ЕtОН-47,5 при $T_{st} = -18$, и д) Ст-алкогеля ХТ-1/ЕtОН-47,5 при $T_{st} = -18$ и 5°C ; е) спектры пропускания Ст-алкогелей в зависимости от температуры и состава.

Изменения механических и оптических свойств указывает на формирование гелей с различной внутренней структурой при изменении параметров процесса LT-TIPS-NF и состава гелеобразующего раствора.

3.1.4.3. Морфология гелей

Полученные образцы НФГ были лиофильно высушены и исследованы с помощью СЭМ. СЭМ изображения представлены на рис. 3.3 и показан пример оценки размера пор (Рис. 3.3 б), на основании которого были построены диаграммы на Рис. 3.4. Видно, что внутренняя структура высушенного образца ХТ-2/ЕtОН-47,5 ($T_q = -18^\circ\text{C}$), представляет собой систему взаимосвязанных равномерно распределенных по объему пор ($25 \leq d_{\text{пор}} \leq 400$ нм, рис. 3.4.), образованных нанопибриллами толщиной от 8 до 27 нм.

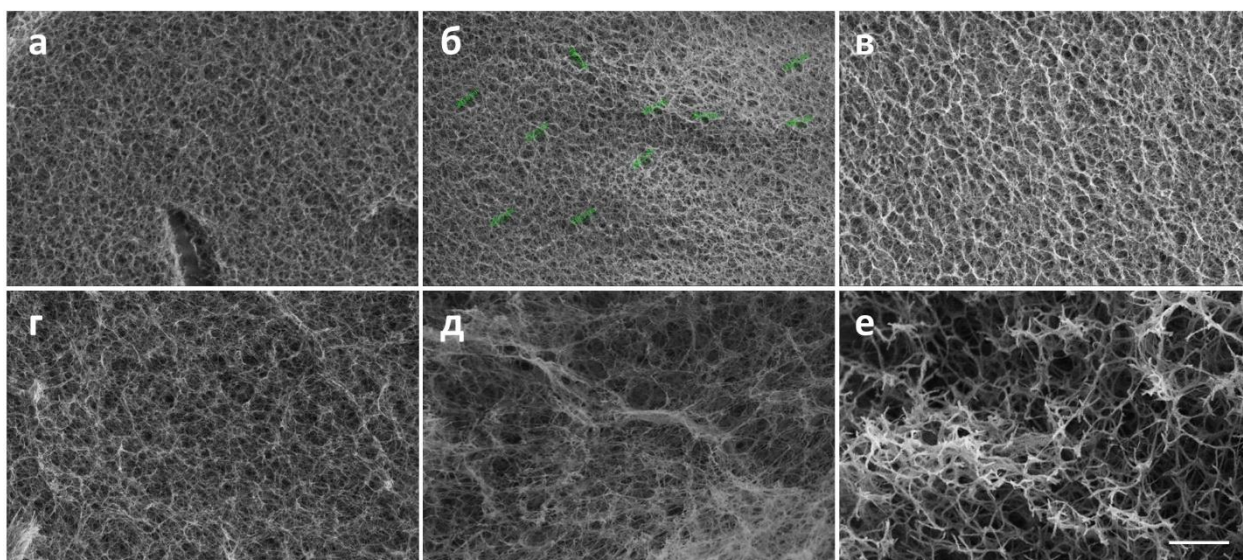


Рисунок 3.3. СЭМ изображения лиофильно высушенных образцов: а) ХТ-2/EtOH-47,5, б) ХТ-2/EtOH-38, в) ХТ-2/EtOH-28,5, г) ХТ-1/EtOH-47,5, д) ХТ-0.5/EtOH-47,5, и контроль е) ХТ-2/EtOH -87,0 (метод NIPS). Масштабная линейка 2 мкм.

Уменьшение содержания спирта ϕ_{EtOH} (при постоянной $S_{\text{хит}}$) приводит к незначительному увеличению как диаметра пор, так и средней толщины наночибрилл, образующих их (Рис. 3.3., рис. 3.4.). Близкие значения диаметров пор у этих гелей хорошо коррелируют с сопоставимыми значениями компрессионного модуля Юнга (Таблица 3.3.).

При уменьшении концентрации хитозана $S_{\text{хит}}$ (при постоянной ϕ_{EtOH}) наблюдается увеличение диаметра пор, более широкое их распределение по размерам и повышение неравномерности распределения полимерных наночибрилл (рис. 3.3., рис. 3.4.). Следует отметить, что толщина наночибрилл практически не изменяется. Сочетание данных параметров определяет снижение твердости гидрогелей при снижении $S_{\text{хит}}$, как описано выше (Таблица 3.3.).

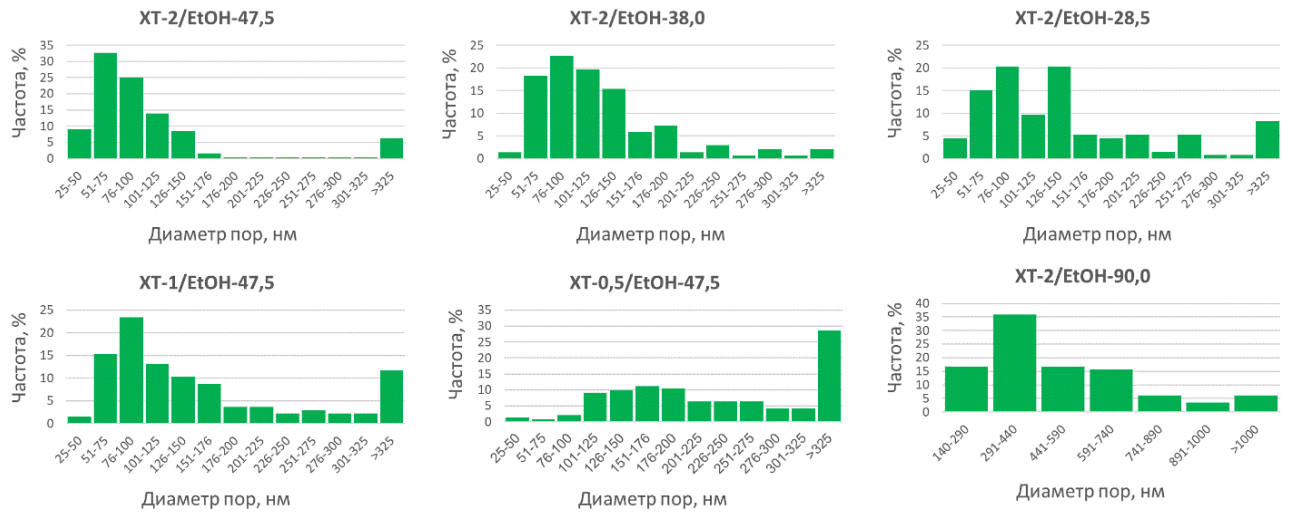


Рисунок 3.4. Распределение размера пор в лиофильно высушенных образцах XT-2/EtOH-47.5, XT-2/EtOH-38, XT-2/EtOH-28.5, XT-1/EtOH-47.5, XT-0.5/EtOH-47.5 и контроля XT-2/EtOH-87.0.

В отличие от механически слабых непрозрачных контрольных гидрогелей, полученных методом NIPS, все гидрогели, полученные предложенным нами методом, являются по меньшей мере полупрозрачными. Таким образом, нанопористая структура гелей с равномерным распределением полимерных нанофибрилл по объему определяет не только механические, но и оптические свойства исследуемых НФГ.

3.1.4.4. Рентгенофазовый анализ

Следует понимать, что СЭМ изображения непрозрачных лиофильно высушенных гелей не совсем полно отражают истинную структуру исследуемых гидрогелей, что наглядно подтверждается, например, существенным различием данных рентгенофазового анализа прозрачных исходных гидратированных образцов и лиофильно высушенных гелей, полученных из них.

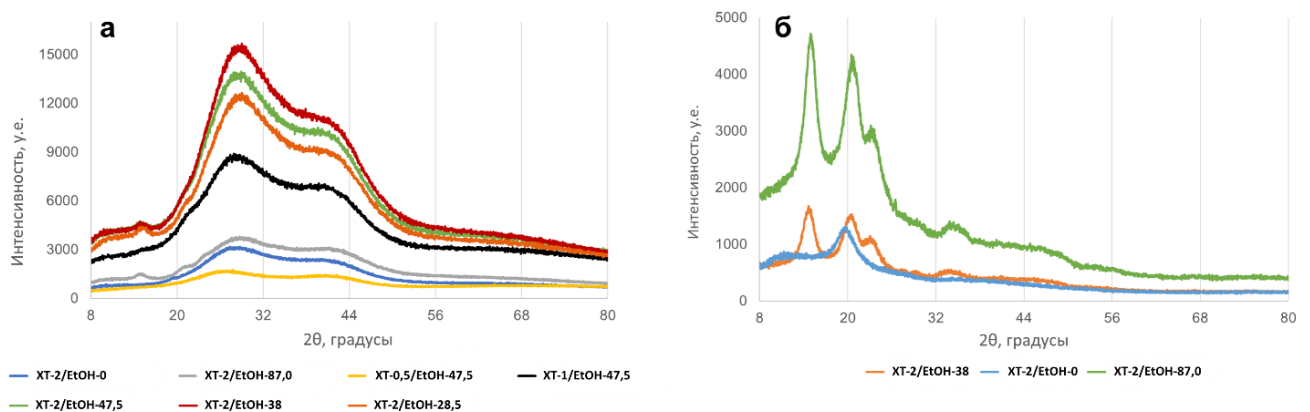


Рис. 3.5. Рентгенофазовые дифрактограммы: а) гидрогелей ХТ-2/ЕtОН-0 (контроль), ХТ-2/ЕtОН-87,0 (контроль), ХТ-0,5/ЕtОН-47,5, ХТ-1/ЕtОН-47,5, ХТ-2/ЕtОН-47,5, ХТ-2/ЕtОН-38, ХТ-2/ЕtОН-28,5 и б) лиофильно высушенных ХТ-2/ЕtОН-38, контроля ХТ-2/ЕtОН-87,0 и контроля ХТ-2/ЕtОН-0.

На дифрактограммах всех гидрогелей наблюдается широкое диффузное гало с уширенными рефлексами при 2θ на $\sim 29^\circ$ и $\sim 41^\circ$ (Рис. 3.5. а), которые, возможно, свидетельствуют о наличии гидратированных кристаллитов хитозана типа II [147,148]. Диффузное гало может образоваться вследствие целого ряда причин, прежде всего, сильной обводненности образцов, но также может являться результатом диффузного рассеяния на аморфном или слабоупорядоченном веществе или наноразмерных компонентах, входящих в состав образца. На дифрактограммах гидрогелей ХТ-2/ЕtОН-28,5, ХТ-2/ЕtОН-38 и ХТ-2/ЕtОН-47,5 появляется слабый рефлекс при 2θ на 15° и слабо выраженное плечо на 21° , что, вероятно, можно отнести к увеличению количества безводных кристаллитов хитозана при повышении $C_{\text{хит}}$ от 0.5 до 2 масс. %. После лиофильного высушивания дифрактограммы всех исследуемых образцов (кроме контроля ХТ-2/ЕtОН-0) имеют одинаковый вид. У всех образцов, полученных из растворов ХТ, содержащих этанол, рефлексы на 29° и 41° исчезают, а рефлексы 15° , 21° , 23° и 34° наоборот усиливаются, что согласно литературным данным, соответствует кристаллитам безводной формы хитозана [149], через ячейку которых проходят закрученные в двушаговую спираль две антипараллельные цепи хитозана.

3.1.5. Получение гелевых изделий

Используя метод формирования гелей LT-TIPS-NF, были разработаны подходы для получения изделий контролируемой архитектуры в широком диапазоне размеров с использованием известных и наиболее часто применяемых способов переработки полимеров.

Одним из таких методов является литье и отверждение в специальных формах, для реализации которой на первой стадии (заливка в форму и охлаждение) использовали раствор хитозана с $0,5 \text{ масс. \%} < C_{\text{хит}} < 2 \text{ масс. \%}$ при содержании спирта $38\% \text{ об.} \leq \phi_{\text{EtOH}} \leq 47,5 \text{ об. \%}$, что обеспечивало получение бездефектных изделий как с простой (цилиндры, фантом мениска и т.п.), так и со сложной формой поверхности (например, фантом ушной раковины, спиралевидные изделия, $1 \text{ масс. \%} \leq C_{\text{хит}} < 2 \text{ масс. \%}$) с большей прозрачностью (Рис. 3.2.) по сравнению с изделиями, полученными известными методами NIPS и TIPS

(Рис. 3.6.). Показано, что с помощью метода LT-TIPS-NF можно получать конструкции больших размеров и сложной формы, например, полноразмерные фантомы ушной раковины, трахеи (Рис. 3.6. в,г), единственные ограничения метода – это размеры холодильной камеры (для первой стадии) и коагуляционной ванны (для второй стадии). При этом благодаря надежной фиксации при понижении температуры формы изделия на первой стадии нет необходимости использовать дорогостоящие сложные в изготовлении формы, проницаемые для осадителя (нерастворителя).

На второй стадии изделие извлекают из молда ($T_q \leq T_{st} < T_{sp}$) и обрабатывают охлаждённым раствором осадителя (NaOH , $T_{st} = T_q$), при этом форма изделия сохраняется. Гели, полученные при T_q и $T_{st} \leq -2^\circ\text{C}$ являются безусадочными, при T_q и $T_{st} > -2^\circ\text{C}$ SR гелей не превышает 3% от начального объёма. Гели не набухают в диапазоне рН от 5.5 до 8.0. Перечисленные свойства позволяют получать изделия четко определенной формы, которую они могут сохранять в процессе их использования.

Пользуясь свойством термообратимости НСт-алкогелей, можно управлять формой изделия после извлечения из формы и нагревания выше температуры желирования, но при которой не происходит размягчения (в зависимости от толщины или диаметра предсформированного изделия, $T_q < T < T_{sp}$). Например, были получены спиралевидные изделия из цилиндрических стержней, отлитых в форме (Рис. 3.6. д). Данный эффект позволяет расширить возможности получения изделий с необходимыми параметрами.

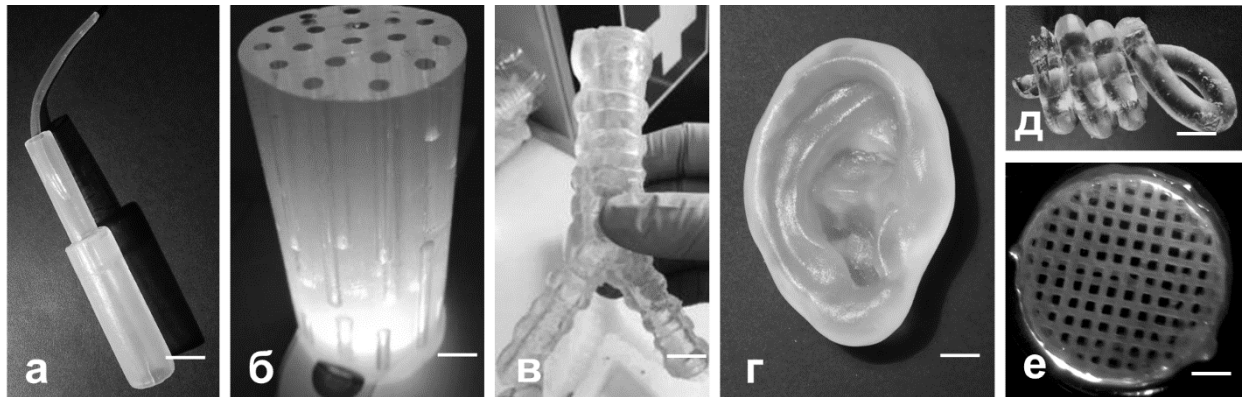


Рисунок 3.6. Фотографии гидрогелевых продуктов, сделанных различными методами: а-г) литьё в формы; д) изменение формы изделия после молдинга; е) 3D-печать. Масштабные линейки: а,г – 1 см, б – 1 мм, в – 1,5 см, д – 6 мм, е – 2 мм.

Прозрачные изделия с нанопибриллярной структурой и высокой удельной поверхностью перспективны для решения ряда технических (сорбенты, катализаторы, гидрогелевые машины и др. [150]) и медико-биологических (высвобождение лекарственных средств, датчики, биосенсоры и др. [151–153]) задач. Однако, размер пор в

нанометровом диапазоне ограничивает использование разработанных материалов в таких областях, как тканевая инженерия. Для получения изделий с развитой поверхностью, доступной для роста клеток, был использован метод временных подложек [78]. Получены полые трубки различных диаметров ($d \geq 3$ мм, толщина стенок ≥ 1 мм) и мультиканальные гидрогели ($d_{\text{каналы}} \geq 100$ мкм), которые можно использовать в качестве основы для искусственных сосудов и т.п., систем для направленного роста клеток, например при регенерации периферических нервов, соответственно (Рис. 3.6. а,б).

Для получения изделий с более сложной внутренней архитектурой нужно использовать временные подложки сложной формы, полученные, например, методом 3D-печати, или создавать такие изделия непосредственно в процессе 3D-печати водно-спиртовых растворов ХТ. В серии экспериментов показано, что при использовании раствора ХТ-2/ЭтОН-47,5 методом экструзионной 3D-печати ($T_q = -11^\circ\text{C}$) можно получить решётчатую цилиндрическую гидрогелевую структуру по меньшей мере с диаметром 1 см и высотой 0,5 см (Рис. 3.6.е) при сохранении ее внутренней макропористой архитектуры. Для получения изделий больших размеров и сложной формы требуется оптимизация параметров 3D-печати водно-спиртовым раствором хитозана (подача дополнительной охлаждающей жидкости, T_q , вязкость растворов, диаметр сопла, скорость печати и экструзии и т.д.) и использование более совершенного крио-3D-принтера. Макропористые 3D-носители рассматриваются как перспективные материалы для тканевой инженерии, заместительной трансплантологии и т.д.

Для оценки перспективности использования исследуемых гидрогелей для решения медико-биологических задач были проведены биологические испытания *in vitro* и *in vivo*.

3.1.6. *In vitro* испытания

Цитотоксичность разработанных НФГ оценивали по цитотоксичности экстрактов, полученных после инкубации гидрогелей в культуральной среде, с использованием клеток НерG2 с помощью МТТ-теста. В исследованиях использовали НФГ, полученный из раствора с максимальной концентрацией ХТ и этанола (ХТ-2/ЭтОН-47.5). Незначительное снижение жизнеспособности клеток, вероятно, вызвано не выделением цитотоксичных веществ из геля, а снижением количества специфических компонентов полной культуральной среды, используемой для получения экстрактов (Рис. 3.7.а). Одной из возможных причин является адсорбция белков сыворотки гидрогелем при получении экстракта, поскольку, известно, что ХТ эффективно сорбирует различные белки [154].

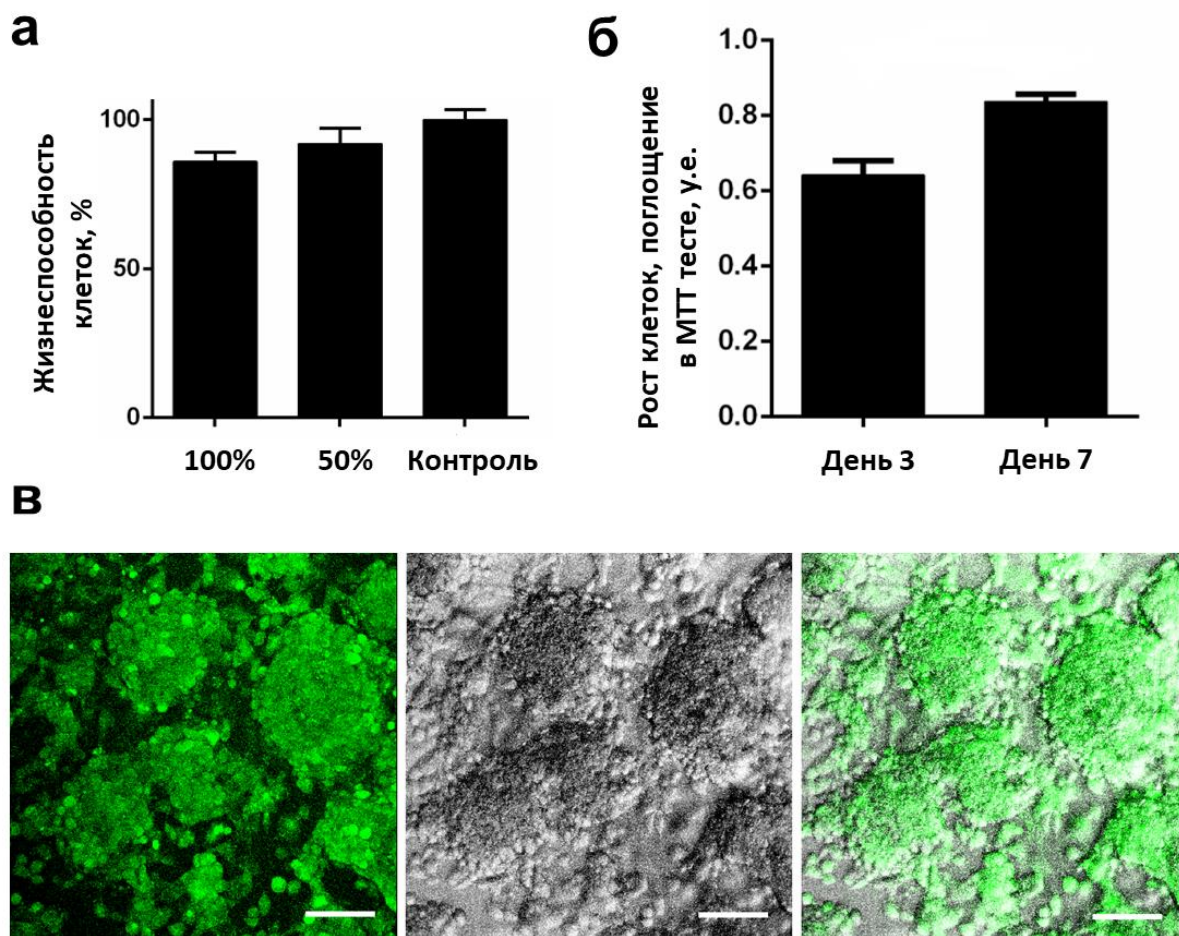


Рисунок 3.7. а) Данные МТТ теста на жизнеспособность клеток культуры HerG2 в присутствии экстрактов НФГ (ХТ-2/ЕtОН-47,5): 100% - только экстракт гидрогеля, 50% - 50% экстракта и 50% DMEM. Клетки, выращенные только в DMEM, использовались как контроль. б) МТТ тест на жизнеспособность и рост клеток при непосредственном контакте с НФГ на 3-ий и 7-ой дни культивирования. в) Флуоресцентная микроскопия HerG2 клеток, инкубированных на поверхности НФГ (ХТ-2/ЕtОН-47,5), 7 день: флуоресценция кальцеина АМ, окрашивающего живые клетки (слева, зелёная), микроскопия в светлом поле (в середине, ч/б), и объединённая фотография (справа), масштабная линейка 100 мкм. МТТ тест проводился в 5 повторах.

При прямом контакте с НФГ клетки HerG2 прикрепляются и растут на поверхности гидрогеля. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ теста на 3-ий и 7-ой дни инкубации. Как видно из рис. 3.7.б, рост клеток не прекращается, что также подтверждает нетоксичность материала и его пригодность для культивирования клеток животных. Увеличение количества очагов роста HerG2 в виде мультислойных агрегатов (Рис. 3.7.в) вероятно связано с высокой жесткостью геля ХТ-2/ЕtОН-47,5 (максимальный модуль Юнга среди всех исследованных гидрогелей). Известно, что жесткость гелей оказывает

существенное влияние на параметры роста, морфологию, дифференцировку и другие свойства клеток животных [155].

3.1.7. *In vivo* испытания

Образцы ХТ НФГ на основе композиции ХТ-2/ЭТ-47,5 были использованы для *in vivo* экспериментов. Гистологический анализ продемонстрировал слабую воспалительную реакцию и гомогенную структуру образцов, извлечённых после эксперимента, на всех временных промежутках. На 7-ой день эксперимента, реакция на имплантацию оказалась минимальной, можно было наблюдать одиночные макрофаги, никаких признаков биодegradации (Рис. 3.8.а). На 14-ый день тонкая фиброзная капсула, состоящая из 1-3 слоёв макрофагов сформировалась вокруг образцов гидрогелей, наблюдались одиночные зоны биодegradации (Рис. 3.8.б). На 30-ый день гистологическая картина значительно не изменилась. Микроструктура образцов изменилась лишь в нескольких зонах: изменение цвета окраски гидрогеля с розового на ярко-красный, неглубокие одиночные разрывы и дефекты. Фиброзная капсула не изменилась (Рис. 3.8.в).



Рисунок 3.8. Окраска гематоксилином и эозином гидрогелей ХТ-2/ЭТ-47,5 и окружающих тканей, извлечённых на а) 7-ой, б) 14-ый и в) 30-ый день после имплантации. Стрелки указывают на зону биодegradации

Полученные данные свидетельствуют о хорошей биосовместимости НФГ, слабой воспалительной реакции организма на их имплантацию и формирование тонкой соединительно-тканной капсулы вокруг гидрогелей в течение 1 месяца эксперимента. Отмечена незначительная степень биодegradация даже на 30-ый день эксперимента.

3.2. Гидрогели с системой направленных каналов (ГНК) на основе ХТ

Гидрогели, внутренняя структура которых представляет собой систему параллельно ориентированных микроканалов, представляют особый интерес для тканевой инженерии, поскольку их можно использовать для направленного роста клеток. В случае, если система

каналов разветвлена, такие гидрогели подходят для регенерации кровеносных сосудов, в случае же отсутствия ветвления – для регенерации разрывов нервов.

Анализ литературных данных, в которых представлены методики получения гидрогелей с системой направленных каналов (ГНК) на основе ХТ [120,121,156,157], позволил критически рассмотреть все подходы и разработать ранее не описанную методику получения гелей на основе ХТ с системой каналов. Следует отметить, что гели, описанные в работе [156], имеют каналы с диаметром ~ 5 мкм. В связи с этим их невозможно использовать для осуществления направленного роста клеток животных (d клеток > 10 мкм). ГНК, описанные в работе [157], характеризуются высокой структурной неоднородностью по высоте геля. При этом только небольшая зона ($h \sim 3-4$ мм), расположенная под верхним плотным слоем геля (от 100 мкм до нескольких миллиметров), содержит каналы (d от 10 до 35 мкм), способные обеспечить направленный рост клеток. Таким образом, данная методика не позволяет получить ГНК, пригодные для восстановления длинных разрывов и дефектов нерва ($L > 5$ мм), как описано выше. Несмотря на то, что методика, описанная в работе [121], позволяет получать ГНК с параметрами, пригодными для восстановления длинных дефектов ($h > 5$ мм, d каналов от ~ 150 до 500 мкм), она не лишена недостатков: ГНК, как и в [120], формируются, только в присутствии токсичных сшивающих агентов, что может оказывать негативное влияние на рост и пролиферацию клеток нервной ткани. Таким образом, поиск эффективных методик получения ГНК на основе ХТ, способных обеспечить восстановления дефектов нервной ткани с $L > 5$ мм, без использования сшивающих агентов остается весьма актуальной задачей.

Также анализ литературных данных позволил выявить методы получения ГНК не только из ХТ, но и из других природных полимеров: альгината и коллагена. В случае альгината формирование ГНК запускается при осаждении растворами солей, содержащими катионы тяжёлых металлов, например цинк, медь, барий, стронций [118,119], в случае коллагена это достигается высаливанием [117]. Образование таких схожих структур при осаждении разных полимеров говорит о наличии общего механизма и закономерностей формирования. На основании этих работ и, преимущественно, по результатам работы [121], мы предполагаем, что критическим условием формирования ГНК является наличие небольшой степени ковалентной или нековалентной сшивки макромолекул перед желированием. Для соблюдения этого критического условия в качестве объекта исследований был выбран биосовместимый синтетический полимер – поливиниловый спирт (ПВС), широко используемый для решения различных медико-биологических задач.

Известно, что ПВС эффективно образует комплексы с ХТ, что было использовано, например, при создании термочувствительных гидрогелей [158]. Таким образом, целью данной работы была оценка возможности получения ГНК на основе композиций ХТ/ПВС, без использования токсичных сшивающих агентов, пригодных для направленного ротка клеток животных.

Найдено, что проведение фронтального осаждения (при движении осадителя в виде фронта с поверхности раствора вглубь формирующегося гидрогеля) кислых растворов ХТ в комплексе с ПВС с помощью концентрированного раствора щёлочи (NaOH) приводит к формированию в ходе осаждения ГНК (Схема 3.2. а). Фронтальное осаждение вызывает формирование многочисленных каналов, направленных вдоль направления диффузии осадителя. Гидрогели с такой структурой могут быть использованы в качестве скаффолдов для направленного роста нервов (Схема 3.2. б). Это позволит решить проблему регенерации разрывов нервной ткани, в частности, периферических нервов, которая касается направленного роста нейронов к месту разрыва. Наличие трубчатых структур малого диаметра (50-300 мкм) в скаффолде позволяет отросткам нейронов расти в нужном направлении на большие расстояния.

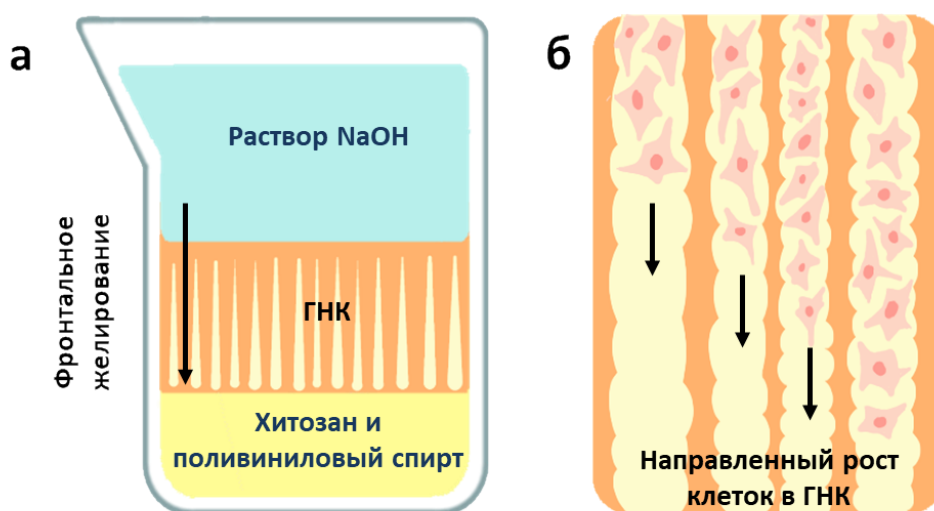


Схема 3.2. а) Схема формирования гидрогелей с системой параллельно ориентированных каналов; б) схематическое изображение роста клеток внутри ГНК.

Для изучения микроструктуры гидрогеля, формирующегося при нейтрализации водной композиции гидрохлорида ХТ раствором NaOH (1,5 масс.%), использовали композицию, в которой концентрации $C_{ХТ}$ и $C_{ПВС}$ составляли 2 масс.% и 1,5 масс.%, соответственно. Использование композиции с более высоким содержанием ХТ по

сравнению с оптимальным для формирования ГНК по данным работы [156] ($C_{ХТ}$ - 1,5 масс.%, с учетом вязкости раствора, концентрации основания) обусловлено необходимостью нивелировать снижение вязкости растворов ХТ при введении ПВС [159], что может приводить к формированию выраженного вогнутого мениска при нанесении раствора осадителя поверх композиции ХТ/ПВС. В свою очередь это приводит к искривлению движения фронта осадителя, что может затруднить интерпретацию получаемых результатов. Согласно работе [158] при “объемном” желировании композиций ХТ/ПВС (все компоненты, включая осадитель, распределены равномерно) при их одинаковом соотношении по массе наблюдается резкий переход структуры формирующегося геля от макропористой к микропористой. На данном этапе работы использовали ХТ и ПВС в массовом соотношении 1/0,75, полагая, что это позволит получить ГНК с диаметром каналов, по меньшей мере, превосходящих данный параметр гелей (d от 3 до 10 мкм), полученных в работах [156,157].

3.2.1. Структура ГНК и особенности её формирования

Найдено, что введение ПВС влияет на способность ХТ систем формировать гидрогели с ориентированными структурами, параллельными направлению распространения фронта осадителя (Рис.3.9.). Структура ХТ/ПВС гидрогеля аналогична структурам ХТ гелей, описанным, например, в работах [157,160], включающим, по меньшей мере, две структурно-различающиеся зоны. Зона, близкая к верхней границе гидрогеля (поверхностная зона), соответствующая зоне начального контакта с раствором осадителя, не содержит ориентированных структур. В зависимости от условий гелеобразования размер поверхностной зоны составляет от ~ 30 мкм до приблизительно 1 мм. Ниже неё расположена зона формирования и роста каналов (канальная зона). Диаметр каналов составляет более 10 мкм. Исследовали влияние концентрации компонентов на формирование ГНК для определения оптимальной композиции ХТ/ПВС и условий желирования при получении ГНК с минимальной толщиной поверхностной зоны и диаметром каналов, подходящим для роста клеток животных.

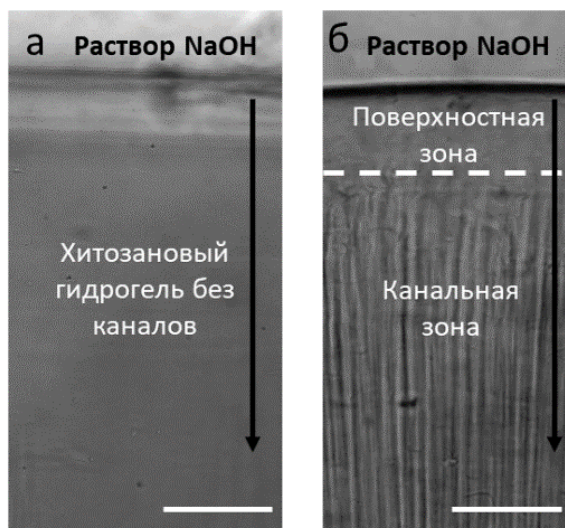


Рисунок 3.9. Хитозановые гидрогели а) без каналов; б) содержащие параллельно ориентированные каналы. Стрелка указывает направление движения диффузии осадителя (NaOH). [79]

3.2.1.1. Влияние концентрации основания и кислоты

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) (Рис. 3.10. а,б) и повышением концентрации NaOH (при постоянной концентрации HCl) (Рис. 3.10. а) толщина поверхностной зоны увеличивается. Например, для композиции, содержащей 1,5 масс.% ПВС, толщина этой зоны изменяется от ~ 40 мкм (C_{NaOH} 0,5 масс.%) до ~ 300 мкм (C_{NaOH} 6 масс.%).

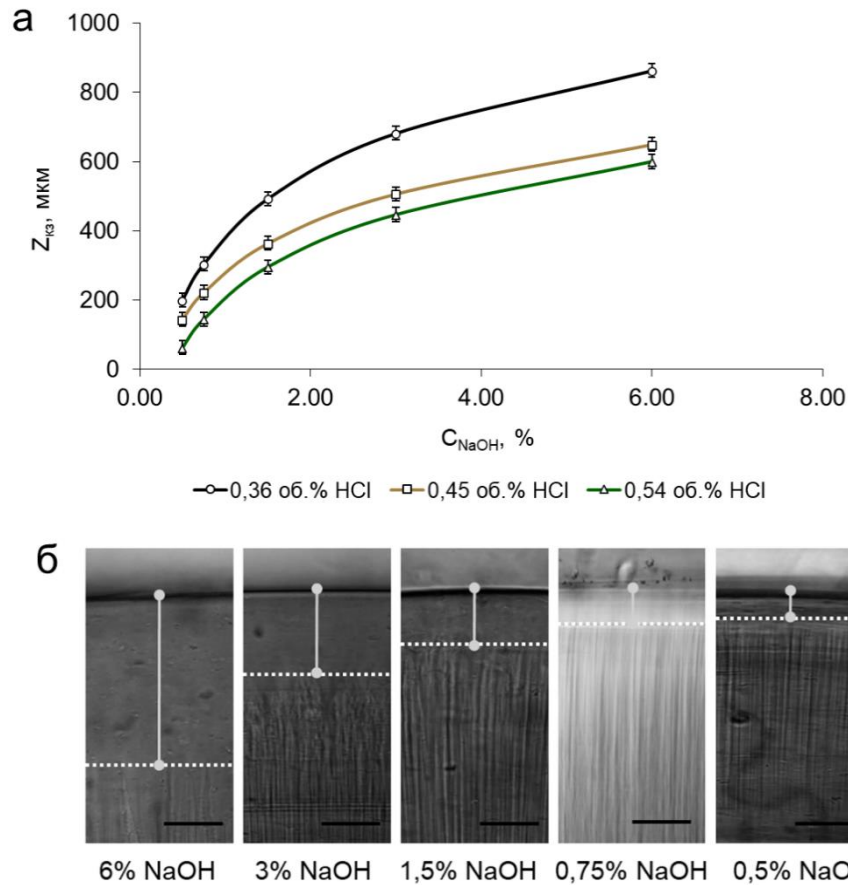


Рисунок 3.10. а) Зависимость глубины появления каналов и начала канальной зоны (Z_{kz}) от концентрации кислоты (HCl) и концентрации щелочи (NaOH). б) Толщина поверхностной зоны в зависимости от содержания NaOH. Белая пунктирная линия обозначает границу между поверхностной и канальными зонами. Масштабная линейка 100 мкм.

Сопоставление данных об изменении скорости движения фронта осаждения (V_f) и видеосъемки процесса фронтального осаждения в тонких кюветах при разных соотношениях C_{NaOH}/C_{HCl} позволило установить, что массовое зарождение каналов начинается в тот момент, когда значение скорости движения фронта осаждения падает до критического значения. Следует отметить, что критическое значение не зависит от начальных соотношений C_{NaOH}/C_{HCl} , а определяется концентрацией ПВС (Рис. 3.11). Проведенные исследования литературных данных показали, что нет информации о выявлении данной закономерности. В данной работе показано, что скорость движения фронта зависит от диффузии NaOH и его расходования в процессе нейтрализации. Увеличение концентрации щелочи приводит к росту начальной V_f . В свою очередь, чем выше начальная скорость, тем больше времени требуется для достижения критического значения скорости, и это, в свою очередь, определяет толщину поверхностной зоны.

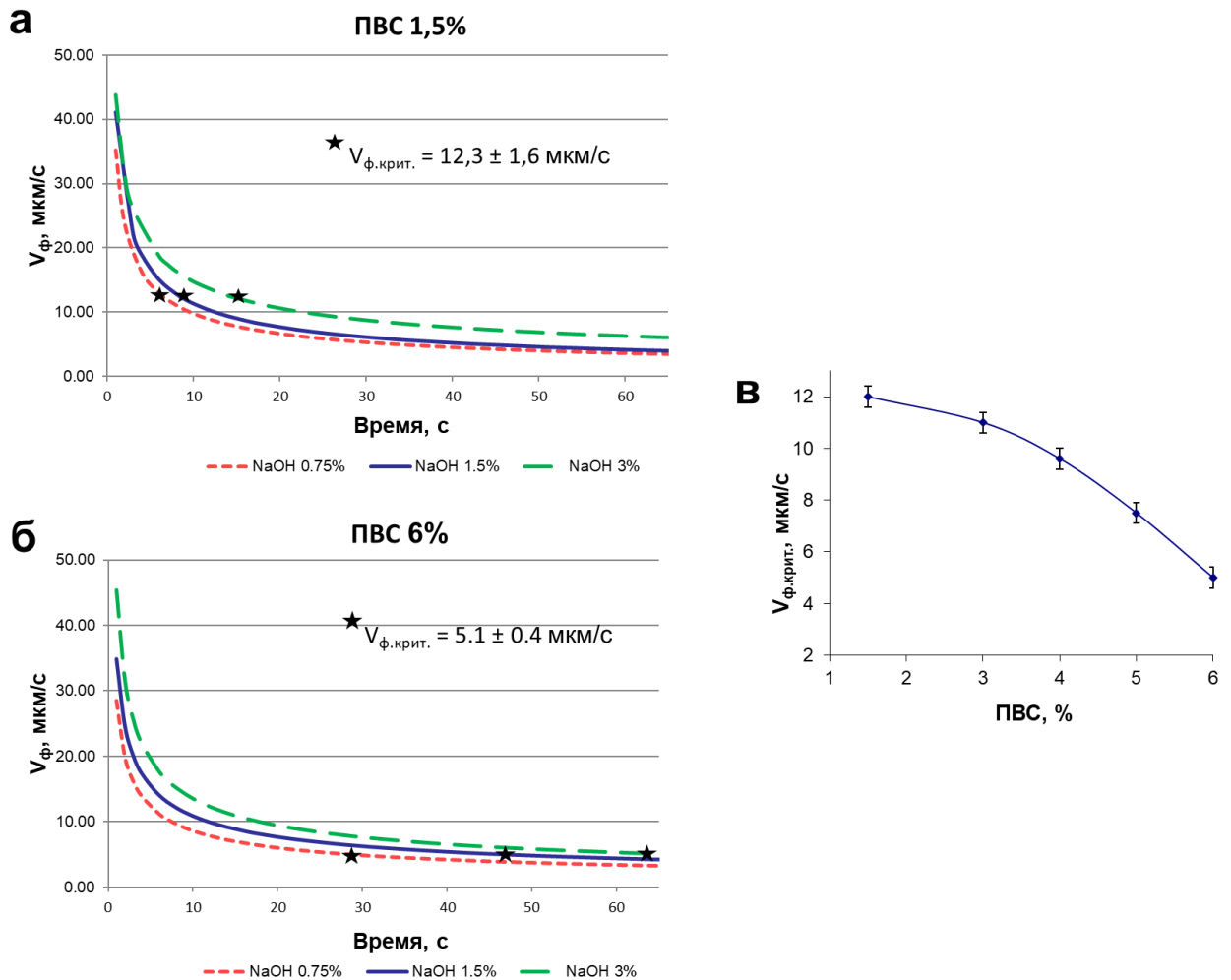


Рисунок 3.11. Динамика скорости движения фронта осаждения (V_f) в зависимости от концентрации NaOH при концентрации ПВС а) 1,5 масс.% и б) 3 масс.%. Звёздочками обозначена критическая V_f ($V_{f, \text{крит.}}$), при которой начинается рост каналов. в) Зависимость $V_{f, \text{крит.}}$ от концентрации ПВС.

3.2.1.2. Влияние концентрации ПВС

Исследование влияния ПВС на формирование канальной системы в геле показало, что каналы не формируются при $C_{\text{ПВС}} < 0.375$ масс.% в осаждаемом растворе, что, по-видимому, обусловлено слабым комплексообразованием ПВС с ХТ. При $C_{\text{ПВС}} \geq 0.375$ масс.% наблюдается образование двух зон: поверхностной и канальной. Как видно из данных, приведенных на рис. 3.12., 3.13., распределение каналов неравномерное, количество и диаметр каналов постепенно меняется с увеличением расстояния от поверхности. Повышение $C_{\text{ПВС}}$ без изменения концентраций ХТ и HCl приводит к формированию каналов в более глубоких слоях. Так, при повышении концентрации ПВС до 6 масс.% толщина ($C_{\text{NaOH}} = 3.0$ масс.%) поверхностной зоны увеличивается приблизительно в 3 раза по сравнению с композицией, содержащей 1,5 масс.% ПВС, и

составляет от 340 мкм до 1 мм в зависимости от концентрации щелочи. Следует отметить, что при концентрации ПВС выше 3 масс.% глубокие слои формируемого геля (> 1 см) не содержат каналов, а расслаиваются. Таким образом, данные композиции с содержанием ПВС > 3 масс.% менее привлекательны для получения скаффолдов для восстановления больших дефектов нервной ткани и в дальнейших биологических испытаниях не исследовались.

Повышение содержания ПВС от 0,375 до 1,5 масс.% сопровождается увеличением числа каналов на единицу площади. Дальнейшее увеличение $C_{\text{ПВС}}$ до 6 масс.% приводит к уменьшению количества каналов и увеличению их среднего диаметра (Рис. 3.12.). Например, для $C_{\text{ПВС}} = 1,5$ масс.% на глубине 3 мм средний диаметр каналов составляет 39.7 ± 23.5 мкм, в то время как для $C_{\text{ПВС}} = 6$ масс.% на той же глубине средний диаметр каналов составляет уже 70.9 ± 39.0 мкм.

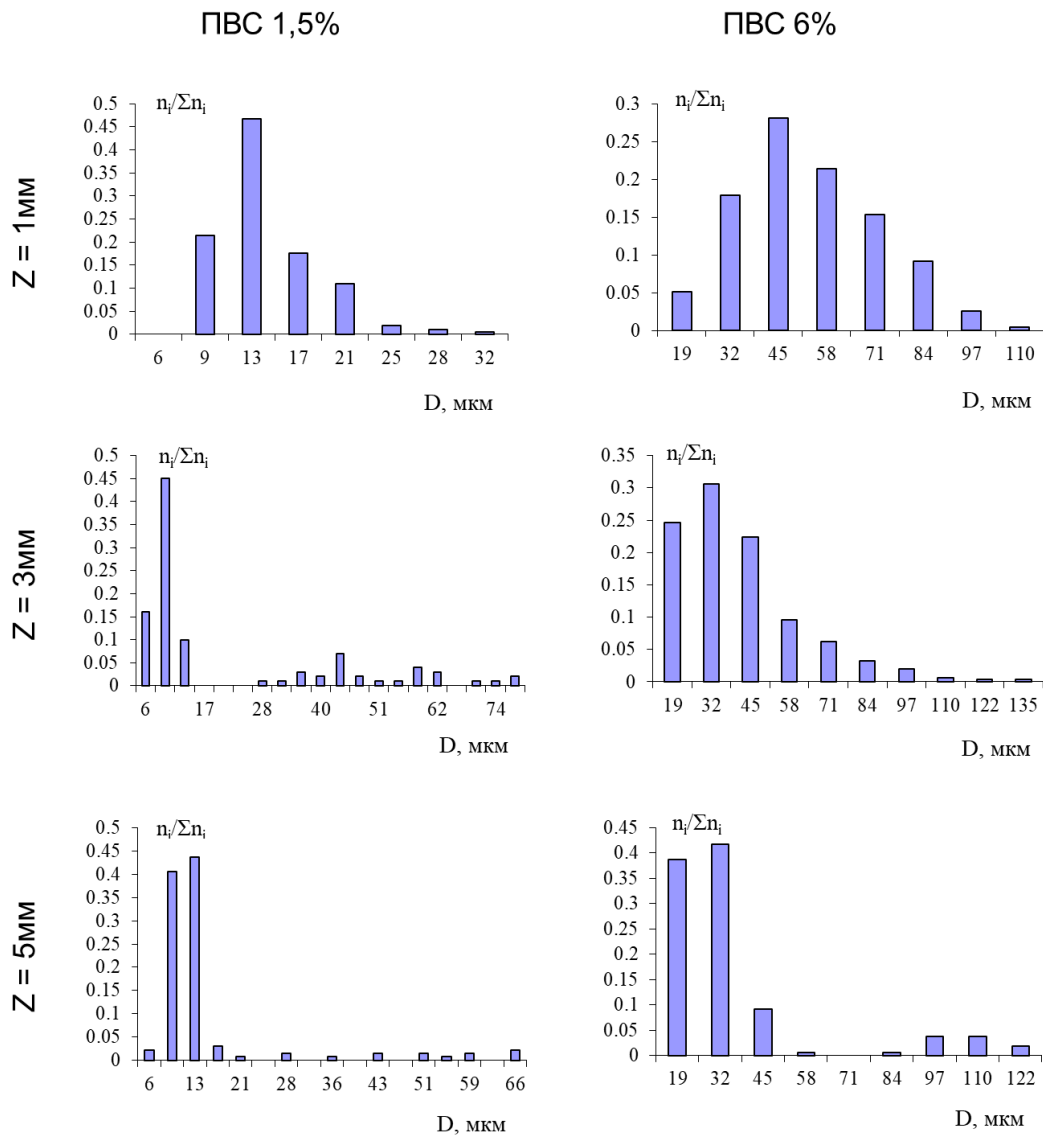


Рисунок 3.12. Распределение диаметров каналов у образцов ГНК с различным содержанием ПВС на разной глубине (Z). [79]

Примечательно, что зависимость общего числа каналов от глубины проходит через максимум (Рис. 3.13.). Как показано на рис. 3.13. б, когда $C_{\text{ПВС}}$ возрастает, зона с наибольшим числом каналов смещается в более глубокие слои гидрогеля, частично из-за роста толщины поверхностной зоны (при постоянных C_{NaOH} и C_{HCl}). Например, толщина поверхностной зоны образца с $C_{\text{ПВС}} = 6$ масс.%, ($C_{\text{NaOH}} = 3,0$ масс.%, $C_{\text{HCl}} = 0,45$ об.%) превосходит толщину поверхностной зоны гидрогелей с $C_{\text{ПВС}} = 3$ масс.% и $C_{\text{ПВС}} = 1,5$ масс.% в 3 и 2,3 раза соответственно. В диапазоне C_{NaOH} от 0,5 до 6 масс.% толщина поверхностной образца с содержанием ПВС 1,5 масс.% варьировалась от 30 до 500 мкм, и от 350 мкм до 1 мм при содержании ПВС 6 масс.% ($C_{\text{HCl}} = 0.45$ об.%).

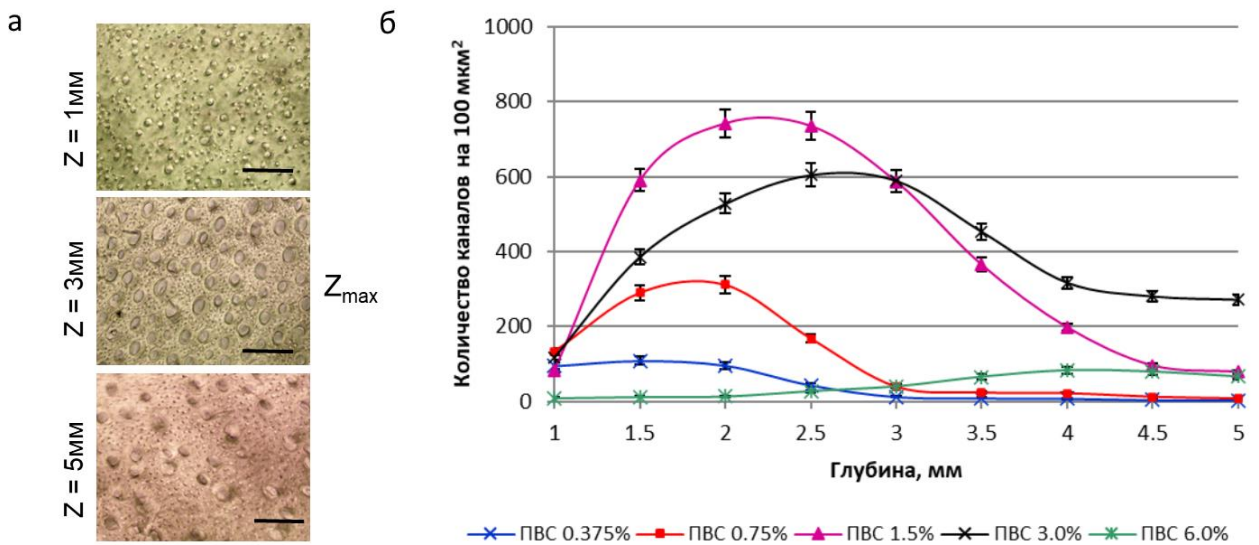


Рисунок 3.13. а) Микроскопия поперечных срезов ГНК, содержащих 3 масс.% ПВС, на разной глубине (Z); Z_{max} – глубина, на которой располагается наибольшее число каналов. б) Диаграмма количества каналов на 100 мкм^2 в зависимости от Z у образцов с разным содержанием ПВС. Масштабная линейка 100 мкм . [79]

Таким образом, разработан подход, который позволяет управлять толщиной поверхностной зоны и количеством каналов путем изменения концентрации ПВС.

3.2.1.3. Вторичные каналы

Следует отметить, что увеличение общего числа каналов происходит в основном за счёт увеличения количества каналов малого диаметра. Такие каналы могут образовываться либо *de novo*, либо могут представлять собой вторичные каналы, ответвляющиеся от более крупных (Рис. 3.14. а,б). Непосредственное образование вторичных каналов удалось зафиксировать при видеосъемке желирования в тонких кюветах (Рис. 3.14. в). Согласно

этим данным, вторичные каналы формировались от каналов с самым большим диаметром (первичные каналы).

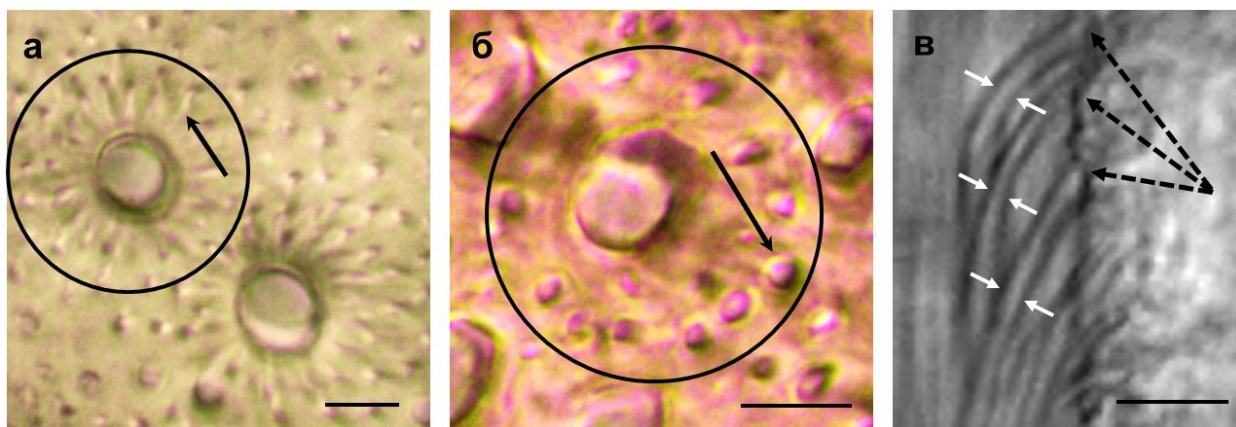


Рис. 3.14. Фотографии микроскопии вторичных каналов: а) инициация образования, глубина от поверхности 2 мм (поперечный срез, $C_{\text{ПВС}} = 3$ масс.%); б) элонгация вторичных каналов, глубина от поверхности 4 мм (поперечный срез, $C_{\text{ПВС}} = 3$ масс.%); в) локус формирования вторичных каналов, глубина от поверхности 2 мм (продольное сечение, видеосъемка в кювете, $C_{\text{ПВС}} = 1,5$ масс.%. Окружности показывают месторасположение вторичных каналов, стрелки указывают на отдельные каналы, пунктирные стрелки обозначают стенки первичных каналов. Масштабная линейка 30 мкм.

Формирование вторичных каналов начинается в более глубоких слоях при увеличении $C_{\text{ПВС}}$ (например, для образцов с $C_{\text{ПВС}} = 1,5$ масс.% эта глубина составляет 1,5 мм, а для $C_{\text{ПВС}} = 6$ масс.% это 3 мм, что вносит основной вклад в смещение зоны с максимальным числом каналов (Z_{max}) в более глубокие слои. С увеличением глубины диаметр вторичных каналов также увеличивается, что усложняет различие между первичными и вторичными каналами и их отдельный подсчет.

Мы предполагаем, что ПВС, формируя с ХТ супрамолекулярные комплексы, вызывает локальные механические напряжения, ведущие к образованию каналов. Концентрация ПВС определяет размер и количество таких комплексов, что, в свою очередь, влияет на начальный диаметр и число каналов.

3.2.1.4. Кривообработка гелей

Существенный разброс диаметров каналов, изменение их количества по глубине и ветвление делает полученные ГНК потенциальными кандидатами для регенерации мягких тканей, например, содержащих большое количество кровеносных сосудов, но снижают возможность их использования для регенерации периферических нервов в связи с высокой вероятностью ветвления аксонов в ходе регенерации нерва.

Для устранения указанных недостатков был предложен способ дополнительной криообработки ГНК. Оказалось, что при однократном цикле замораживания-оттаивания ряда образцов при сохранении параллельной ориентации каналов наблюдается увеличение среднего диаметра каналов и резкое сужение их распределения по размерам. Следует отметить, что образцы, содержащие менее 1 масс.% ПВС, после заморозки образуют губчатую систему неупорядоченных взаимосвязанных пор., Полученные данные свидетельствуют о том, что ПВС в концентрации более 1 масс.% выступает в роли криостабилизатора, вероятно, за счет формирования криогеля, препятствующего нарушению ориентированной структуры ГНК в результате формирования кристаллов льда (Рис. 3.15.).

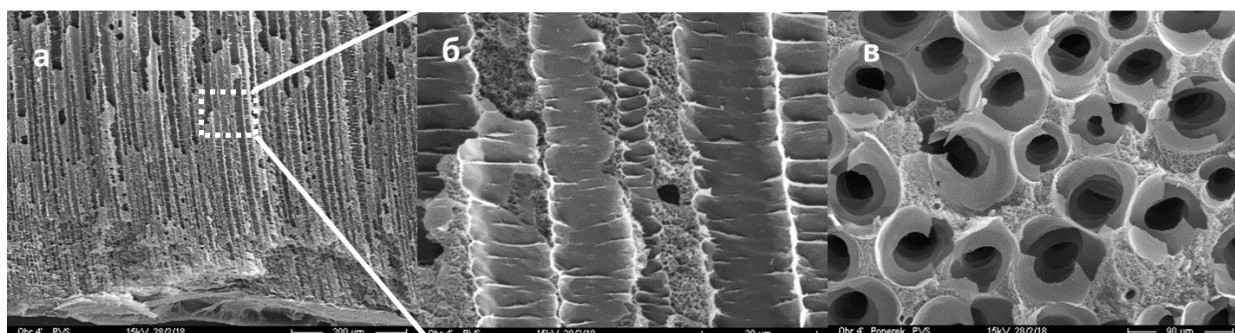


Рисунок 3.15. Изображения СЭМ на глубине 5мм лиофильно высушенных а,б) продольных и в) поперечных срезов ГНК, содержащих 1,5 масс.% ПВС, после однократного цикла замораживания-оттаивания. [79]

Кроме того, у образцов гелей, содержащих 3 масс.% и более ПВС, на расстоянии примерно 1-1,5 см от верхней поверхности геля наблюдается расслоение, после которого роста каналов не наблюдается. Таким образом, ГНК, полученные из указанных образцов, а также из композиций с содержанием ПВС < 1 масс.% не отвечают требованиям, предъявляемым к скаффолдам для регенерации нервной ткани, поэтому для биологических испытаний были использованы только композиции, содержащие 1,5 масс.% ПВС. $C_{\text{HCl}} = 0.36$ об.%, $C_{\text{NaOH}} = 1.5$ масс.% для получения наименьшей толщины поверхностной зоны.

3.2.2. In vitro испытания

Перед проведением испытаний *in vitro* для получения стерильных образцов ГНК кипятили 3 раза по 30 минут. При этом по данным гравиметрического анализа (точное измерение массы высушенных образцов) оказалось, что остаточное количество ПВС составляло не более $12 \pm 1\%$ от первоначально введенного количества. Таким образом, ПВС способствует получению ГНК и стабилизации их структуры при замораживании-

оттаивании образцов, при этом конечный гель практически не содержит этого плохо биodeградируемого синтетического полимера.

Цитотоксичность является одним из наиболее важных факторов, которые следует учитывать при выборе материалов для регенерации мягких тканей. Метод прямого контакта клеток глиомы С6 с фрагментами гидрогеля и метод экстрактов использовали для оценки цитотоксичности ГНК.

Для всех контрольных точек найденная жизнеспособность клеток превышает 70%. Как правило, исследуемый ГНК не оказывает существенного воздействия на метаболическую активность клеток во времени. Незначительное снижение жизнеспособности при непосредственном контакте клеток с фрагментами гидрогеля, наблюдаемое через 24 ч, очевидно связано с первоначальным механическим воздействием на клетки при внесении геля, что могло привести к гибели части клеток (Рис. 3.16. а). Результаты МТТ теста подтверждают, что гидрогели не выделяют цитотоксические соединения и могут быть рассмотрены для дальнейшего биомедицинского применения.

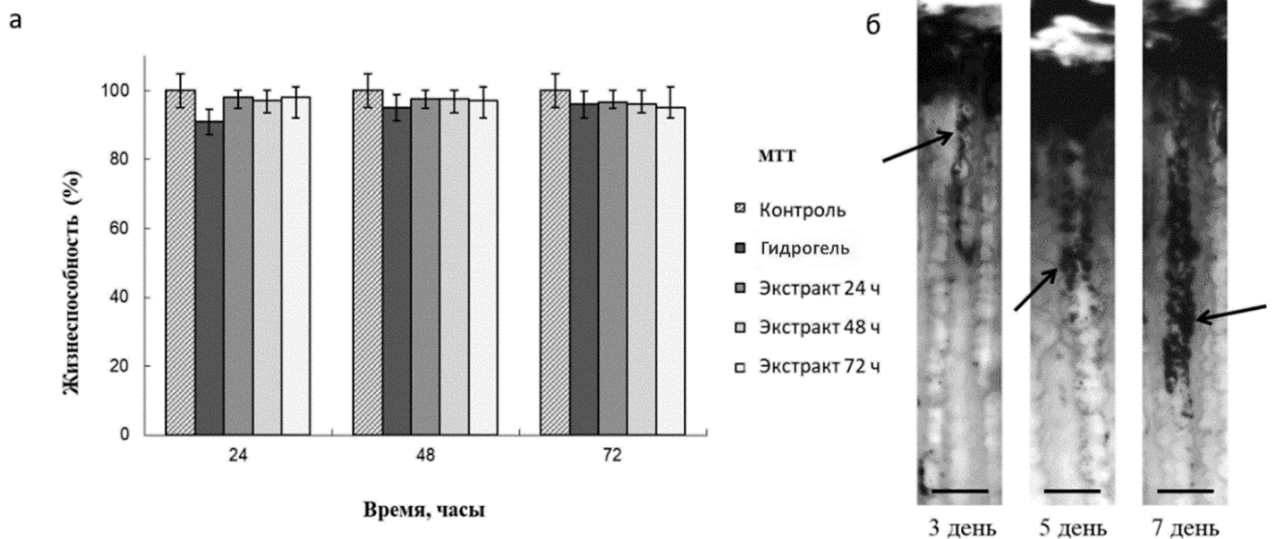


Рисунок 3.16. а) Оценка цитотоксичности ГНК с помощью МТТ теста. Приведены усредненные значения четырёх измерений. б) Продольный срез ГНК на 3, 5 и 7 день культивирования культуры клеток глиомы С6 после обработка МТТ реагентом. Чёрные стрелки указывают на кристаллы формазана в каналах, свидетельствующие о наличии активных клеток. Масштабная линейка 100 мкм. [79]

Способность разработанных ГНК обеспечивать направленный рост клеток оценивали с использованием культуры клеток глиомы С6. Клетки наносили на поверхность образцов со срезанной верхней частью ГНК ($h \sim 1$ мм) и культивировали в течение 7 дней. Характер роста оценивали с использованием МТТ-теста. В течение первых трех суток

наблюдался рост преимущественно на поверхности ГНК с последующим прорастанием клеток внутрь каналов на 5-7 сутки культивирования. На рис. 3.16. б темный окрас соответствует сформированным кристаллам формазана, что свидетельствует о высокой активности клеток, как на поверхности геля, так и внутри каналов.

Все результаты работы с ХТ ГНК были опубликованы в [122].

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 криожелирования.

3.3. Скаффолды на основе фотоиндуцированной сшивки гиалуроновой кислоты

Гиалуроновая кислота (ГК) является природным линейным полисахаридом, состоящим из повторяющихся звеньев глюконовой кислоты и N-ацетилглюкозамина. Биосовместимость и ферментативная биodeградируемость за счёт эндогенного происхождения являются привлекательными для использования ГК в таких сферах, как регенеративная медицина и тканевая инженерия, в частности как материал для создания скаффолдов для культивирования клеток. Поскольку ГК не способна без дополнительных компонентов формировать нерастворимые в воде гидрогели, было разработано множество способов получения гидрогелей на основе ГК как с помощью ковалентного сшивания различными бифункциональными реагентами или за счёт прививки групп, способных образовывать между собой связи. Такие модификации приводят к значительным изменениям физико-химических свойств при сохранении биосовместимости и биodeградируемости.

Одним из самых перспективных вариантов ковалентного сшивания являются фотоиндуцированные реакции сшивки (фотоотверждение) производных ГК. Ключевым преимуществом этого направления является не только эффективная регуляция свойств скаффолдов на основе модифицированной ГК, но и возможность легко адаптировать процесс формирования скаффолдов под методы аддитивных технологий (например, лазерная 3D-печать).

3.3.1. Введение двойных связей в ГК с использованием ГМА

Наиболее перспективным подходом модификации ГК является введение в ГК 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: 3D-печать, лазерное

рисование, микромодинг. В данной работе получение производных ГК, содержащих винильные группы, проводили на основе реакции полимераналогичных превращений с участием глицидилметакрилата (ГМА). Важной характеристикой мГК при создании скаффолдов на её основе является степень замещения (СЗ) двойными связями, которая влияет на свойства мГК (вязкость, растворимость, скорость сшивки), что в свою очередь влияет на процесс создания скаффолдов и их свойства (скорость деградации в организме, механическая прочность, коэффициент набухания). Возможность точно регулировать эту ключевую характеристику и, соответственно, все зависящие от неё свойства является неотъемлемым этапом в изучении мГК и скаффолдов на её основе, что является одной из главных задач нашего исследования. На данный момент ещё нет работ, которые посвящены масштабному анализу свойств мГК.

Полимераналогичная реакция ГК с ГМА для введения звеньев с двойной связью может проходить как гетерофазная реакция в водной среде со слабо растворимым в воде ГМА [37], как гомофазная реакция в органических растворителях после замены иона натрия в ГК на липофильный ион тетрабутиламмония [161] или как гомофазная реакция в водно-органической среде [38]. В данной работе для модификации ГК с помощью ГМА была выбрана простая, одностадийная гомофазная реакция в водно-органической среде [38]. Эта реакция была модифицирована и оптимизирована под задачи исследования. В качестве начальных условий был выбран следующий вариант соотношения компонентов реакции: ГК 0,78 масс.% при растворении в воде, вода/ДМФА=1,5/1, ГК/ГМА (г/мл) = 1/18, 25 °С, 4 суток, нейтральный рН (6,5). В результате проведения реакции в данных условиях были получены образцы, в которых СЗ групп ГК звеньями с двойной связью составила 39%.

3.3.2. Разработка метода определения двойных связей

3.3.2.1. Реакция $KMnO_4$ с ГМА

Для определения концентрации винильных групп была разработана экспресс-методика количественного определения степени замещения мГК звеньями ГМА с помощью цветной реакции Вагнера (Схема 3.3.) (окисления двойных связей перманганатом калия ($KMnO_4$)) [124] и спектрофотометрическим подтверждением результатов.

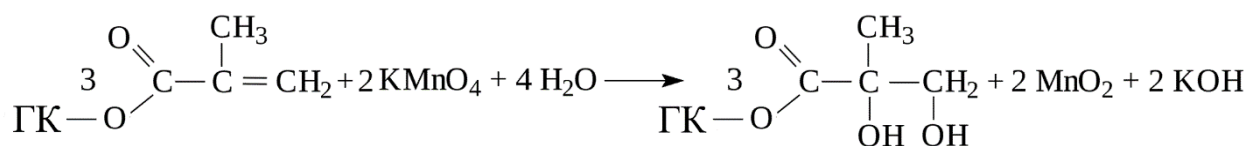


Схема 3.3. Реакция Вагнера.

В результате реакции наблюдается характерное изменение цвета с ярко-фиолетового на светло-коричневый после полного окисления всех двойных связей (Рис. 3.17.). Было показано, что KMnO_4 не даёт никакой цветной реакции при добавлении немодифицированной ГК, при этом он реагирует как с ГМА, так и с мГК, что доказывает вступление KMnO_4 в реакцию только с глицидилметакрилатом.

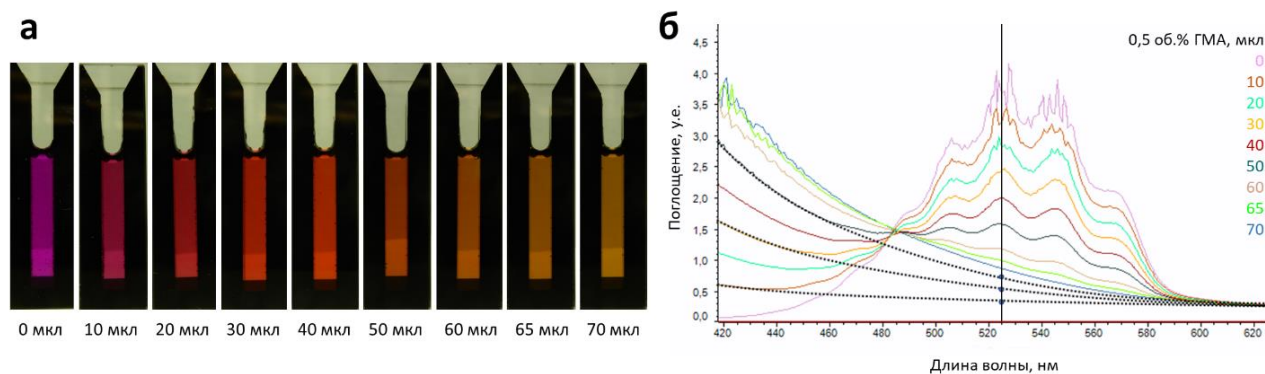


Рисунок 3.17. а) Изменение цвета раствора KMnO_4 в зависимости от объёма добавленного ГМА (0,5 об.%). б) Спектры поглощения KMnO_4 после добавления ГМА, пунктирные точки соотносятся с аппроксимацией поглощения MnO_2 , вертикальная линия обозначает пик при 525 нм.

Для раствора KMnO_4 характерно наличие нескольких пиков в области от 450 до 600 нм. Для определения количества ГМА, а, следовательно, и количества двойных связей, необходимых для восстановления 1 мл 0,25 мг/мл KMnO_4 , была сделана калибровка 0,5 об.% ГМА стандартным раствором KMnO_4 . При восстановлении ионов KMnO_4 пик при 525 нм также линейно уменьшается, однако при этом наблюдается общее увеличение поглощения с 200 до 600 нм (Рис. 3.17.). Согласно патенту [162] это происходит вследствие образования оксида марганца, оптическая плотность которого суммируется с оптической плотностью оставшегося перманганата. Стоит отметить, что линии спектров на рис. 3.16. пересекают изобестическую точку при 485 нм, что демонстрирует протекание реакции Вагнера с соблюдением всех стехиометрических коэффициентов и отсутствие побочных реакций, и подтверждает аккуратность проведения экспериментов.

Оптическую плотность KMnO_4 отдельно от MnO_2 можно оценить построением аппроксимирующей кривой поглощения MnO_2 , проходящей через основание пиков поглощения KMnO_4 и пересекающей прямую линию, параллельную оси Y, обозначающую пик при 525 нм. Точка пересечений этих линий обозначает оптическую плотность MnO_2 и позволяет построить график зависимости поглощения от содержания для этого соединения (Рис. 3.18. а). Оптическая плотность остаточного KMnO_4 для построения калибровочной

кривой была получена вычитанием оптической плотности MnO_2 из значения общей оптической плотности при 525 нм при титровании. Из графика видно, что падение концентрации KMnO_4 во время титрования ГМА линейно и практически совпадает с калибровочной кривой KMnO_4 , полученной при разбавлении (Рис. 3.18. б).

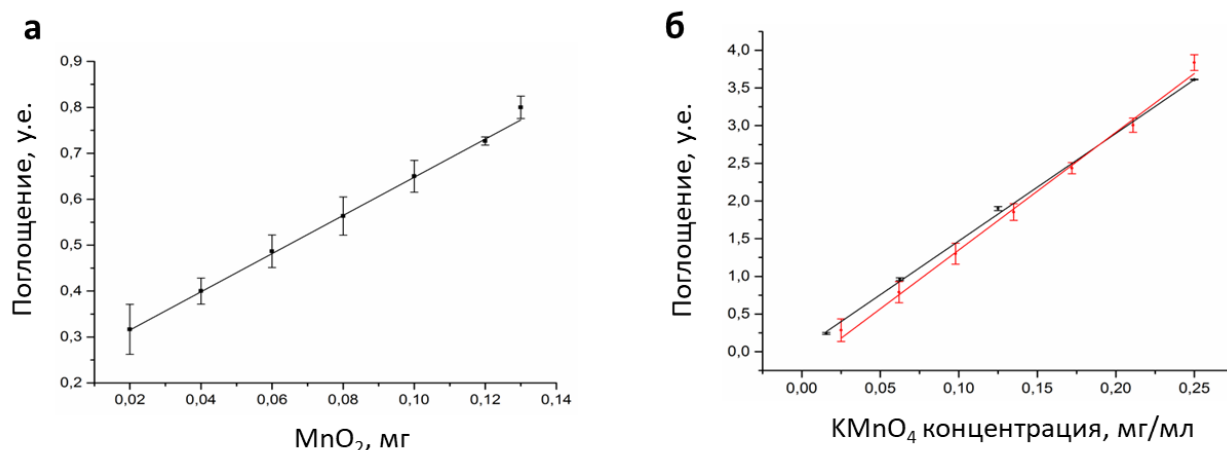


Рисунок 3.18. а) График зависимости поглощения от содержания MnO_2 ; б) калибровочная кривая KMnO_4 , полученная разбавлением (чёрная линия) и при добавлении ГМА (красная линия).

Близкие значения теоретически рассчитанного (2,37 мкмоль) и экспериментального количества (2,54 мкмоль) 0,5 об.% раствора ГМА, необходимого для полного титрования 1 мл 0,25 мг/мл KMnO_4 с погрешностью не более 7%, подтверждает факт протекания реакции по механизму Вагнера. Таким образом, проведённые эксперименты подтвердили возможность использования этого метода для количественного подсчёта содержания двойных связей и СЗ мГК.

3.3.2.2. Определение СЗ мГК

СЗ мГК определяли следующим образом: вначале было вычислено то количество ГМА, которое требуется для полного титрования 1 мл 0,0625 мг/мл KMnO_4 . Оно составило 0,5925 мкмоль. Это значение эквивалентно тому количеству двойных связей, которое будет содержаться в определённом объёме образца мГК, который полностью оттитрует то же количество KMnO_4 . После определения объёма и, соответственно, массы исследуемого образца мГК, необходимого для полного восстановления стандартного раствора KMnO_4 , можно рассчитать СЗ данного образца с учётом его изменившейся молекулярной массы. СЗ рассчитывается в (%) как отношение количества двойных связей к количеству дисахаридов в исследуемом образце, умноженная на 100.

Для подтверждения прохождения реакции, а также для верификации данных, полученных колориметрическим методом, были также проведены ИК- и ЯМР-спектроскопия образцов мГК.

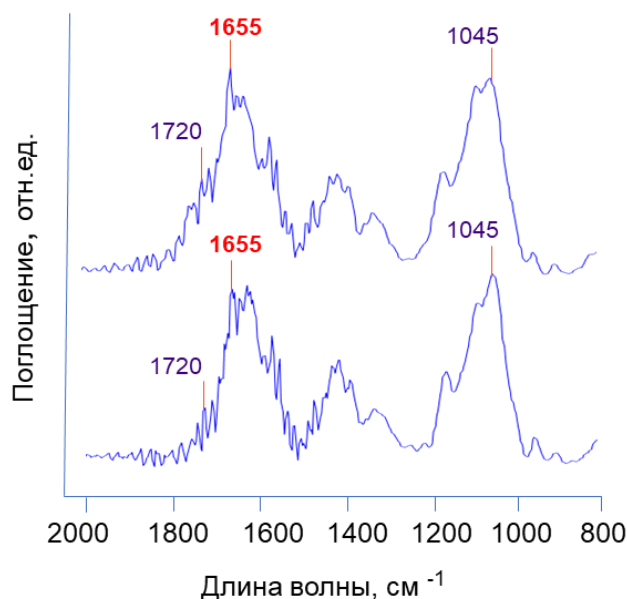


Рисунок 3.19. ИК-спектры образцов мГК с СЗ 22,2% (нижний спектр) и СЗ 45,4% (верхний спектр). Пик на 1655 см^{-1} – двойная связь, 1720 см^{-1} – карбонильная группа, 1045 см^{-1} – карбоксильная группа.

Сравнение ИК-спектров двух образцов мГК с СЗ, различающейся в два раза (22,2% и 45,4%), подтвердило факт модификации ГК ГМА и показало значительное различие между этими двумя образцами. Так, из рис. 3.19. видно, что у образца с более высокой СЗ происходит увеличение пика, соответствующего двойной связи (1655 см^{-1}), а также пика карбонильной группы (1720 см^{-1}), что говорит не только о присоединении метакрилатных звеньев, но и глицидильной части ГМА, и свидетельствует о протекании реакции через необратимый механизм раскрытия эпоксидного кольца. Уменьшение пика, соответствующего карбоксильной группе (1045 см^{-1}), также свидетельствует о том, что присоединение ГМА происходит преимущественно по карбоксильной группе.

Модификация ГК ГМА была также подтверждена ^1H ЯМР спектроскопией (Рис. 3.20.). СЗ изучаемого образца мГК, определённого перманганатометрическим методом, составила 41,5%, что сопоставимо со СЗ 46,8%, определённой ^1H ЯМР. Более высокая СЗ во втором случае может быть связана с уширением сигнала в результате наложения сигналов метильных протонов ГК и ГМА на 1,9-2 ppm. Этот эффект часто наблюдается при исследовании макромолекул [161,163].

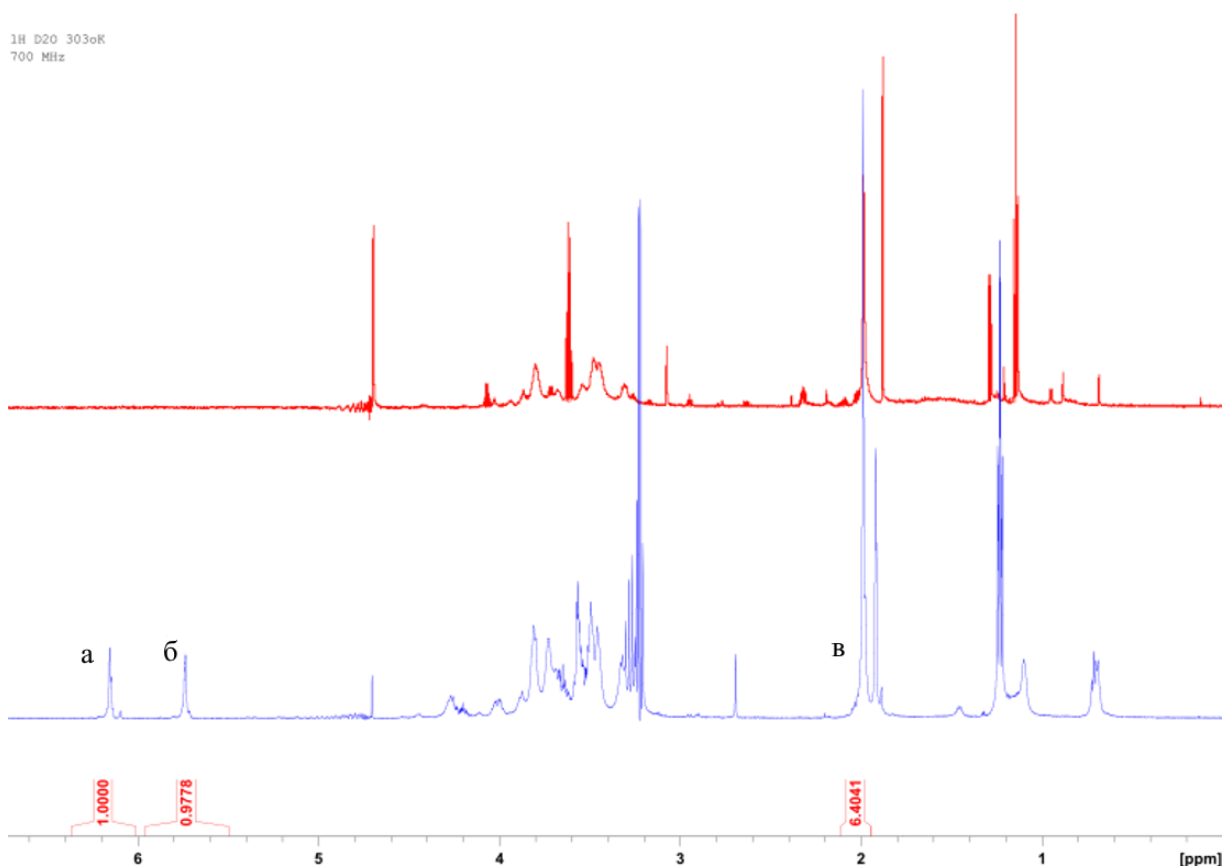


Рисунок 3.20. ЯМР спектры ГК (верхний спектр, красный) и мГК (нижний спектр, синий). Числа показывают относительные интегралы пиков ГМА протонов при двойной связи (пики на ω 6.2 (а) и ω 5.8 (б) ppm) и метильных протонов ГК при ацетамидной связи (пик на ω 2 (в) ppm) в мГК.

Разработанный метод также можно применить для быстрой относительной оценки влияния различных параметров сшивки, таких как концентрация и тип фотоинициатора, соинициатор, сшивающий реагент и т. д., на процесс расходования двойных связей в процессе реакции. Таким образом, разработанный метод позволяет не только определять СЗ, но и контролировать конверсию двойных связей во времени.

3.3.3. Влияние условий и состава реакционной смеси на СЗ мГК

Для возможности управлять модификацией ГК требовалось изучение влияния параметров реакции ГК с ГМА (условия и состав реакционной смеси) на СЗ, которая определяет свойства мГК и скаффолдов на ее основе. Для этого были получены образцы мГК в реакционной смеси с различным рН и содержанием ГМА при изменении времени и температуры реакции, и измерена степень замещения винильными группами [164].

3.3.3.1. Влияние рН на СЗ в мГК, механизм реакции

Влияние pH на СЗ в мГК оценивали при проведении реакции в нейтральной среде (pH 6,5) с катализатором ТЭАБ или без него, в щелочной среде (pH 10), полученной при замене катализатора ТЭАБ на катализатор триэтиламин (ТЭА), как в описано в оригинальной методике, взятой за основу [38], и в кислой среде (pH 3), полученной при добавлении HCl к исходной реакционной смеси. Определено, 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 [38,165,166] полимераналогичная реакция ГК с ГМА в водно-органической среде может протекать по двум основным механизмам: за счет необратимой реакции с раскрытием эпоксидного кольца глицидила и за счет обратимой переэтерификации остатка метакриловой кислоты ГМА (Схема 3.4.).

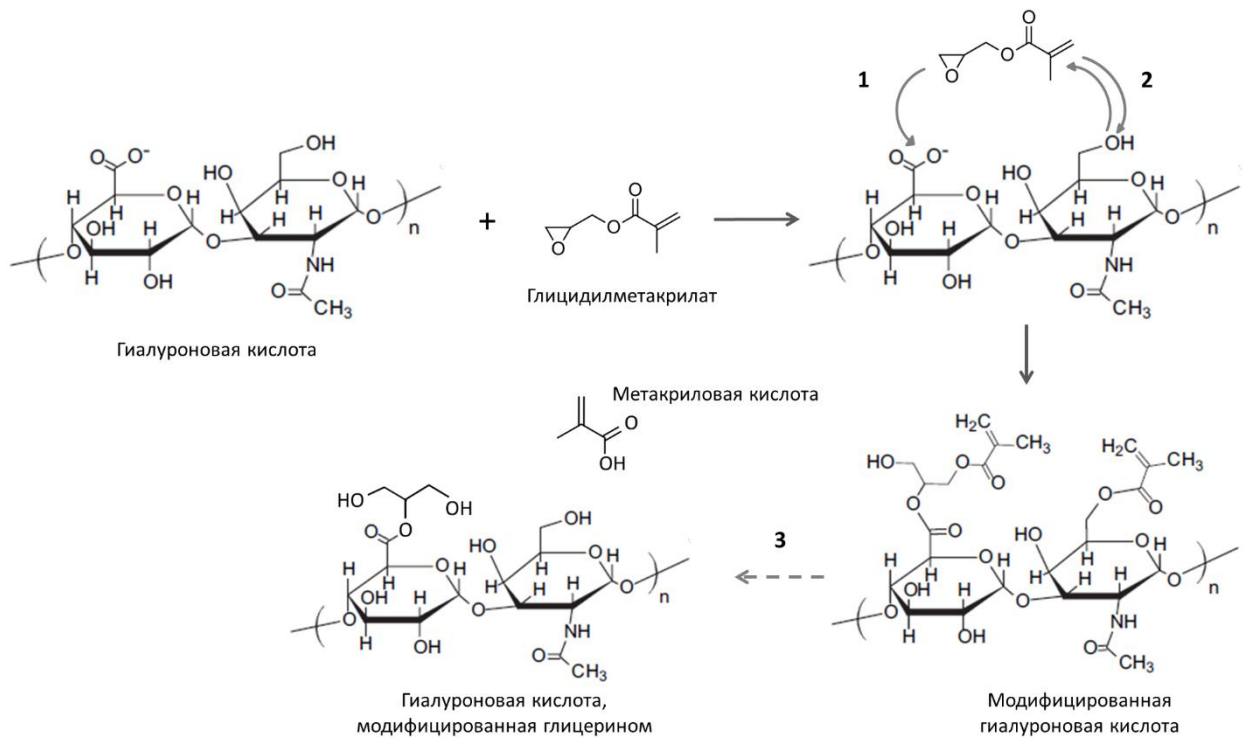


Схема 3.4. Схема реакции конъюгации ГМА к ГК. 1) Необратимая реакция присоединения через раскрытие эпоксидного кольца; 2) обратимая реакция переэтерификации; 3) побочная реакция гидролиза ГМА.

Показано, что при кислом pH ГМА взаимодействует как с гидроксильными, так и с карбоксильными группами через раскрытие эпоксидного кольца, а при щелочном pH ГМА подвергается гидролизу и реагирует лишь с гидроксильными группами по обоим механизмам, при этом, предпочтительным механизмом является раскрытие эпоксидного цикла. Следует отметить, что гидролиз и переэтерификация протекают в меньшей степени при нейтральном pH, чем при щелочном pH, а при кислом pH гидролиз сложноэфирных

связей практически отсутствует, поэтому модификация преимущественно протекает через раскрытие эпоксигруппы. С учётом описанных механизмов можно сделать вывод, что при щелочном рН наряду с реакцией присоединения винильных групп, протекает гидролиз, что снижает СЗ в конечном продукте (~20%). Кроме того, практически одинаковые значения СЗ, полученные в нейтральных и кислых условиях (~39%), свидетельствуют о незначительном гидролизе и при нейтральном рН. Таким образом, найдено, что оптимальный процесс реализуется при проведении реакции модификации ГК в нейтральной среде, в которой возможно контролируемое управление СЗ, благодаря минимизации вклада побочных реакций. В случае данного процесса наиболее подходящим катализатором является ТЭАБ, который не повышает рН среды и является катализатором фазового переноса, позволяющим проводить процесс как в водной, так и органической среде.

3.3.3.2. Влияние времени и температуры на СЗ в мГК

Реакцию модификации ГК проводили в течение 4 суток, в отличие от базовой методики, в которой время проведения составляло 5-10 суток при рН 12 [38]. Такой протокол был выбран, исходя из результатов измерения СЗ в продукте каждые сутки в течение 6 дней реакции, которые представлены в нашей статье [124]. Определено, что после 4 суток СЗ значительно не изменялась при дальнейшем протекании реакции. Полученные данные имели хорошую воспроизводимость и СЗ обеспечивала требуемую степень сшивки при фотоиндуцированном формировании гидрогелей. Кроме того, как было описано выше, проведение реакции при нейтральном рН значительно снижает гидролиз, а, значит, повышает СЗ, поэтому время проведения реакции в течение 4 суток является оптимальным при температуре 25°C. Повышение температуры проведения процесса с 25 до 30 или 40°C позволило уменьшить время реакции и повысить СЗ (Рис. 3.21).

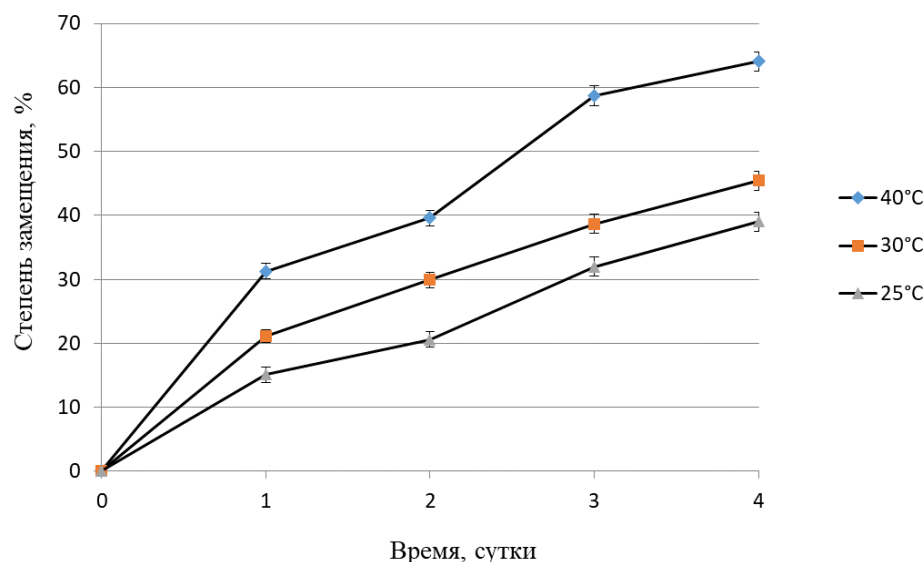


Рисунок 3.21. График зависимости СЗ мГК от времени и температуры.

Так, при начальных условиях за 4 суток СЗ в продукте составляет 39%, 45%, 64% при 25°C, 30°C и 40°C, соответственно. Это может быть связано с тем, что при более высокой температуре соблюдается принцип Вант-Гоффа, и происходит увеличение скорости необратимой реакции раскрытия эпоксидного кольца, кроме того, может увеличиваться растворимость ГМА в реакционной смеси. Дальнейшее повышение температуры реакции может приводить к термогидролизу ГК и снижать молекулярную массу продуктов [167], поэтому в данной работе не проводились модификации выше 40°C.

3.3.3.3. Влияние соотношения компонентов и времени на СЗ в мГК

Одним из эффективных инструментов управления СЗ при проведении реакции полимераналогичных превращений ГК является изменение концентрации компонентов в исходной смеси. Изменение концентрации ГМА в реакционной смеси при прочих равных условиях позволяет эффективно управлять СЗ. Как видно (Рис. 3.22.), повышение концентрации ГМА в системе приводит к увеличению СЗ, которая может достигать почти 70%. Эксперимент проводили при 40 °C в течение 4 суток. При этом важно отметить, что повышение концентрации ГМА на 1 г ГК выше 18 мл не приводит к значительному повышению СЗ в данном временном интервале, что делает неэффективным дальнейшее повышение количества ГМА в реакционной смеси.

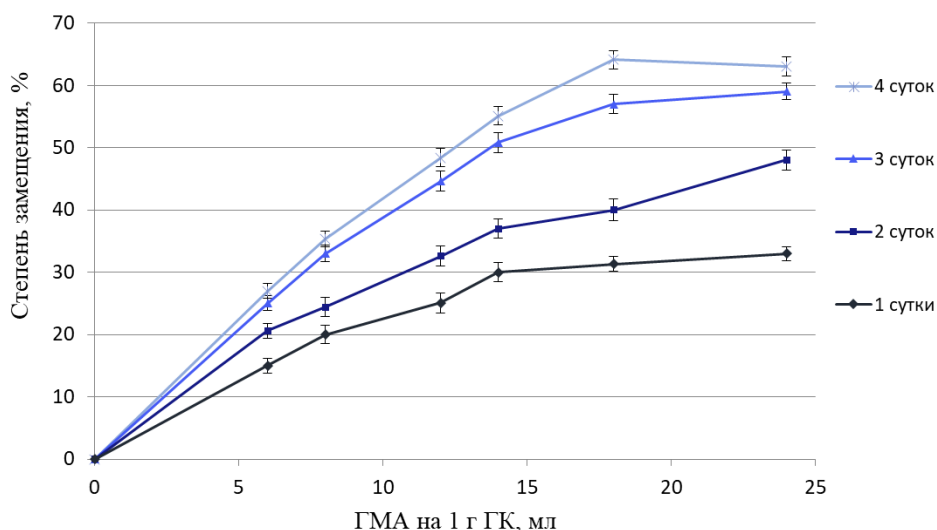


Рисунок 3.22. График зависимости СЗ от времени и содержания ГМА.

Увеличение содержания органической фазы по сравнению с оригинальной методикой (соотношение вода/ДМФА = 1,2/1 вместо 3/1) позволяет получать схожую и даже более высокую СЗ без участия катализатора межфазного переноса (ТЭАБ). Для получения мГК с максимальной СЗ необходимо проводить реакцию в нейтральной среде при повышенной температуре (40 °С) с самыми высокими соотношениями ГМА (≥ 18 мл) к 1г ГК в течение 4 суток. Таким образом, впервые было проведено многопараметрическое изучение зависимости СЗ в мГК от концентрации компонентов и различных параметров реакции. Полученные результаты являются инструментом для выбора оптимальных условий проведения реакции и точной настройки СЗ в мГК с целью получения гидрогелей с требуемыми свойствами и степенью сшивки.

Дальнейшее исследование было сфокусировано на оценке влияния СЗ на свойства мГК и сшитых гидрогелевых скаффолдов на её основе. Для этих целей были сделан ряд синтезов мГК с различными СЗ, варьирующимися в диапазоне от 11% до 69%, и были изготовлены скаффолды на её основе различными методами.

3.3.4. Получение фотоотверждаемых композиций

Для получения скаффолдов изготавливали фотоотверждаемые композиции (ФОК) – вязкие растворы на основе мГК, способные к фотоотверждению под действием лазерного излучения. В работе продемонстрирован способ получения гидрогелевых скаффолдов в процессе фотоиндуцируемой реакции сшивки ФОК на основе мГК и фотоинициатора, эндогенного нетоксичного флавиномононуклеотида (витамин В2) (ФМН) совместно с соинициатором триэтаноамином, способным генерировать радикалы под действием света

из синего и УФ диапазона (Схема 3.5.). В ФОК также вводили ПЭГДА для предотвращения набухания и деформации получаемых скаффолдов, а также для более тонкой настройки их механических характеристик ТЭОА используется в качестве соинициатора для увеличения эффективности фотоотверждения за счёт способности конвертировать короткоживущие триплетные состояния ФМН (~1 мкс) в долгоживущие нейтральные радикалы (~100 мкс) (Схема 3.5.) [168].

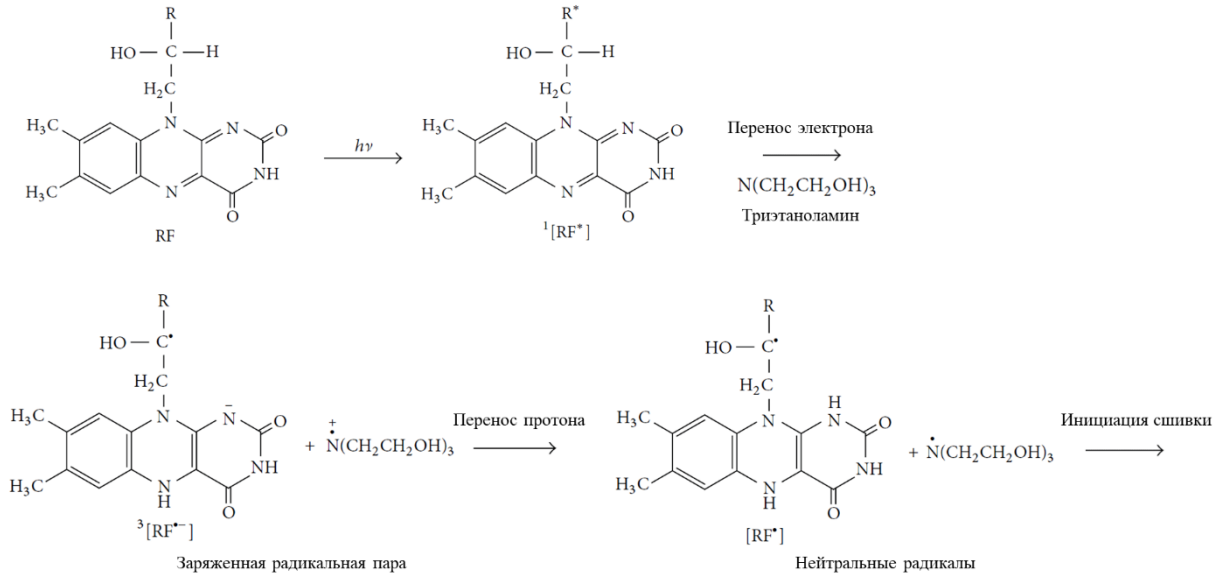


Схема 3.5. Схема формирования радикалов в системе фотоинициаторов ФМН (обозначен как RF) и ТЭОА [169]. R обозначает боковую цепь ФМН.

Для оценки эффективности формирования свободных радикалов было изучено различное соотношение ФМН/ТЭОА с помощью 2,2-дифенил-1-пикрилгидразина (ДФПГ). Этот простой метод позволяет оценить время жизни радикалов под действием УФ-света. ДФПГ является стабильным радикалом, имеющим интенсивную полосу поглощения около 520 нм. После реакции со свободными радикалами фиолетовый ДФПГ становится бесцветным или желтоватым. Падение поглощения ДФПГ при 523-525 нм позволяет оценить наработку радикалов.

Установлено, что повышение содержания ТЭОА при неизменном содержании ФМН (0,066 мМ) приводило к закономерному снижению времени фотообесцвечивания ДФПГ, при этом содержание ТЭОА выше 50 мМ практически не влияло на время реакции (Рис. 3.23.). Для изготовления скаффолдов была выбрана концентрация ТЭОА 33 мМ, поскольку при таком содержании скорость образования радикалов достаточно высокая и ТЭОА не оказывает цитотоксического эффекта на клетки.

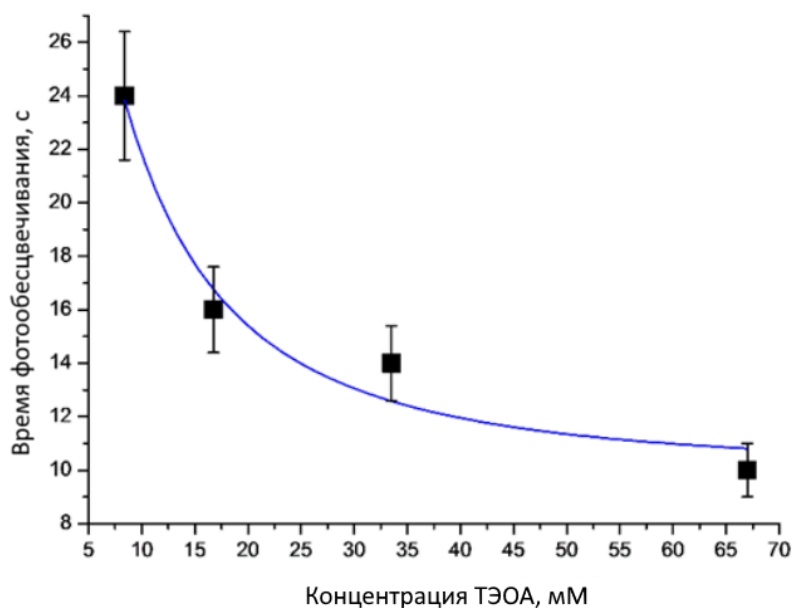


Рисунок 3.23. Зависимость времени фотообесцвечивания ДФПГ в растворе фотоинициатора ФМН/ТЭОА от концентрации ТЭОА при облучении светом на 450 нм.

3.3.5. Получение скаффолдов

Для получения скаффолдов из мГК было использовано несколько методик: фотоотверждение в открытой с двух сторон силиконовой форме, зажатой между двумя стёклами, экструзионная 3D-печать и экструзия композиции мГК в раствор с фотоинициаторами для получения полых трубчатых структур. Во всех методиках ФОК облучали синим светом при 450 нм для фотоинициации пары инициатор/соинициатор ФМН/ТЭОА и запуска реакции радикального сшивания привитых винильных групп. Выбор такой длины волны обусловлен полосой поглощения комплекса ФМН/ТЭОА в области видимого света и является выигрышным по сравнению с использованием УФ света для активации традиционно используемых фотоинициаторов I типа, таких, как Иргакур 2959, для которых характерен гомолитический распад на радикалы. Недостаток УФ света связан с его цитотоксическим воздействием, что является неприемлемым при формировании ТИК.

3.3.5.1. Получение скаффолдов литьем в формы

Скаффолды, полученные экспонированием (450 нм) ФОК в силиконовом спейсере, открытом с двух сторон и зажатым между стёклами, представляют собой цилиндры диаметром 5 мм и высотой 1 мм; которые использовали для изучения различных свойств скаффолдов в зависимости от СЗ. Внутреннюю морфологию лиофильно высушенных образцов оценивали с помощью СЭМ (Рис. 3.24.). Изображения продемонстрировали формирование пористых структур с диаметром пор порядка 30 мкм после равновесного

набухания гидрогеля в воде (Рис. 3.24. б). В случае, если гидрогель высушивали сразу после изготовления без вымачивания в воде, структура оставалась гладкой, практически без пор. Таким образом, для формирования внутренней архитектуры скаффолдов, оптимальной для роста клеток, необходимо предварительная обработка гидрогелей вымачиванием в водной среде.

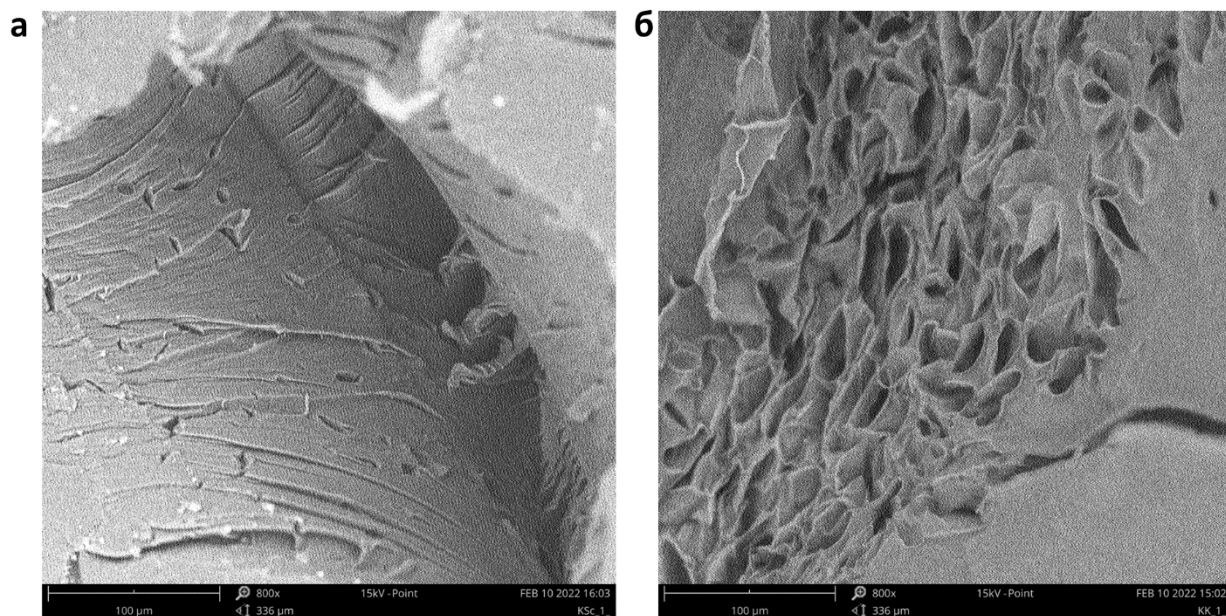


Рисунок 3.24. СЭМ изображение лиофильно высушенных гидрогелей мГК а) без предварительного вымачивания в воде, б) вымачивания и набухания в воде до равновесного состояния. Масштабная линейка 100 мкм.

3.3.5.2. Экструзионный метод получения скаффолдов

На экструзионном 3D принтере скаффолды печатали в виде 7-слойных решётчатых структур (Рис. 3.25.) из ФОК на основе мГК с СЗ 40%, загруженной в шприц, и тестировали их *in vitro* для оценки цитотоксичности и адгезии клеток на поверхности скаффолдов на примере культуры Vj-5ta (фибробласты человека).

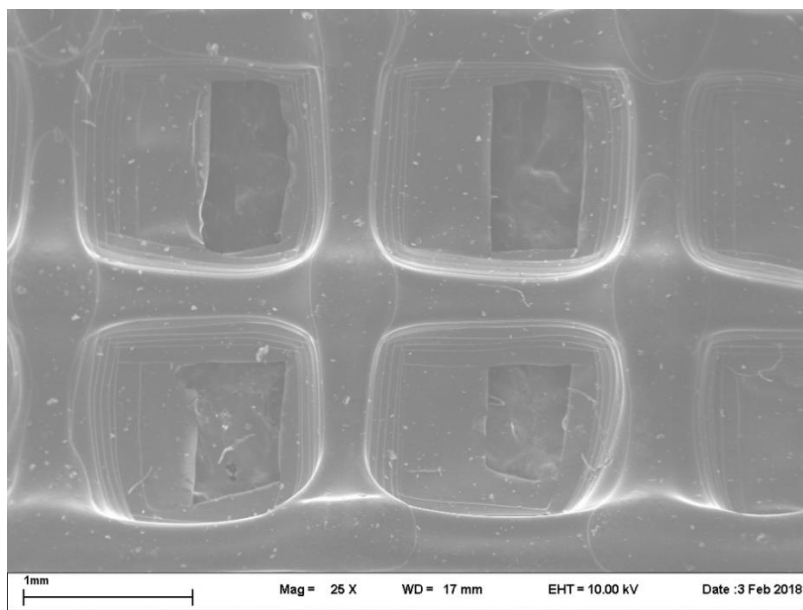


Рисунок 3.25. СЭМ изображение 7-слойного решётчатого скаффолда из мГК, напечатанного на экструзионном 3D принтере.

3.3.5.3. Экструзия полых композиций

В ходе работы была разработана методика формирования полых трубчатых скаффолдов за счёт экструзии из шприца вязкого раствора мГК в ванну с раствором фотоинициаторов (ФМН и ТЭОА) с их одновременным облучением (450 нм) (Схема 3.6.). Толщина стенок таких скаффолдов определяется диффузией фотоинициаторов и зависит от времени облучения и нахождения в растворе с фотоинициаторами. Разработанный способ также позволяет формировать трубчатые скаффолды с включёнными в них живыми клетками на стадии изготовления раствора мГК.

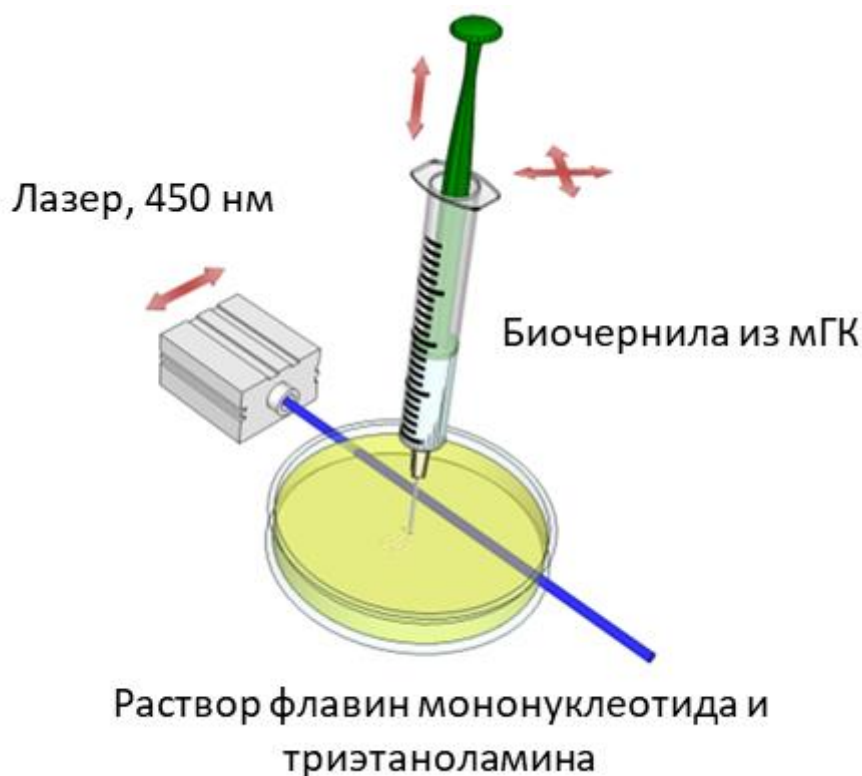


Схема 3.6. Схематичное изображение процесса получения полых трубчатых скаффолдов [126].

Полые структуры формируются за счёт диффузии формирующихся под действием лазерного облучения радикалов вглубь ФОК, запуская процесс сшивания с поверхности внутрь. Сами ФОК при этом не содержали фотоинициаторы. После извлечения скаффолда из раствора несшитая композиция удаляется, оставляя после себя полую трубчатую структуру (Рис. 3.26.). Такие скаффолды были использованы для отработки новой методики, а также для исследования жизнеспособности включенных в них клеток на примере культуры HaCaT (кератиноциты). Также, как и в случае 3D-печати, вязкость является ключевым параметром для изготовления скаффолдов. Проникновение радикалов в ФОК и реакция сшивки должны происходить до того, как ФОК после экструзии растворится в водном растворе. Для удовлетворения этого условия динамическая вязкость ФОК должна быть выше 40000 мПа·с. Была выбрана мГК с СЗ 46% с вязкостью ФОК на ее основе ~90000 мПа·с. Время облучения и, следовательно, глубина проникновения радикалов определяет толщину сшитого гидрогеля. Было определено, что при увеличении времени облучения с 3 минут до 4,5 минут средняя толщина трубочек увеличилась с 330 мкм до 380 мкм, а увеличение времени облучения до 15 минут приводило к формированию сплошной структуры.

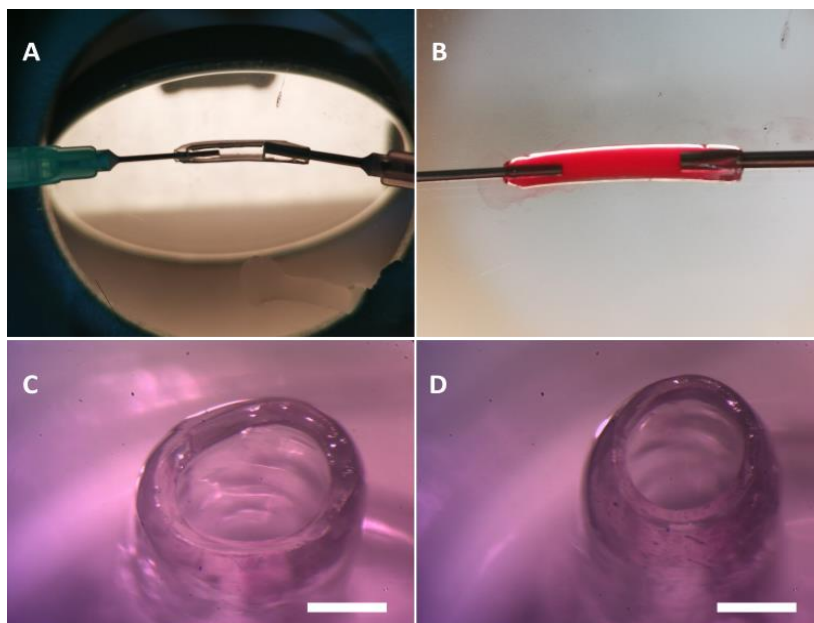


Рисунок 3.26. Фотографии полых трубчатых скаффолдов: А,В) при пропускании окрашенной жидкости; С,Д) поперечный срез. Масштабная линейка 1 мм.

Таким образом, разработана методика получения полых трубчатых скаффолдов, толщина стенок которых зависит от времени экспонирования. [126].

3.3.6. Влияние СЗ на свойства растворов мГК и скаффолдов на её основе

3.3.6.1. Влияние СЗ на вязкость растворов и композиций мГК.

Важной характеристикой мГК является вязкость ее растворов, которая оказывает значительное влияние на подвижность радикалов при проведении реакции фотоиндуцируемой сшивки, а также на параметры 3D-печати скаффолдов на её основе. кинематическую вязкость разбавленных растворов мГК (0,5 масс.%) в зависимости от СЗ (Рис. 3.27.) измеряли методом капиллярной вискозиметрии.

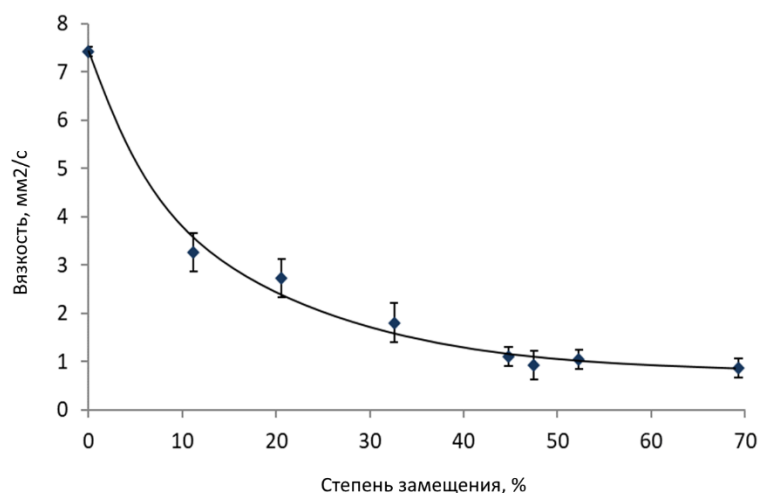


Рисунок 3.27. Зависимость кинематической вязкости водных растворов мГК (0,5 масс.%) от СЗ.

Значительное снижение вязкости при повышении СЗ скорее всего связано с замещением карбоксильных групп ГК и, соответственно, уменьшением заряженных групп, а также может являться следствием увеличения количества гидрофобных звеньев ГМА. В результате происходит снижение числа водородных связей, что в свою очередь приводит к уменьшению гидратных оболочек молекул ГК и снижению межмолекулярного трения. Данная тенденция значительного уменьшения вязкости при повышении СЗ, полученная для разбавленных растворов мГК, сохраняется и для динамической вязкости ФОК, содержащих 20 масс.% мГК и 5 масс.% ПЭГДА (Рис. 3.28.), используемых для получения сшитых гидрогелей на основе мГК.

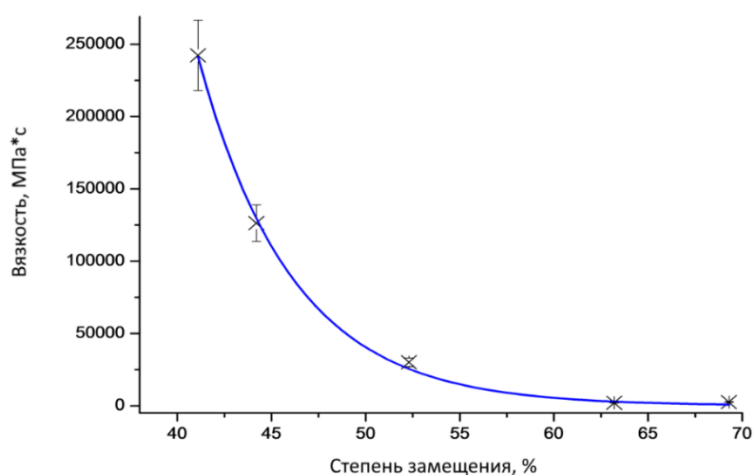


Рисунок 3.28. Зависимость динамической вязкости ФОК от СЗ.

Данная характеристика оказывает большое влияние на параметры 3D-печати. Определено, что для экструзионной 3D-печати оптимальным диапазоном СЗ мГК является 30–55%, что соответствует вязкости, необходимой для получения скаффолдов с требуемыми свойствами. При СЗ < 30% высокая вязкость образцов затрудняет экструзию и не позволяет получать скаффолды требуемой степени сшивки. При СЗ > 55% невозможно получить образцы, сохраняющие форму при экструзии. В качестве оптимального варианта СЗ для экструзии была выбрана мГК с содержанием винильных групп 40-46%; на ее основе были получены ФОК для экструзионной 3D-печати, как описано в работе [170] и для получения полых структур методом экструзии в раствор с фотоинициаторами.

3.3.6.2. Влияние СЗ на степень ферментативной деградации

Для оценки влияния содержания привитых винильных групп на степень ферментативной деградации растворов мГК и гидрогелей на основе сшитого мГК при обработке эндогенным ферментом гиалуронидазой была проведена реакция Моргана-Эльсона. В этой реакции реагент ДМАБ образует окрашенный в вишнёвый цвет продукт с восстанавливающим концом N-ацетиламиносахаридов, в данном случае, с восстанавливающими концами N-ацетилглюкозамина, образующимися при расщеплении ферментом [171]. Проведённые исследования показали снижение степени деградации 4% растворов мГК с 56% до 27% при увеличении СЗ с 0% (немодифицированная ГК) до 69%. Аналогичная зависимость наблюдалась и для сшитых гидрогелей мГК (Рис. 3.29.).

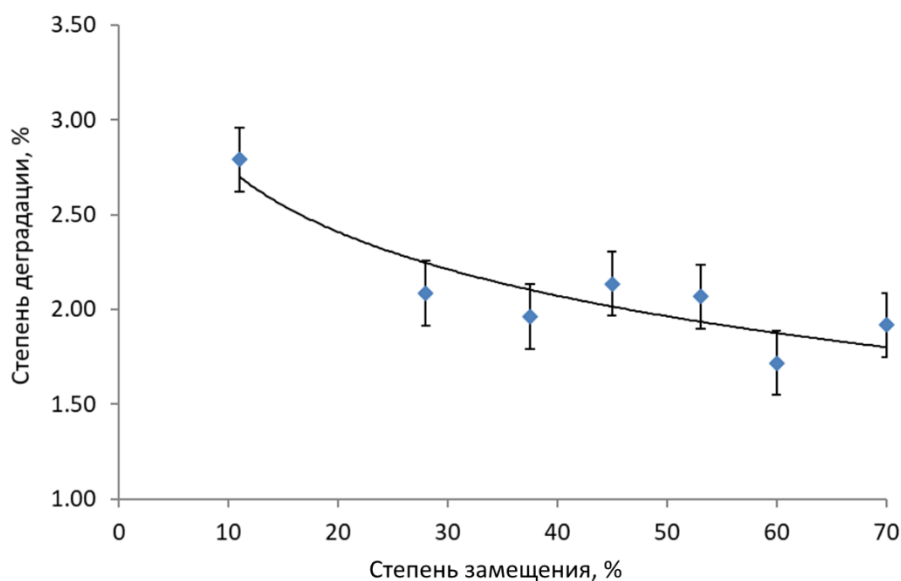


Рисунок 3.29. Зависимость степени ферментативной деградации от СЗ мГК в фотосшитых гидрогелях на её основе.

Подобное падение степени замещения даже до проведения реакции фотоиндуцируемой сшивки можно объяснить стерическими затруднениями, возникающими у фермента гиалуронидазы при присоединении к субстрату, а в случае сшитых гидрогелей к такому стерическому затруднению добавляются ещё и связи, образованные при раскрытии двойной связи, которые не только мешают образованию фермент-субстратного комплекса, но и не дают гиалуронидазе диффундировать в гидрогель. Такие затруднения за счёт привитых винильных групп могут привести к увеличению времени жизни скаффолдов на основе мГК внутри организма. Таким образом, вариация СЗ, как и время облучения лазером, также позволяет контролировать их биодеградацию во времени.

3.3.6.3. Влияние СЗ на механические характеристики сшитых мГК гидрогелей

Для оценки влияния СЗ на модуль Юнга и коэффициент набухаемости скаффолдов на основе мГК были изготовлены цилиндрические гидрогелевые образцы из ФОК с использованием формы. Для измерения модуля Юнга образцы сдавливали на испытательной машине для компрессионного формования. Компрессионный модуль Юнга ожидаемо увеличивается с увеличением СЗ, резко возрастая после СЗ 46% почти до 2 МПа (Рис. 3.30.).

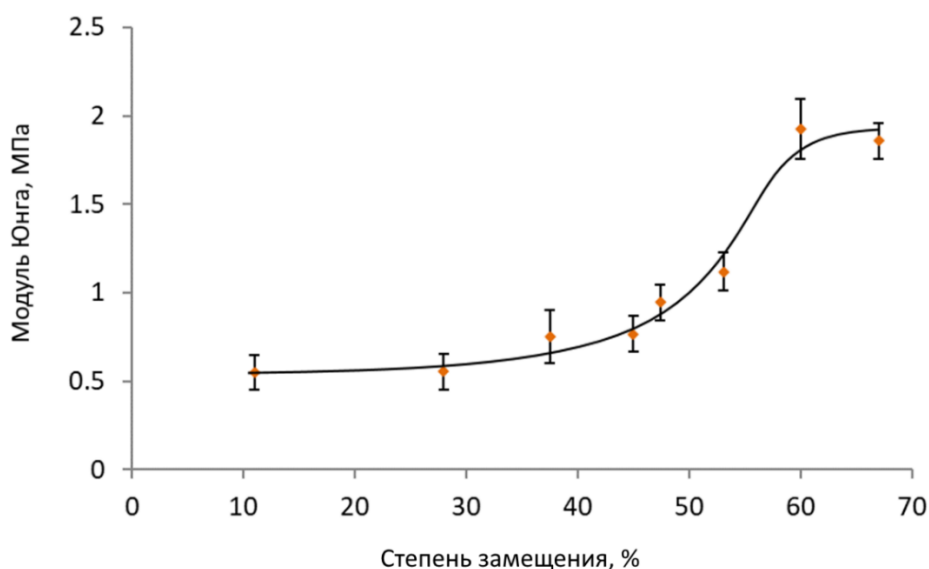


Рисунок 3.30. Зависимость компрессионного модуля Юнга от СЗ мГК в фотосшитых гидрогелях на её основе.

Гидрогели из мГК с СЗ 46% показали модуль Юнга равный $0,8 \pm 0,15$ МПа. Такое значение попадает в диапазон модулей Юнга мягких тканей в физиологических условиях, включая кровеносные сосуды (0,701-10,7 МПа), что является перспективным для их имитации. Такие же гидрогелевые образцы использовали для изучения коэффициента набухания (SWR) в дистиллированной воде. Наблюдается схожий с вязкостью характер зависимости SWR от СЗ: резкое падение с 2000% до почти 500% (Рис. 3.31.). Следует отметить, что при использовании мГК с СЗ > 60% SWR настолько снижается, что в этом случае скаффолды могут быть получены без участия ПЭГДА. Тем не менее, использование ПЭГДА является предпочтительным, так как участие этого олигомера позволяет регулировать и усиливать механические характеристики гидрогелевых скаффолдов. Например, модуль Юнга возрастал в 6 раз по сравнению со скаффолдами, не содержащими ПЭГДА. Увеличение содержания ПЭГДА с 5% до 15% не показало никакой видимой цитотоксичности или гемолитической активности.

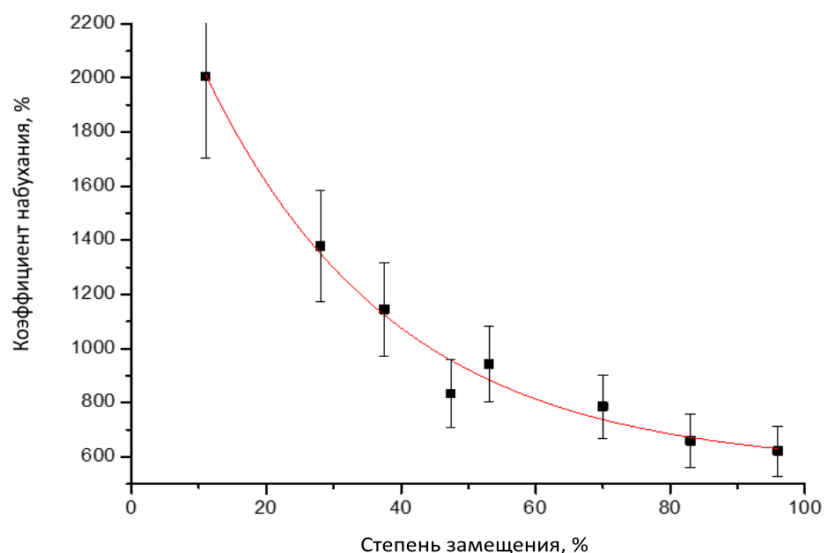


Рисунок 3.31. Зависимость SWR от СЗ мГК в фотосшитых гидрогелях на её основе.

3.3.7. *In vitro* результаты

3.3.7.1. *In vitro* исследование скаффолдов, полученных методом экструзионной 3D-печати

7-слойные решетчатые скаффолды, полученные методом экструзионной 3D-печати, были проинкубированы с культурой фибробластов человека Vj-5ta в течение 14 суток. На 7-е и 14-е сутки был проведен МТТ-тест. Он показал не только отсутствие цитотоксичности, но и значительный прирост количества клеток на поверхности скаффолда во времени (Рис. 3.32.).

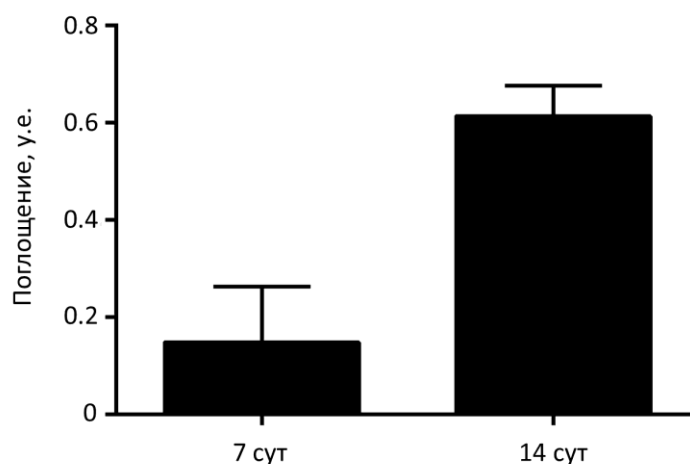


Рисунок 3.32. Рост иммортализованных фибробластов человека Vj-5ta на поверхности скаффолдов. Представлены результаты 5 измерений МТТ-теста.

Как видно (Рис. 3.33.), прикрепление клеток к решётчатым скаффолдам происходит неравномерно, как правило – в виде клеточных агрегатов в узлах решетки, что согласуется

с данными о слабой адгезии клеток к немодифицированной ГК [172]. Однако за 14 суток клетки способны колонизировать на поверхности скаффолдов не только на узлах, но и на балках решетки. Данные микроскопии и МТТ-теста показывают отсутствие цитотоксичности, умеренную адгезию клеток к поверхности скаффолдов и рост клеток в течение 14 суток инкубирования. Адгезия клеток к поверхности скаффолдов может быть повышена за счет ее покрытия другими биосовместимыми веществами, формирующими полиэлектrolитный комплекс с ГК, например, коллагеном, хитозаном или поли-*L*-лизинном.

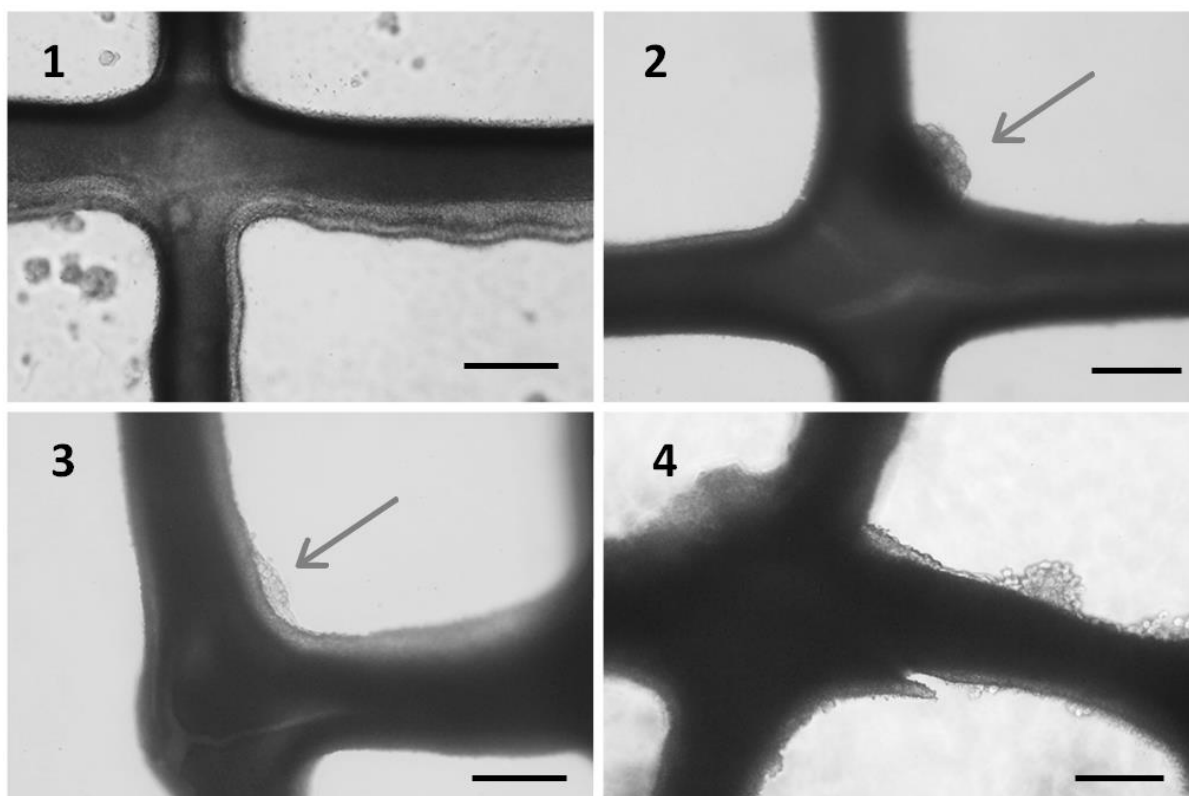


Рисунок 3.33. Изображения, полученные при оптической микроскопии решётчатых скаффолдов с культурой фибробластов Vj-5ta в течение 1) 1 суток, 2) 6 суток, 3) 9 суток и 4) 14 суток. Стрелками указаны клеточные агрегаты. Масштабная линейка 300 мкм. [132]

3.3.7.2. *In vitro* исследование полых трубчатых скаффолдов

Разработанный способ формирования полых трубчатых скаффолдов посредством экструзии вязкого раствора мГК в ванну с фотоинициаторами, также позволяет включать в скаффолд живые клетки на стадии изготовления раствора мГК. Для исследования жизнеспособности клеток после всех этапов формирования трубчатых скаффолдов использовалась культура клеток кератиноцитов человека HaCaT. Культура клеток HaCaT показала отличную выживаемость и квазигомогенное распределение внутри стенок трубчатых скаффолдов. На изображениях, полученных с помощью конфокальной микроскопии, наблюдается флуоресценция кальцеина AM, свидетельствующая о высокой

жизнеспособности клеток (Рис. 3.34). Это говорит не только о комфортном для клеток микроокружении сшитого гидрогеля, но и о том, что клетки по большей части не повреждаются при фотоотверждении. Предположительно, потенциально цитотоксические радикалы не успевают повреждать клетки, поскольку происходит дезактивация радикалов инициатора при взаимодействии с винильными группами мГК. Разработка простой методики изготовления полых структур с регулируемым внутренним/внешним диаметром, длиной и толщиной стенки, в которую инкорпорированы живые клетки, открывает возможность создания скаффолдов, имитирующих кровеносные сосуды или желчные протоки.

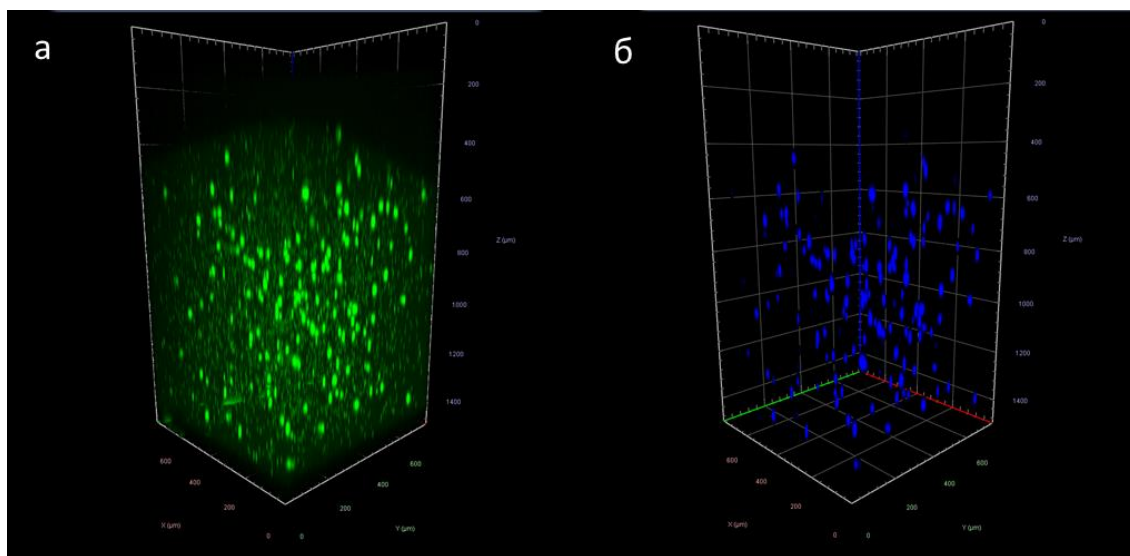


Рисунок 3.34. Конфокальная микроскопия трубчатых скаффолдов с включенными живыми клетками NaCaT после 6 дней инкубации, полученная Z-наложением фотографий и окрашенная: а) Кальцеином АМ; б) Hoechst 33342.

3.3.8. *In vivo* эксперименты

3.3.8.1. *In vivo* эксперименты гидрогелей, полученных методом отливки в формы

Скаффолды, полученные методом отливки в формы на основе мГК с СЗ 40%, имплантировали подкожно на дорсальной части мышей на 2 и 4 недели. Гистологический анализ этих гидрогелевых образцов показал умеренную инфильтрацию лимфоцитов, гранулоцитов и макрофагов через 2 недели после имплантации, что говорит о наличии слабой воспалительной реакции, и формирование слоя грануляционной ткани вокруг скаффолда (Рис. 3.35. а). Фрагменты скаффолда, отделённые от основной массы, подвергались резорбции макрофагами. Через 4 недели после имплантации мелкие фрагменты уже не наблюдались, при этом вокруг скаффолда сформировалась тонкая зрелая

соединительно-тканная капсула (Рис. 3.35. б). Никаких признаков рубцевания найдено не было. Фибробласты и новые сформированные капилляры не проникали в скаффолд.

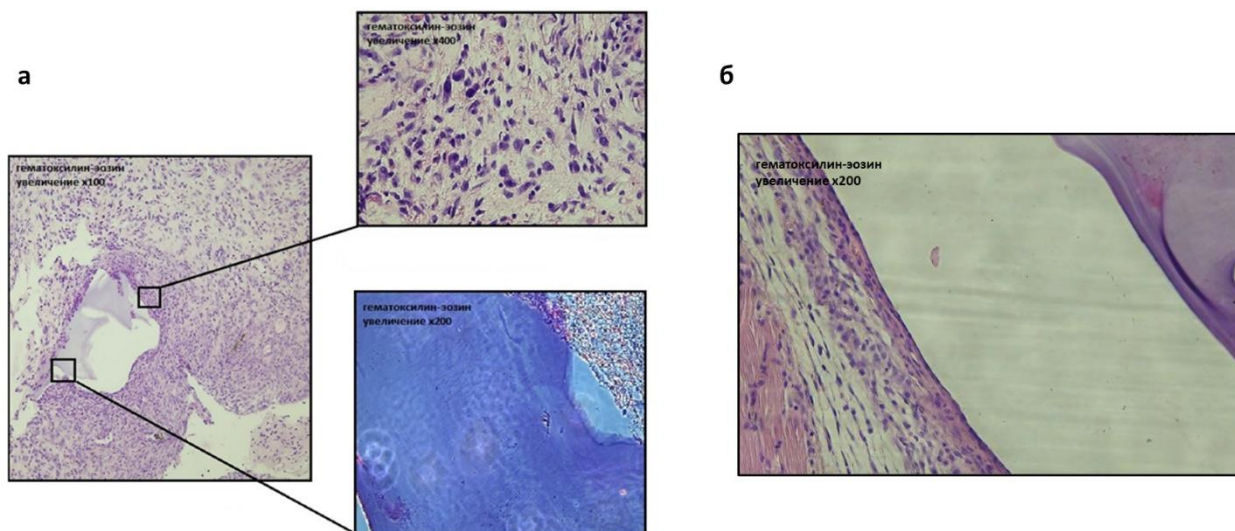


Рисунок 3.35. Гистологические срезы подкожно имплантированных мГК гидрогелей с окружающими их тканями. а) Срез через 2 недели после имплантации, на верхней вставке продемонстрирована макрофагальная резорбция имплантированного материала, на нижней вставке показана окраска скаффолда в базофильный (синий) цвет. б) Срез через 4 недели после имплантации.

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

3.3.8.2. Изучение влияние скаффолдов на модель ЧМТ мышей

Исследования влияния скаффолдов на основе мГК на модель черепно-мозговой травмы (ЧМТ) мышей проводили совместно с коллегами из Института биологии и биомедицины Национального исследовательского Нижегородского государственного университета имени Н. И. Лобачевского.

Скаффолды, не содержащие и содержащие нейротрофические факторы мозга, использовали для изучения влияния трансплантации скаффолда и воздействия нейротрофических факторов на функционирование центральной нервной системы (ЦНС) после ЧМТ у мышей. Согласно оценке неврологического статуса, ЧМТ приводит к развитию тяжёлого неврологического дефицита, что выражалось в расстройстве хватательных и защитных рефлексов у испытуемых животных. Трансплантация как пустых скаффолдов, так и гидрогелей с нейротрофическими факторами достоверно снижала

развитие неврологического дефицита у животных с ЧМТ на 21-ый день эксперимента (Рис. 3.36 а). Несмотря на снижение неврологического дефицита имплантация скаффолдов негативно сказывалась на способности мышей к обучению: на 5-ой обучающей сессии мыши с пустыми скаффолдами и со скаффолдами, содержащими BDNF, продемонстрировали гораздо более длительное время поиска платформы в тесте Морриса, чем мыши с ЧМТ без скаффолда (Рис. 3.36 б). Это может быть связано с развитием воспаления и отёка, давящего на ткани мозга. При этом, животные, содержащие скаффолды с GDNF показали результаты лучше, чем у интактной группы мышей. Это скорее всего связано с тем, что в отличие от BDNF, который стимулирует рост и регенерацию отростков нейронов, GDNF также ещё и усиливает функциональную активность нейрон-глиальной сети [173–175].

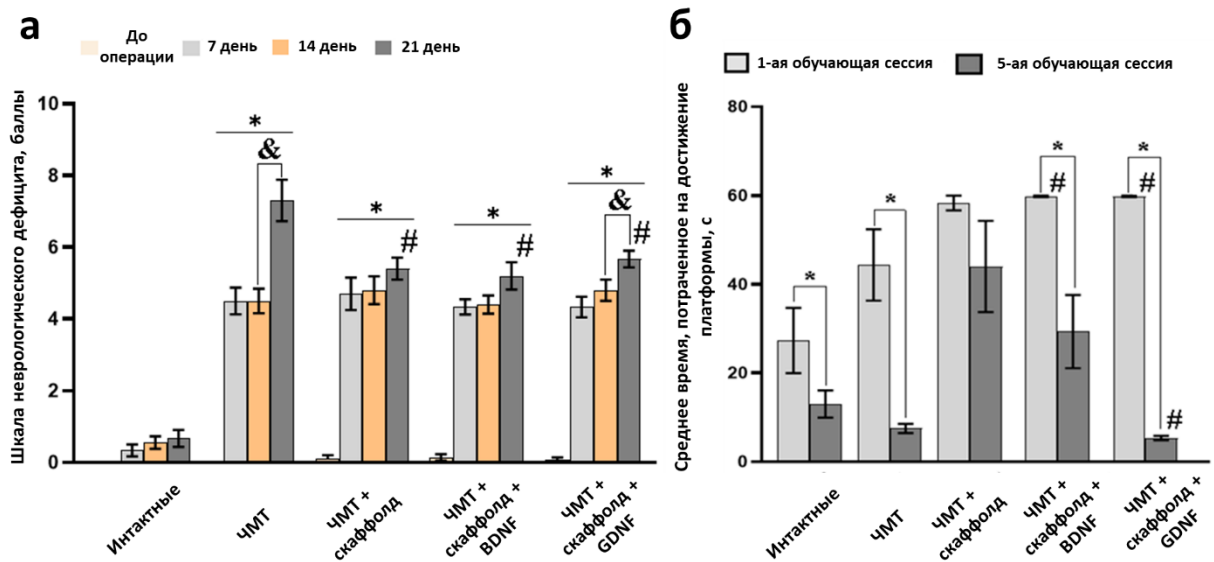


Рисунок 3.36. а) Оценка неврологического статуса мышей после ЧМТ с последующей трансплантацией скаффолдов; * - по отношению к интактным, # - по отношению к ЧМТ, & - по отношению к 14-ому дню, $p < 0,05$. б) Анализ обучающей способности мышей в тесте Морриса (водный лабиринт) после ЧМТ с последующей трансплантацией скаффолдов; * - по отношению к 1-ой обучающей сессии, # - по отношению к интактным, & - по отношению к ЧМТ, $p < 0,05$, тест Манна-Уитни.

Гистологический анализ подтвердил значительные изменения в морфологии коры головного мозга в посттравматический период (Рис. 3.37.). Через 2 недели после травмы у мышей с ЧМТ можно наблюдать массивный отёк, значительные области некроза и апоптотические элементы нервных клеток. Через месяц эксперимента всё ещё можно

наблюдать обширный отёк и формирование неструктурированных тканей на месте повреждения.

В группе “ЧМТ + скаффолд” была выявлена слабо выраженная положительная динамика. На 14-ый день после трансплантации мГК скаффолда наблюдается отёчность, разрастание нервной ткани и слабое кровоизлияние. Спустя 21 день после трансплантации присутствуют зоны регенерации, при этом происходит лизис глубоких слоёв тканей и усиление отёчности. Спустя месяц после имплантации ткань вокруг скаффолда характеризуется многочисленными агрегатами микроглии и содержанием клеток крови. Скаффолды претерпели структурные изменения и потерю своих механических характеристик.

В группе “ЧМТ + скаффолд + BDNF” воспалительная реакция была выражена меньше на 7-ой день после трансплантации, чем в группе “ЧМТ”. Отёк и очаги разрастания тканей присутствовали на всём протяжении эксперимента. Тем не менее, активная регенерация нейронов и гиперволемиа были обнаружены на 14-ый день эксперимента. Развитие отёка тканей привело к снижению количества новых нейронов и увеличению количества апоптотических и некротических фрагментов на 21-день после трансплантации. После 6 месяцев структура тканей стала гетерогенной, однако при этом отёчность и разрастание тканей уменьшились. Значительное утолщение стенок маленьких кровеносных сосудов указывает на активные процессы регенерации.

В группе “ЧМТ + скаффолд + GDNF” также, как и в “ЧМТ + скаффолд + BDNF”, на 7-ой день наблюдались отёк и разрастание тканей, однако одновременно с этим можно было наблюдать группы новых нейронов и значительную гиперволемию. Отёчность в поверхностных слоях коры головного мозга и очаги разрастания тканей сохранились на 14-ый день после трансплантации. На 21-ый день наблюдалась значительная гиперволемиа и активные процессы регенерации. Через 6 месяцев морфология тканей была сопоставима с группой “ЧМТ + скаффолд + BDNF”, однако в отличие от неё наблюдалось более активное формирование связей между нервными клетками и интенсивный рост отростков нейронов.

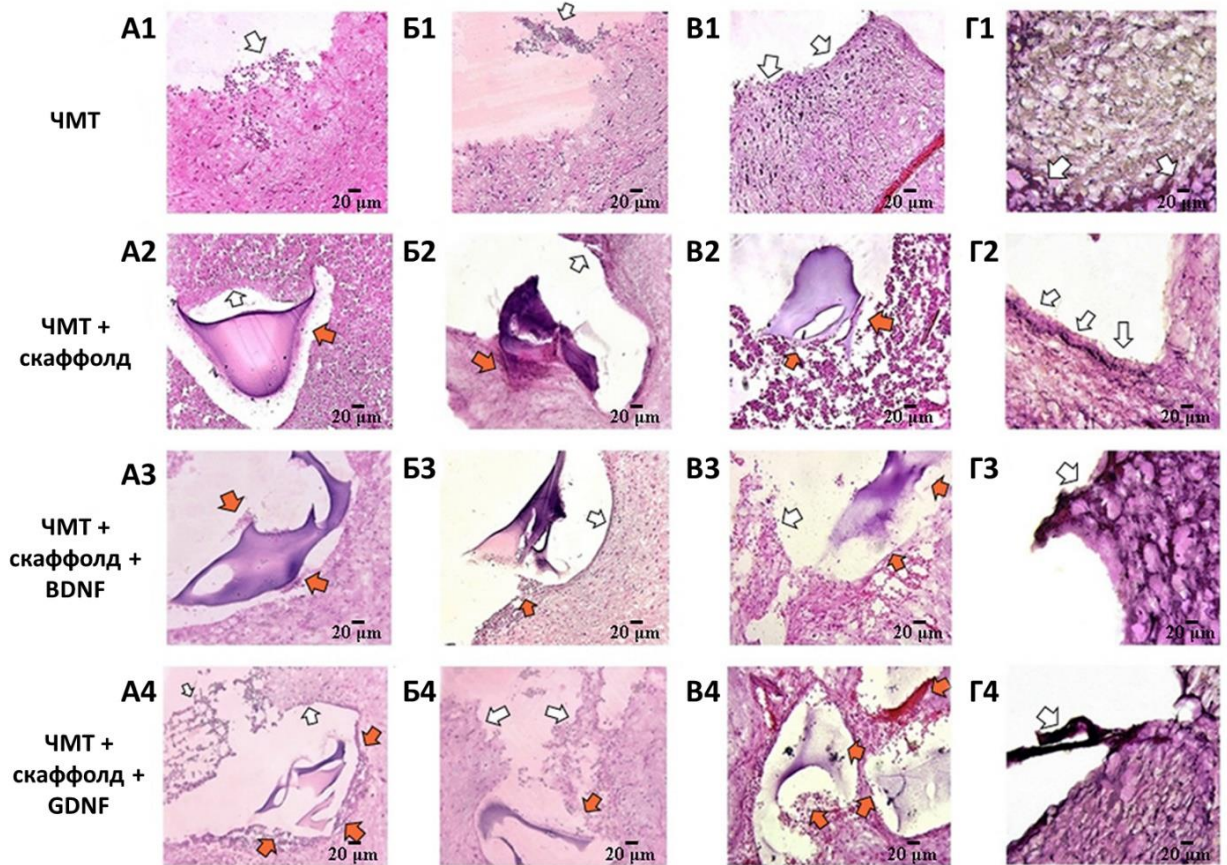


Рисунок 3.37. Гистологические срезы коры головного мозга мышей на 7-ой (столб А), 14-ый (столб Б), 21-ый (столб В) дни и через месяц (столб Г) после ЧМТ и трансплантации скаффолдов. Гематоксилин-эозиновое окрашивание, увеличение $\times 20$. Белые стрелки указывают на зоны разрастания ткани и признаки воспаления, оранжевые стрелки указывают на рост отростков нейронов в сторону скаффолдов.

Таким образом 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. Стоит отметить, что наиболее интенсивные регенеративные процессы, как и улучшение способности к обучению, наблюдались у животных с имплантированными скаффолдами, нагруженными GDNF.

3.3.8.3. Получение скаффолдов in situ фотоотверждением в окне прозрачности тканей организма.

Одним из перспективных направлений тканевой инженерии является адаптация методов биопечати в живом организме для получения скаффолдов *in situ* с контролируемой структурой и возможностью культивирования аутологических клеток на них. Современные методы полимеризации и сшивки в большинстве случаев позволяют только хирургическую имплантацию предварительно сформированных структур или образование структур *in situ* с неудовлетворительными свойствами. Фотоотверждение происходит в условиях организма, что существенно меняет условия и требования к используемым материалам и методам. Один из возможных подходов основан на сшивке термочувствительных композиций, однако такая технология неудобна на практике, так как может проходить в широком диапазоне температур (22–37 °С) и занимать от нескольких минут до нескольких часов. Образующиеся при этом неоднородности в составе скаффолда и плотности сшивки могут приводить к непредсказуемой и неоднородной деградации [176]. Большие возможности предоставляет проведение фотоиндуцируемых реакций под действием излучения красного диапазона спектра, который попадает в «окно прозрачности» тканей организма (600-1300 нм) и глубоко проникает в нее.

В данной работе продемонстрирована возможность внедрения малоинвазивной технологии, основанной на фотоиндуцированном формировании гидрогелевых структур *in situ*. В связи с этим, стояла задача исследования процесса фотосшивки *in situ*, которая включала подбор состава ФОК, условий ее введения и фотоотверждения в глубине ткани под действием видимого света. Кроме того, выбранный инициатор выступал в качестве визуализирующей метки для детекции скаффолда в животном. Для реализации этого процесса был выбран фотоинициатор II типа водорастворимый пиридин-замещенный фталоцианин, имеющий пик поглощения в диапазоне 590-740 нм (Рис. 3.37. а,б).

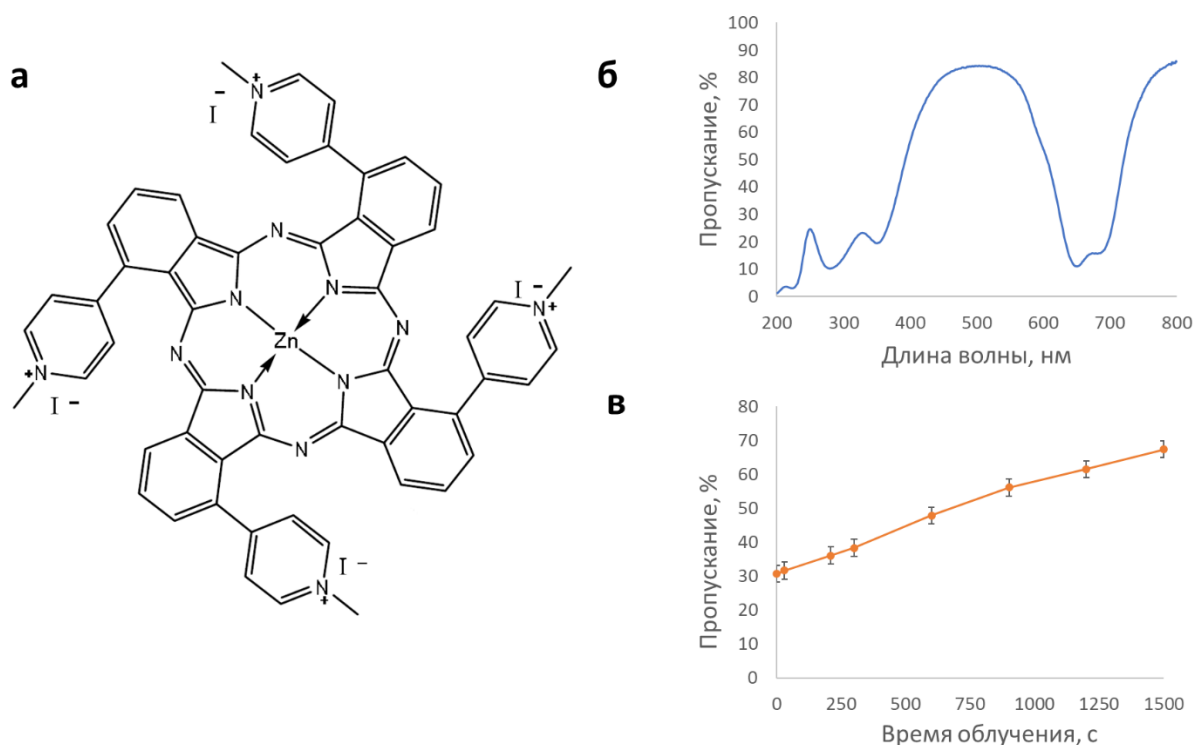


Рисунок 3.37. а) Формула водорастворимого пиридин-замещённого фталоцианина [123] и б) спектр пропускания его водного раствора (0,1 мг/мл). в) Фотообесцвечивание раствора ДФПГ в присутствии водорастворимого фталоцианина при облучении светом на 670 нм.

Как и многие другие макроциклические соединения (порфирины и фталоцианины) выбранное для работы водорастворимое производное фталоцианина обладает выраженной световой цитотоксичностью за счёт генерации АФК при облучении. Схема генерации кислородных радикалов, таких как супероксид анион радикал, гидроперекись и гидроксил-анион радикал, отвечающий за активацию гомолитического распада двойной связи, для данного инициатора аналогична ФМН при возбуждении светом из красной области спектра 670 нм, попадающим в окно прозрачности тканей (Схема 3.7.) [177,178]. Кроме того, при использовании фталоцианина происходит генерация синглетного кислорода, который вызывает гибель клеток в злокачественных новообразованиях, что определяет использование фталоцианина в фотодинамической терапии.

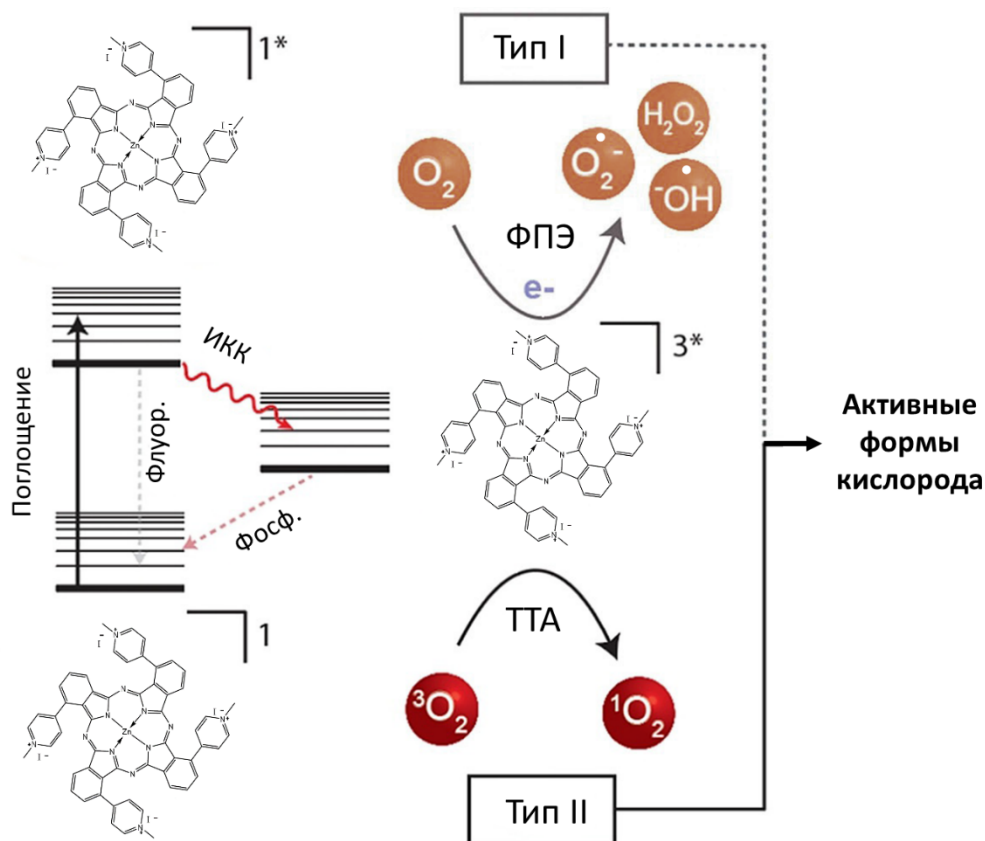


Схема 3.7. Схематическое изображение генерации АФК при облучении фталоцианина по типу I и II. ИКК – интеркомбинационное рассеяние, ФПЭ – фотоиндуцированный перенос энергии/электрона, ТТА – переход кислорода из триплетного в синглетное состояние. [178]

Поскольку АФК расходуются в ходе фотоотверждения композиций мГК, которая таким образом играет роль фотопротектора клеток и тканей, было важно выяснить темновую цитотоксичность данного соединения. МТТ тесты показали, что граничной концентрацией, после которой происходит практически полная гибель клеток фибробластов человека Vj-5ta, является 200 мкМ. Несмотря на то, что в *in vitro* тестах такое содержание водорастворимого фталоцианина является неблагоприятным для клеток, для получения *in situ* отверждаемых ФОК использовалась именно эта концентрация, поскольку в ходе облучения происходит обесцвечивание и деактивация фотоинициатора, делая его более безопасным для клеток.

Из литературы известно, что при облучении светом соединений порфиринового ряда [178] преобладает направление реакции по II пути с образованием синглетного кислорода, однако тест с ДФПГ показал, что облучение в присутствии водорастворимого фталоцианина приводит к обесцвечиванию стабильного радикала ДФПГ, что даёт основание полагать, что реализуется также I путь с образованием кислородных радикалов

(Рис. 3.37. в). Эти результаты позволили использовать данный фталоцианин для проведения фотоиндуцированной реакции сшивки.

Гидрогели формировали при подкожном введении ФОК с помощью шприца, и облучении светом в течение 40 мин (Рис. 3.38). Повреждений ткани в области введения и изменений в жизнедеятельности мышей не зарегистрировано. Через сутки после эксперимента фотоотверждённый гидрогель извлекали из мыши. Гидрогель представлял собой твердый объект, имеющий форму, соответствующую области сканирования лазерным лучом без каких-либо включений жидкости в объеме.

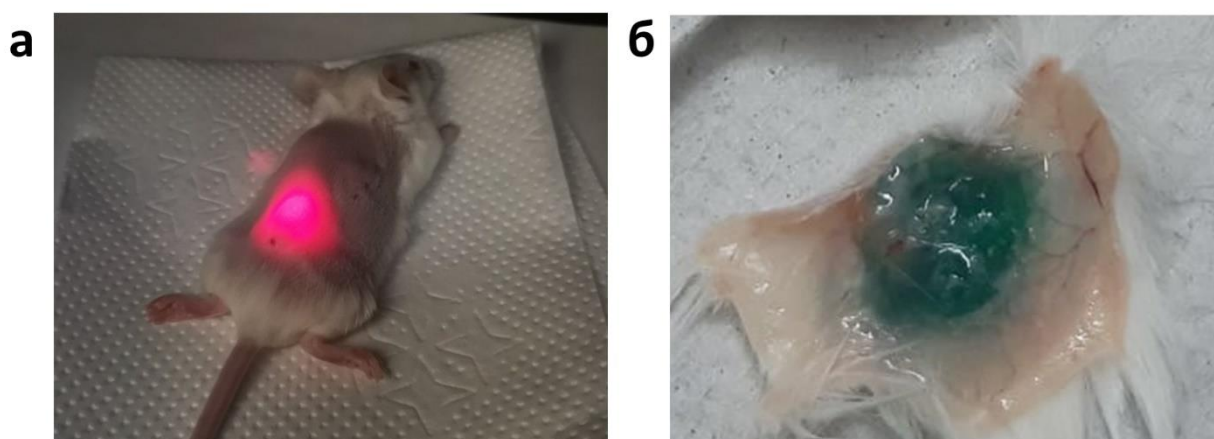


Рисунок 3.38. а) Фотоотверждение введённой под кожу ФОК лазерным излучением на длине волны 670 нм; б) Фотография сшитого скаффолда, извлечённого через сутки после фотоотверждения, $d = 9$ мм.

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 пиридин-замещённого фталоцианина (длина волны возбуждения 640 нм). Через месяц после начала эксперимента скаффолд сохранил свою целостность, но его местоположение изменилось: произошло смещение от точки инъекции (Рис. 3.39. ROI 1) ближе к хвосту (Рис. 3.39. ROI 4). Вероятно, это связано с подвижностью животного и началом процесса деградации, что требует дальнейшего подробного исследования.

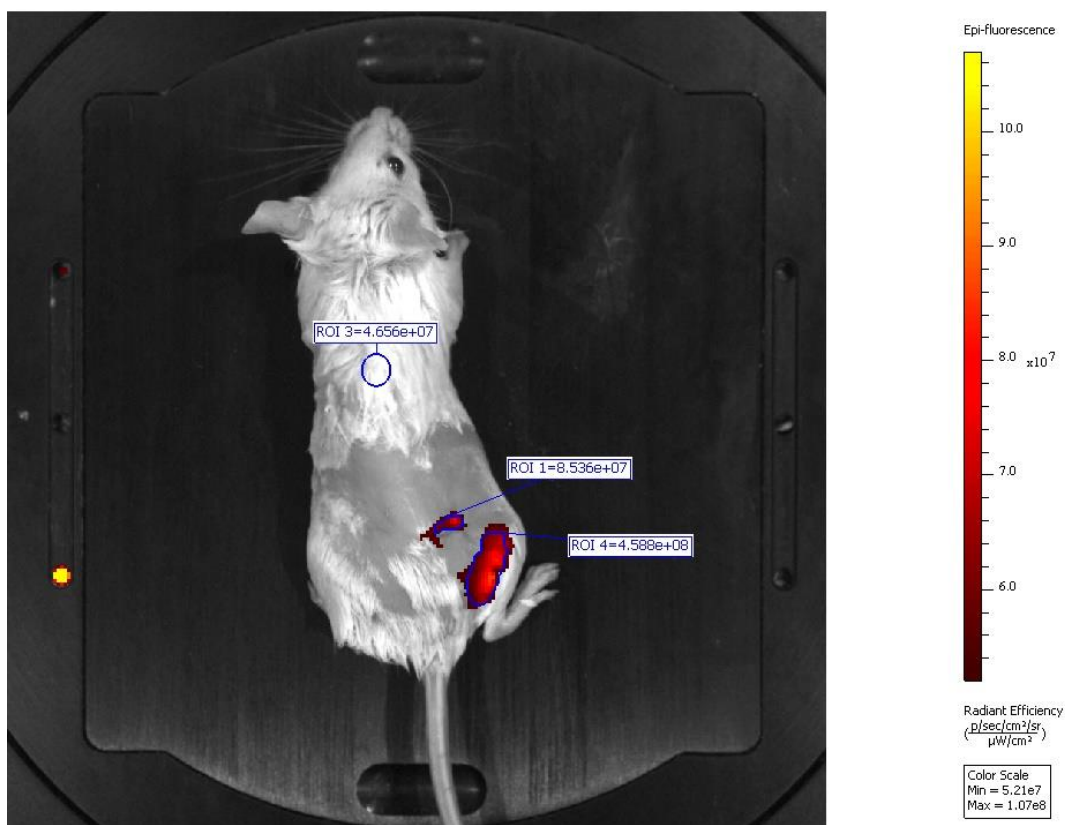


Рисунок 3.39. Визуализация скаффолда через месяц после начала эксперимента с использованием доклинической системы *in vivo* визуализации IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer, США).

Таким образом, проведена успешная фотосшивка в условиях тканей организма, которая оказывает существенное влияние на условия и 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» (670 нм).

Глава 4. 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 введенных винильных групп (степень замещения), которая 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 флавинмононуклеотида, позволяет получать скаффолды различной архитектуры (матрицы, решетки, полые 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).

Благодарности

Данная диссертационная работа представляет собой результат коллективного труда, и я хочу поблагодарить всех, кто в ней принимал участие. Прежде всего, искренне благодарю научного руководителя д.х.н. Генералову А.Н. и профессора д.х.н. Зубова В.П. за многолетнее плодотворное руководство данной работой. Выражаю искреннюю признательность и благодарность за творческое наполнение работы, неоценимую помощь в обсуждении планов и выполнении работы руководителю лаборатории лазерной биомедицины, ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН д.ф.-м.н. Хайдукову Е.В.. Особую благодарность хочу выразить к.х.н. Вихрову А.А. за плодотворное руководство, развитие научных идей и активное участие в работе над хитозановыми гидрогелями.

Выражаю искреннюю признательность всем сотрудникам ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, которые принимали самое активное участие в работе: Савельеву А.Г. за неоценимый вклад в работу над скаффолдами из гиалуроновой кислоты, Архаровой Н.А. за электронную микроскопию образцов, Бородине Т.Н. за помощь в выполнении работы по ферментативной деградации, Миронову А.В. за проведение 3D-печати, Клечковской В.В. за консультации касательно рентгенофазового анализа, Молчановой С.И. за решение административных вопросов. Также хочется поблагодарить всех сотрудников коллектива, с которыми выполнялись отдельные эксперименты или обсуждения работы.

Хочу поблагодарить профессора д.х.н. Горина Д.А. за работу на системе IVIS (Сколковский институт науки и технологии), сотрудников ИФХЭ РАН за работу над хитозановыми гидрогелями с направленными каналами и сотрудников из ННГУ им. Н.И. Лобачевского за работу над имплантацией скаффолдов на основе модифицированной гиалуроновой кислоты в мозговые ткани мышей. Отдельная благодарность Акасову Р.А. (ИБХ РАН) и Шолиной Н.В. (РОИЦ им. Блохина) за проведение экспериментов на клеточных культурах и животных.

Выражаю искреннюю признательность всем сотрудникам лаборатории полимеров для биологии за многолетнее плодотворное сотрудничество и приятный коллектив, позволивший выполнить представленную работу: Капустина Д.В., Жигис Л.С., Зуеву В.С., Разгуляеву О.А., Ягодаеву Е.Ю. Огромная благодарность Дёминой П.А. за активные обсуждения работ и неоценимую поддержку. Отдельную благодарность выражаю Простяковой А.И. за помощь в работе над механическими тестами хитозановых гидрогелей. Хочется также поблагодарить Решетова П.Д., благодаря которому я начала свою работу в лаборатории полимеров для биологии. Также выражаю благодарность Сизовой С.В. (ИБХ РАН) за помощь при работе с ИК-спектрометром.

Сердечно благодарю своих родных и близких, поддерживавших меня при выполнении этой работы.

Список использованной литературы

1. Wilmut I., Sullivan G., Chambers I. The evolving biology of cell reprogramming // *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2011. Vol. 366, № 1575. P. 2183–2197.
2. Mason C., Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine // *Regen. Med.* 2008. Vol. 3, № 1. P. 1–5.
3. Howard D. et al. Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds // *J. Anat.* 2008. Vol. 213, № 1. P. 66–72.
4. Pereira R.F., Bártolo P.J. 3D Photo-Fabrication for Tissue Engineering and Drug Delivery // *Engineering*. 2015. Vol. 1, № 1. P. 090–112.
5. Guyette J.P. et al. Bioengineering Human Myocardium on Native Extracellular Matrix Novelty and Significance // *Circ. Res.* 2016. Vol. 118, № 1. P. 56–72.
6. Ott H.C. et al. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung // *Nat. Med.* 2010. Vol. 16, № 8. P. 927–933.
7. Uygun B.E. et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix // *Nat. Med.* 2010. Vol. 16, № 7. P. 814–820.
8. Lu T.-Y. et al. Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells // *Nat. Commun.* 2013. Vol. 4.
9. Sullivan D.C. et al. Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system // *Biomaterials*. 2012. Vol. 33, № 31. P. 7756–7764.
10. Gershlak J.R. et al. Crossing kingdoms: Using decellularized plants as perfusable tissue engineering scaffolds // *Biomaterials*. 2017. Vol. 125. P. 13–22.
11. Deb P. et al. Scaffold Development Using Biomaterials: A Review // *Mater. Today Proc.* 2018. Vol. 5, № 5. P. 12909–12919.
12. Kundu J. et al. Biomaterials for Biofabrication of 3D Tissue Scaffolds // *Biofabrication*. Elsevier, 2013. P. 23–46.
13. Bliley J.M., Marra K.G. Polymeric Biomaterials as Tissue Scaffolds // *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*. Elsevier, 2015. P. 149–161.
14. McAvoy K., Jones D., Thakur R.R.S. Synthesis and Characterisation of Photocrosslinked poly(ethylene glycol) diacrylate Implants for Sustained Ocular Drug Delivery // *Pharm. Res.* 2018. Vol. 35, № 2. P. 36.
15. Kakinoki A. et al. Synthesis and Evaluation of Water-Soluble Poly(vinyl alcohol)–paclitaxel Conjugate as a Macromolecular Prodrug // *Biol. Pharm. Bull.* 2008. Vol. 31, № 5. P. 963–969.
16. Ye M., Mohanty P., Ghosh G. Morphology and properties of poly vinyl alcohol (PVA) scaffolds: Impact of process variables // *Mater. Sci. Eng. C*. 2014. Vol. 42. P. 289–294.
17. Roy N., Saha N. PVP-based hydrogels: Synthesis, properties and applications. *Hydrogels: Synthesis, Characterization and Applications*. // *Hydrogels: Synthesis, Characterization and Applications*. New York, NY: Nova Science Publishers, 2012. P. 227–252.
18. Xie B. et al. An injectable thermosensitive polymeric hydrogel for sustained release of Avastin®

- to treat posterior segment disease // *Int. J. Pharm.* 2015. Vol. 490, № 1–2. P. 375–383.
19. Cobb W.S., Kercher K.W., Heniford B.T. The Argument for Lightweight Polypropylene Mesh in Hernia Repair // *Surg. Innov.* 2005. Vol. 12, № 1. P. 63–69.
 20. Bertleff M.J.O.E., Meek M.F., Nicolai J.-P.A. A Prospective Clinical Evaluation of Biodegradable Neurolac Nerve Guides for Sensory Nerve Repair in the Hand // *J. Hand Surg. Am.* 2005. Vol. 30, № 3. P. 513–518.
 21. Shoulders M.D., Raines R.T. Collagen Structure and Stability // *Annu. Rev. Biochem.* 2009. Vol. 78, № 1. P. 929–958.
 22. Dutov P. et al. Measurement of Elastic Modulus of Collagen Type I Single Fiber // *PLoS One* / ed. Dague E. 2016. Vol. 11, № 1. P. e0145711.
 23. Buschmann J., Meier Bürgisser G. Collagen for tendon and ligament repair // *Biomechanics of Tendons and Ligaments*. Elsevier, 2017. P. 193–224.
 24. Wang B. et al. Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration // *Prog. Mater. Sci.* 2016. Vol. 76. P. 229–318.
 25. Lin C. et al. Keratin scaffolds with human adipose stem cells: Physical and biological effects toward wound healing // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2019. P. term.2855.
 26. Koh L.-D. et al. Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials // *Prog. Polym. Sci.* 2015. Vol. 46. P. 86–110.
 27. Lynn A.K., Yannas I.V., Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen // *J. Biomed. Mater. Res.* 2004. Vol. 71B, № 2. P. 343–354.
 28. Skjåk-Bræk G., Draget K.I. Alginates // *Polymer Science: A Comprehensive Reference*. Elsevier, 2012. P. 213–220.
 29. Venkatesan J. et al. Role of Alginate in Bone Tissue Engineering. 2014. P. 45–57.
 30. Rodríguez-Vázquez M. et al. Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine // *Biomed Res. Int.* 2015. Vol. 2015. P. 1–15.
 31. Bergonzi C. et al. Study of 3D-printed chitosan scaffold features after different post-printing gelation processes // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9, № 1. P. 362.
 32. Zhu Z. et al. Hyaluronic acid: a versatile biomaterial in tissue engineering // *Plast. Aesthetic Res.* 2017. Vol. 4, № 12. P. 219.
 33. Kim H. et al. Hyaluronate and its derivatives for customized biomedical applications // *Biomaterials*. 2017. Vol. 123. P. 155–171.
 34. Mohammadi F. et al. Hybrid Scaffolds of Hyaluronic Acid and Collagen Loaded with Prednisolone: an Interesting System for Osteoarthritis // *Adv. Pharm. Bull.* 2018. Vol. 8, № 1. P. 11–19.
 35. Guan Y. et al. Physically crosslinked silk fibroin/hyaluronic acid scaffolds // *Carbohydr. Polym.* 2020. Vol. 239. P. 116232.
 36. Fahmy A. et al. Poly(vinyl alcohol)-hyaluronic Acid Membranes for Wound Dressing Applications: Synthesis and in vitro Bio-Evaluations // *J. Braz. Chem. Soc.* 2015. Vol. 26, № 7. P.

- 1466–1474.
37. Baier Leach J. et al. Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: Natural, biodegradable tissue engineering scaffolds // *Biotechnol. Bioeng.* 2003. Vol. 82, № 5. P. 578–589.
 38. Bencherif S.A. et al. Influence of the degree of methacrylation on hyaluronic acid hydrogels properties // *Biomaterials.* 2008. Vol. 29, № 12. P. 1739–1749.
 39. Chandrasekharan A. et al. In situ photocrosslinkable hyaluronic acid-based surgical glue with tunable mechanical properties and high adhesive strength // *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 2019. Vol. 57, № 4. P. 522–530.
 40. Chamkouri H. A Review of Hydrogels, Their Properties and Applications in Medicine // *Am. J. Biomed. Sci. Res.* 2021. Vol. 11, № 6. P. 485–493.
 41. Ullah F. et al. Classification, processing and application of hydrogels: A review // *Mater. Sci. Eng. C.* 2015. Vol. 57. P. 414–433.
 42. Billiet T. et al. A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering // *Biomaterials.* 2012. Vol. 33, № 26. P. 6020–6041.
 43. Ahmed E.M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review // *J. Adv. Res.* 2015. Vol. 6, № 2. P. 105–121.
 44. Caló E., Khutoryanskiy V. V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products // *Eur. Polym. J.* 2015. Vol. 65. P. 252–267.
 45. Parhi R. Cross-Linked Hydrogel for Pharmaceutical Applications: A Review // *Adv. Pharm. Bull.* 2017. Vol. 7, № 4. P. 515–530.
 46. Emami Meybodi Z., Imani M., Atai M. Kinetics of dextran crosslinking by epichlorohydrin: A rheometry and equilibrium swelling study // *Carbohydr. Polym.* 2013. Vol. 92, № 2. P. 1792–1798.
 47. Yu Y. et al. Genipin-cross-linked hydrogels based on biomaterials for drug delivery: a review // *Biomater. Sci.* 2021. Vol. 9, № 5. P. 1583–1597.
 48. Migneault I. et al. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking // *Biotechniques.* 2004. Vol. 37, № 5. P. 790–802.
 49. Ramkumar S.C. et al. Polycarbodiimide and polyurethane cross-linkers for leather finishing // *Leather Footwear J.* 2017. Vol. 17, № 4. P. 181–192.
 50. Bax D. V. et al. Fundamental insight into the effect of carbodiimide crosslinking on cellular recognition of collagen-based scaffolds // *Acta Biomater.* 2017. Vol. 49. P. 218–234.
 51. Carbodiimide Crosslinker Chemistry [Electronic resource]. URL: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/carbodiimide-crosslinker-chemistry.html>.
 52. Oryan A. et al. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. Vol. 107. P. 678–688.

53. Xu L. et al. Chitosan in Molecularly-Imprinted Polymers: Current and Future Prospects // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Vol. 16, № 8. P. 18328–18347.
54. Yang G. et al. Enzymatically crosslinked gelatin hydrogel promotes the proliferation of adipose tissue-derived stromal cells // *PeerJ.* 2016. Vol. 4. P. e2497.
55. Lee F., Bae K.H., Kurisawa M. Injectable hydrogel systems crosslinked by horseradish peroxidase // *Biomed. Mater.* 2015. Vol. 11, № 1. P. 014101.
56. Nwe K., Brechbiel M.W. Growing Applications of “Click Chemistry” for Bioconjugation in Contemporary Biomedical Research // *Cancer Biother. Radiopharm.* 2009. Vol. 24, № 3. P. 289–302.
57. Nguyen K.T., West J.L. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications // *Biomaterials.* 2002. Vol. 23, № 22. P. 4307–4314.
58. Tomal W., Ortyl J. Water-Soluble Photoinitiators in Biomedical Applications // *Polymers (Basel).* 2020. Vol. 12, № 5. P. 1073.
59. Choe E., Huang R., Min D.B. Chemical Reactions and Stability of Riboflavin in Foods // *J. Food Sci.* 2005. Vol. 70, № 1. P. R28–R36.
60. Smith A.M., Mancini M.C., Nie S. Second window for in vivo imaging // *Nat. Nanotechnol.* 2009. Vol. 4, № 11. P. 710–711.
61. Breloy L. et al. Azacalixpyrins as an innovative alternative for the free-radical photopolymerization under visible and NIR irradiation without the need of co-initiators // *Chem. Commun.* 2021. Vol. 57, № 71. P. 8973–8976.
62. Noirbent G. et al. Metalated porphyrins as versatile visible light and NIR photoinitiators of polymerization // *Eur. Polym. J.* 2020. Vol. 139. P. 110019.
63. Lim K.S. et al. Fundamentals and Applications of Photo-Cross-Linking in Bioprinting // *Chem. Rev.* 2020. Vol. 120, № 19. P. 10662–10694.
64. Bagheri A., Jin J. Photopolymerization in 3D Printing // *ACS Appl. Polym. Mater.* 2019. Vol. 1, № 4. P. 593–611.
65. Chen K.-T. et al. Thiol–Ene Photopolymerization: Scaling Law and Analytical Formulas for Conversion Based on Kinetic Rate and Thiol–Ene Molar Ratio // *Polymers (Basel).* 2019. Vol. 11, № 10. P. 1640.
66. Stenzel M.H. Bioconjugation Using Thiols: Old Chemistry Rediscovered to Connect Polymers with Nature’s Building Blocks // *ACS Macro Lett.* 2013. Vol. 2, № 1. P. 14–18.
67. Ravve A. Photosensitizers and Photoinitiators // *Light-Associated Reactions of Synthetic Polymers.* New York, NY: Springer New York. P. 23–122.
68. Rodgers Z.L. et al. B₁₂-Mediated, Long Wavelength Photopolymerization of Hydrogels // *J. Am. Chem. Soc.* 2015. Vol. 137, № 9. P. 3372–3378.
69. Vieira de Souza T., Malmonge S.M., Santos A.R. Development of a chitosan and hyaluronic acid hydrogel with potential for bioprinting utilization: A preliminary study // *J. Biomater. Appl.* 2021. Vol. 36, № 2. P. 358–371.

70. Jiang X.-S., Mathew M.P., Du J. Polyelectrolyte Hydrogels: Thermodynamics. 2014. P. 183–214.
71. Ravishankar K., Dhamodharan R. Advances in chitosan-based hydrogels: Evolution from covalently crosslinked systems to ionotropically crosslinked superabsorbents // *React. Funct. Polym.* 2020. Vol. 149. P. 104517.
72. Rizwan M. et al. pH Sensitive Hydrogels in Drug Delivery: Brief History, Properties, Swelling, and Release Mechanism, Material Selection and Applications // *Polymers (Basel)*. 2017. Vol. 9, № 12. P. 137.
73. Klouda L., Mikos A.G. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008. Vol. 68, № 1. P. 34–45.
74. Stamate M.I. et al. Preparation and Pharmaco-Mechanical Characterization of Ketoprofen-Polyvinyl Alcohol Cryogel for Medical Applications // *Rev. Chim.* 2019. Vol. 70, № 3. P. 848–852.
75. Fidkowski C. et al. Endothelialized Microvasculature Based on a Biodegradable Elastomer // *Tissue Eng.* 2005. Vol. 11, № 1–2. P. 302–309.
76. Fiedler T. et al. A comparative study of oxygen diffusion in tissue engineering scaffolds // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2014. Vol. 25, № 11. P. 2573–2578.
77. Lien S.-M., Ko L.-Y., Huang T.-J. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering // *Acta Biomater.* 2009. Vol. 5, № 2. P. 670–679.
78. Contessi Negrini N. et al. Tissue-mimicking gelatin scaffolds by alginate sacrificial templates for adipose tissue engineering // *Acta Biomater.* 2019. Vol. 87. P. 61–75.
79. Gallego D. et al. Multilayer micromolding of degradable polymer tissue engineering scaffolds // *Mater. Sci. Eng. C*. 2008. Vol. 28, № 3. P. 353–358.
80. Landers R., Mülhaupt R. Desktop manufacturing of complex objects, prototypes and biomedical scaffolds by means of computer-assisted design combined with computer-guided 3D plotting of polymers and reactive oligomers // *Macromol. Mater. Eng.* 2000. Vol. 282, № 1. P. 17–21.
81. Landers R. et al. Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering // *Biomaterials*. 2002. Vol. 23, № 23. P. 4437–4447.
82. Pataky K. et al. Microdrop Printing of Hydrogel Bioinks into 3D Tissue-Like Geometries // *Adv. Mater.* 2012. Vol. 24, № 3. P. 391–396.
83. Chia H.N., Wu B.M. Recent advances in 3D printing of biomaterials // *J. Biol. Eng.* 2015. Vol. 9, № 1. P. 4.
84. Melchels F.P.W., Feijen J., Grijpma D.W. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering // *Biomaterials*. 2010. Vol. 31, № 24. P. 6121–6130.
85. Fisher J.P., Dean D., Mikos A.G. Photocrosslinking characteristics and mechanical properties of diethyl fumarate/poly(propylene fumarate) biomaterials // *Biomaterials*. 2002. Vol. 23, № 22. P. 4333–4343.
86. Melchels F.P.W., Feijen J., Grijpma D.W. A poly(D,L-lactide) resin for the preparation of tissue engineering scaffolds by stereolithography // *Biomaterials*. 2009. Vol. 30, № 23–24. P. 3801–

- 3809.
87. Cui X. et al. Direct Human Cartilage Repair Using Three-Dimensional Bioprinting Technology // *Tissue Eng. Part A*. 2012. Vol. 18, № 11–12. P. 1304–1312.
 88. Noh I. et al. 3D printable hyaluronic acid-based hydrogel for its potential application as a bioink in tissue engineering // *Biomater. Res*. 2019. Vol. 23, № 1. P. 3.
 89. Shyam Karande T., Mauli Agrawal. Functions and Requirements of Synthetic Scaffolds in Tissue Engineering // *Nanotechnology and Tissue Engineering*. CRC Press, 2008. P. 53–86.
 90. Gorna K., Gogolewski S. Preparation, degradation, and calcification of biodegradable polyurethane foams for bone graft substitutes // *J. Biomed. Mater. Res*. 2003. Vol. 67A, № 3. P. 813–827.
 91. Dehghani F., Annabi N. Engineering porous scaffolds using gas-based techniques // *Curr. Opin. Biotechnol*. 2011. Vol. 22, № 5. P. 661–666.
 92. Barbetta A. et al. Polysaccharide based scaffolds obtained by freezing the external phase of gas-in-liquid foams // *Soft Matter*. 2010. Vol. 6, № 20. P. 5213.
 93. Sherifi I. et al. Use of supercritical carbon dioxide technology for fabricating a tissue engineering scaffold for anterior cruciate ligament repair // *Sci. Rep*. 2020. Vol. 10, № 1. P. 14030.
 94. Li S. et al. Supercritical CO₂ foamed composite scaffolds incorporating bioactive lipids promote vascularized bone regeneration via Hif-1 α upregulation and enhanced type H vessel formation // *Acta Biomater*. 2019. Vol. 94. P. 253–267.
 95. Barbetta A. et al. Gas-in-Liquid Foam Templating as a Method for the Production of Highly Porous Scaffolds // *Biomacromolecules*. 2009. Vol. 10, № 12. P. 3188–3192.
 96. Santos-Rosales V., Iglesias-Mejuto A., García-González C.A. Solvent-Free Approaches for the Processing of Scaffolds in Regenerative Medicine // *Polymers (Basel)*. 2020. Vol. 12, № 3. P. 533.
 97. Kim H.J. et al. Erratum to: Gas foaming fabrication of porous biphasic calcium phosphate for bone regeneration // *Tissue Eng. Regen. Med*. 2012. Vol. 9, № 4. P. 232–232.
 98. Costantini M., Barbetta A. Gas foaming technologies for 3D scaffold engineering // *Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds*. Elsevier, 2018. P. 127–149.
 99. Qian L., Zhang H. Controlled freezing and freeze drying: a versatile route for porous and micro-/nano-structured materials // *J. Chem. Technol. Biotechnol*. 2011. Vol. 86, № 2. P. 172–184.
 100. Grenier J. et al. Mechanisms of pore formation in hydrogel scaffolds textured by freeze-drying // *Acta Biomater*. 2019. Vol. 94. P. 195–203.
 101. Preciado J.A. et al. Utilization of Directional Freezing for the Construction of Tissue Engineering Scaffolds // *Heat Transfer, Volume 4*. ASME, 2003. Vol. 2003. P. 439–442.
 102. Cui X. et al. Freeze–thaw cycles for biocompatible, mechanically robust scaffolds of human hair keratins // *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater*. 2019. Vol. 107, № 5. P. 1452–1461.
 103. Rogers Z.J., Bencherif S.A. Cryogelation and Cryogels // *Gels*. 2019. Vol. 5, № 4. P. 46.
 104. Haugh M.G., Murphy C.M., O’Brien F.J. Novel Freeze-Drying Methods to Produce a Range of Collagen–Glycosaminoglycan Scaffolds with Tailored Mean Pore Sizes // *Tissue Eng. Part C*

- Methods. 2010. Vol. 16, № 5. P. 887–894.
105. Schoof H. et al. Control of pore structure and size in freeze-dried collagen sponges // *J. Biomed. Mater. Res.* 2001. Vol. 58, № 4. P. 352–357.
 106. Phadke A. et al. Effect of scaffold microarchitecture on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells // *Eur. Cells Mater.* 2013. Vol. 25. P. 114–129.
 107. Zheng Y. Fabrication on bioinspired surfaces // *Bioinspired Design of Materials Surfaces.* Elsevier, 2019. P. 99–146.
 108. Wei Q., Tao D., Xu Y. Nanofibers: principles and manufacture // *Functional Nanofibers and their Applications.* Elsevier, 2012. P. 3–21.
 109. Campiglio C.E. et al. Cross-Linking Strategies for Electrospun Gelatin Scaffolds // *Materials (Basel).* 2019. Vol. 12, № 15. P. 2476.
 110. Hoque M.E. et al. Electrospun Matrices from Natural Polymers for Skin Regeneration // *Nanostructured Polymer Composites for Biomedical Applications.* Elsevier, 2019. P. 87–104.
 111. Hong Y. Electrospun fibrous polyurethane scaffolds in tissue engineering // *Advances in Polyurethane Biomaterials.* Elsevier, 2016. P. 543–559.
 112. Sola A. et al. Development of solvent-casting particulate leaching (SCPL) polymer scaffolds as improved three-dimensional supports to mimic the bone marrow niche // *Mater. Sci. Eng. C.* 2019. Vol. 96. P. 153–165.
 113. Hu C. et al. Biodegradable porous sheet-like scaffolds for soft-tissue engineering using a combined particulate leaching of salt particles and magnetic sugar particles // *J. Biosci. Bioeng.* 2013. Vol. 116, № 1. P. 126–131.
 114. Liao C.-J. et al. Fabrication of porous biodegradable polymer scaffolds using a solvent merging/particulate leaching method // *J. Biomed. Mater. Res.* 2002. Vol. 59, № 4. P. 676–681.
 115. Hu C. et al. Magnetic sugar particles for particulate leaching in fabrication of sheet-like scaffold // *2012 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems.* IEEE, 2012. P. 3229–3234.
 116. Nam Y.S., Yoon J.J., Park T.G. A novel fabrication method of macroporous biodegradable polymer scaffolds using gas foaming salt as a porogen additive // *J. Biomed. Mater. Res.* 2000. Vol. 53, № 1. P. 1–7.
 117. Furusawa K. et al. Application of Multichannel Collagen Gels in Construction of Epithelial Lumen-like Engineered Tissues // *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2015. Vol. 1, № 7. P. 539–548.
 118. Pawar K. et al. Intrinsic and extrinsic determinants of central nervous system axon outgrowth into alginate-based anisotropic hydrogels // *Acta Biomater.* 2015. Vol. 27. P. 131–139.
 119. Günther M.I. et al. Cell-seeded alginate hydrogel scaffolds promote directed linear axonal regeneration in the injured rat spinal cord // *Acta Biomater.* 2015. Vol. 27. P. 140–150.
 120. Cai X. et al. Facile synthesis of anisotropic porous chitosan/hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering // *J. Mater. Chem.* 2011. Vol. 21, № 32. P. 12015.
 121. Ran J. et al. A facile method for the preparation of chitosan-based scaffolds with anisotropic pores

- for tissue engineering applications // *Carbohydr. Polym.* 2016. Vol. 152. P. 615–623.
122. Sochilina A. V. et al. Multichannel hydrogel based on a chitosan–poly(vinyl alcohol) composition for directed growth of animal cells // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2019. Vol. 184. P. 110495.
123. George L. et al. Photodynamic self–disinfecting surface using pyridinium phthalocyanine // *Dye. Pigment*. 2017. Vol. 147. P. 334–342.
124. Sochilina A. V et al. Quantitative detection of double bonds in hyaluronic acid derivative via permanganate ion reduction // *Meas. Sci. Technol.* 2019. Vol. 30, № 7. P. 075102.
125. Hwang T.L., Shaka A.J. Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients // *J. Magn. Reson. Ser. A*. 1995. Vol. 112, № 2. P. 275–279.
126. Savelyev A.G. et al. Facile Cell-Friendly Hollow-Core Fiber Diffusion-Limited Photofabrication // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021. Vol. 9.
127. Orekhov A.S., Klechkovskaya V. V., Kononova S. V. Low-voltage scanning electron microscopy of multilayer polymer systems // *Crystallogr. Reports*. 2017. Vol. 62, № 5. P. 710–715.
128. Maiti S. et al. Physical and self–crosslinking mechanism and characterization of chitosan-gelatin-oxidized guar gum hydrogel // *Polym. Test*. 2021. Vol. 97. P. 107155.
129. Prickaerts J. et al. Metrifonate improves working but not reference memory performance in a spatial cone field task // *Eur. J. Pharmacol.* 1999. Vol. 380, № 2–3. P. 61–65.
130. Faden A.I. et al. Novel TRH analog improves motor and cognitive recovery after traumatic brain injury in rodents. // *Am. J. Physiol.* 1999. Vol. 277, № 4. P. R1196-204.
131. Nataraj D. et al. Crosslinked chitosan films with controllable properties for commercial applications // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. Vol. 120. P. 1256–1264.
132. Lakehal I. et al. Prilling and characterization of hydrogels and derived porous spheres from chitosan solutions with various organic acids // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. Vol. 129. P. 68–77.
133. Li C. et al. Thermal gelation of chitosan in an aqueous alkali–urea solution // *Soft Matter*. 2014. Vol. 10, № 41. P. 8245–8253.
134. Qin W. et al. Fabrication of porous chitosan membranes composed of nanofibers by low temperature thermally induced phase separation, and their adsorption behavior for Cu²⁺ // *Carbohydr. Polym.* 2017. Vol. 178. P. 338–346.
135. Wang X. et al. Hofmeister effect on the viscosity properties of gelatin in dilute solutions // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2021. Vol. 206. P. 111944.
136. Rinaudo M., Pavlov G., Desbrières J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan // *Polymer (Guildf)*. 1999. Vol. 40, № 25. P. 7029–7032.
137. Yang Z., Yang H., Yang H. Characterisation of rheology and microstructures of κ -carrageenan in ethanol-water mixtures // *Food Res. Int.* 2018. Vol. 107. P. 738–746.
138. Shimizu S., Matubayasi N. Gelation: The Role of Sugars and Polyols on Gelatin and Agarose // *J. Phys. Chem. B*. 2014. Vol. 118, № 46. P. 13210–13216.

139. Liu S., Huang S., Li L. Thermoreversible gelation and viscoelasticity of κ -carrageenan hydrogels // *J. Rheol.* (N. Y. N. Y). 2016. Vol. 60, № 2. P. 203–214.
140. Stenner R., Matubayasi N., Shimizu S. Gelation of carrageenan: Effects of sugars and polyols // *Food Hydrocoll.* 2016. Vol. 54. P. 284–292.
141. Shojaee Kang Sofla M., Mortazavi S., Seyfi J. Preparation and characterization of polyvinyl alcohol/chitosan blends plasticized and compatibilized by glycerol/polyethylene glycol // *Carbohydr. Polym.* 2020. Vol. 232. P. 115784.
142. Amiji M.M. Pyrene fluorescence study of chitosan self-association in aqueous solution // *Carbohydr. Polym.* 1995. Vol. 26, № 3. P. 211–213.
143. Shilova S. V., Tret'yakova A.Y., Barabanov V.P. Association of Chitosan in Aqueous-Alcohol Solutions // *Polym. Sci. Ser. A.* 2018. Vol. 60, № 2. P. 184–189.
144. Elbert D.L. Liquid–liquid two-phase systems for the production of porous hydrogels and hydrogel microspheres for biomedical applications: A tutorial review // *Acta Biomater.* 2011. Vol. 7, № 1. P. 31–56.
145. Villetti M.A. et al. Phase-Separation Kinetics and Mechanism in a Methylcellulose/Salt Aqueous Solution Studied by Time-Resolved Small-Angle Light Scattering (SALS) // *Macromol. Chem. Phys.* 2011. Vol. 212, № 10. P. 1063–1071.
146. Sacco P. et al. Concepts for Developing Physical Gels of Chitosan and of Chitosan Derivatives // *Gels.* 2018. Vol. 4, № 3. P. 67.
147. Lertworasirikul A. et al. Plausible molecular and crystal structures of chitosan/HI type II salt // *Carbohydr. Res.* 2004. Vol. 339, № 4. P. 835–843.
148. Lertworasirikul A. et al. Two different molecular conformations found in chitosan type II salts // *Carbohydr. Res.* 2003. Vol. 338, № 11. P. 1229–1233.
149. Baklagina Y.G. et al. Polymorphic Modifications of Chitosan // *Crystallogr. Reports.* 2018. Vol. 63, № 3. P. 303–313.
150. Liu X. et al. Hydrogel machines // *Mater. Today.* 2020. Vol. 36. P. 102–124.
151. Negm N.A. et al. Performance of chitosan polymer as platform during sensors fabrication and sensing applications // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. Vol. 165. P. 402–435.
152. Peers S., Montembault A., Ladavière C. Chitosan hydrogels for sustained drug delivery // *J. Control. Release.* 2020. Vol. 326. P. 150–163.
153. Yang J. et al. Advanced applications of chitosan-based hydrogels: From biosensors to intelligent food packaging system // *Trends Food Sci. Technol.* 2021. Vol. 110. P. 822–832.
154. Zhao Y. et al. Preparation, characterization and protein sorption of photo-crosslinked cell membrane-mimicking chitosan-based hydrogels // *Carbohydr. Polym.* 2016. Vol. 151. P. 237–244.
155. Discher D.E., Janmey P., Wang Y. Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate // *Science* (80-.). 2005. Vol. 310, № 5751. P. 1139–1143.
156. Rivas-Araiza R. et al. Micron Range Morphology of Physical Chitosan Hydrogels // *Langmuir.* 2010. Vol. 26, № 22. P. 17495–17504.

157. Sereni N. et al. Dynamic Structuration of Physical Chitosan Hydrogels // *Langmuir*. 2017. Vol. 33, № 44. P. 12697–12707.
158. Tang Y.-F. et al. Rheological characterisation of a novel thermosensitive chitosan/poly(vinyl alcohol) blend hydrogel // *Carbohydr. Polym.* 2007. Vol. 67, № 4. P. 491–499.
159. El-Hefian E.A., Nasef, Mohamed Mahmoud Yahaya A.H.H.Y. Preparation and Characterization of Chitosan/Polyvinyl Alcohol Blends-A Rheological Study // *E-Journal Chem.* 2010. Vol. 7. P. S349–S357.
160. Enache A.A. et al. Kinetics of chitosan coagulation from aqueous solutions // *J. Appl. Polym. Sci.* 2018. Vol. 135, № 16. P. 46062.
161. Oudshoorn M.H.M. et al. Synthesis of methacrylated hyaluronic acid with tailored degree of substitution // *Polymer (Guildf)*. 2007. Vol. 48, № 7. P. 1915–1920.
162. Hallinan N. Method for quantifying permanganate-reducing compounds: pat. US 8,293,534 B2 USA. United States, 2013.
163. Weller C.T. Carbohydrates Studied by NMR // *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. Elsevier, 2017. P. 172–180.
164. Сочилина А.В. et al. Получение модифицированной гиалуроновой кислоты с контролируемым содержанием винильных групп с целью создания скаффолдов методом фотоиндуцируемой реакции сшивки // *Биоорганическая химия*. 2021. Vol. 47, № 4. P. 486–494.
165. Reis A. V. et al. Reaction of Glycidyl Methacrylate at the Hydroxyl and Carboxylic Groups of Poly(vinyl alcohol) and Poly(acrylic acid): Is This Reaction Mechanism Still Unclear? // *J. Org. Chem.* 2009. Vol. 74, № 10. P. 3750–3757.
166. Li Q., Wang D., Elisseeff J.H. Heterogeneous-Phase Reaction of Glycidyl Methacrylate and Chondroitin Sulfate: Mechanism of Ring-Opening–Transesterification Competition // *Macromolecules*. 2003. Vol. 36, № 7. P. 2556–2562.
167. Lowry K.M., Beavers E.M. Thermal stability of sodium hyaluronate in aqueous solution // *J. Biomed. Mater. Res.* 1994. Vol. 28, № 10. P. 1239–1244.
168. Orellana B. et al. The Photoinitiation Mechanism of Vinyl Polymerization by Riboflavin/Triethanolamine in Aqueous Medium // *Macromolecules*. 1999. Vol. 32, № 20. P. 6570–6573.
169. Ahmad I. et al. Photoinitiated Polymerization of 2-Hydroxyethyl Methacrylate by Riboflavin/Triethanolamine in Aqueous Solution: A Kinetic Study // *ISRN Pharm.* 2013. Vol. 2013. P. 1–7.
170. Savelyev A.G. et al. Extrusion-Based 3D Printing of Photocurable Hydrogels in Presence of Flavin Mononucleotide for Tissue Engineering // *Sovrem. Tehnol. v Med.* 2018. Vol. 10, № 1. P. 88.
171. Asteriou T. et al. An Improved Assay for the N-Acetyl--glucosamine Reducing Ends of Polysaccharides in the Presence of Proteins // *Anal. Biochem.* 2001. Vol. 293, № 1. P. 53–59.

172. Morra M., Cassineli C. Non-fouling properties of polysaccharide-coated surfaces // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1999. Vol. 10, № 10. P. 1107–1124.
173. Leal G., Bramham C.R., Duarte C.B. BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity. 2017. P. 153–195.
174. Lin L.-F.H. et al. GDNF: a Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor for Midbrain Dopaminergic Neurons // *Science (80-.)*. 1993. Vol. 260, № 5111. P. 1130–1132.
175. Sahib S. et al. Cerebrolysin enhances spinal cord conduction and reduces blood-spinal cord barrier breakdown, edema formation, immediate early gene expression and cord pathology after injury. 2020. P. 397–438.
176. Aisenbrey E.A., Murphy W.L. Synthetic alternatives to Matrigel // *Nat. Rev. Mater.* 2020. Vol. 5, № 7. P. 539–551.
177. Dadashi-Silab S., Doran S., Yagci Y. Photoinduced Electron Transfer Reactions for Macromolecular Syntheses // *Chem. Rev.* 2016. Vol. 116, № 17. P. 10212–10275.
178. Judzewitsch P.R. et al. Photo-Enhanced Antimicrobial Activity of Polymers Containing an Embedded Photosensitiser // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2021. Vol. 60, № 45. P. 24248–24256.