

КОМПОЗИТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И МОНТМОРИЛЛОНИТА: ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ МАТРИЦ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СТВОЛОВЫХ И РЕГЕНЕРАТИВНЫХ КЛЕТОК

© П. В. Попрядухин,^{1,*} И. П. Добровольская,¹ В. Е. Юдин,¹ Е. М. Иванькова,¹
А. Б. Смолянинов,³ Н. В. Смирнова^{2, 3}

¹Институт высокомолекулярных соединений РАН,

²Научно-исследовательская лаборатория клеточных технологий МАПО

и ³Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

* электронный адрес: pavel-pn@mail.ru

В настоящей работе рассматриваются структурные и механические свойства композитных материалов на основе хитозана, а также микро- и наночастиц монтмориллонита и возможность их использования для культивирования и адресной доставки мезенхимных стволовых и регенеративных клеток. Показано, что при добавлении монтмориллонита биоматериал приобретает стабильность структурных и механических свойств в условиях стерилизационной обработки и при манипуляциях в жидких средах в ходе культивирования клеток. С помощью исследований *in vitro* с использованием дермальных фибробластов и мезенхимных стволовых клеток жировой ткани продемонстрировано, что данный материал обладает комплексом свойств, обеспечивающих биосовместимость матрицы.

Ключевые слова: биоматериал, хитозан, Na-монтмориллонит, мезенхимные стволовые клетки, дермальные фибробласты, клеточная трансплантология, тканевая инженерия.

Принятые сокращения: ДМСО — диметилсульфоксид, ASCs — Adipose Derived Stem Cells, BSA — бычий сывороточный альбумин, Na-MMT — натрий монтмориллонит, MTT — 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.

Материалы, предназначенные для контакта со средой живого организма и используемые для изготовления медицинских изделий и устройств, получили название «биоматериалы». Исследованиями последних лет заложены представления о том, каким комплексом свойств должны обладать биоматериалы, на основе которых могут быть сформированы тканеинженерные конструкции для точечной трансплантологии и тканевой инженерии.

Оптимальный биоматериал должен иметь стабильные физико-химические свойства в условиях стерилизационной обработки, при манипуляциях в жидких средах в ходе культивирования клеток. Механические свойства матрицы должны обеспечивать удобство переноса тканеинженерной конструкции в организм, стабилизацию ее в области повреждения (терапии) и при необходимости ее легкое удаление.

Материал должен обладать комплексом свойств, обеспечивающих биосовместимость матрицы. К таким свойствам относятся отсутствие токсичности при взаимодействии с клетками *in vitro* и *in vivo* и минимизация возможных провоспалительных свойств в ткани. Матрица должна поддерживать адгезию, пролиферацию и в случае необходимости дифференцировку клеточных элементов в составе тканеинженерного препарата. Для этого предусматривается возможность моделирования поверхностей со сложным рельефом.

В некоторых случаях необходимым условием использования материала являются выраженные антимикробные и антимикотические свойства. В то же время матрица должна иметь достаточную проницаемость для газов (кислорода, углекислоты) и обеспечивать протекание репаративных процессов в ткани. Свойства матрицы должны позволять контролировать темп и механизм резорбции в пределах организма, что обеспечивает ее биодеградируемость (Волова и др., 2009).

Таким образом, ключевой проблемой для успеха создания эффективных биоконструкций является наличие адекватного биодеградирующего и биосовместимого материала. Быстрая деградация носителя-подложки способствует вымыванию клеток вместе с трансудатом из раны, поэтому тканезамещающие имплантаты должны иметь пролонгированный срок биодеградации. Круг материалов, используемых в медицине, весьма широк и включает в себя материалы природного и искусственного происхождения, среди которых металлы, керамики, синтетические и естественные полимеры, различные композиты и др. В последние десятилетия непрерывно растет интерес к биодеградируемым природным (биологическим) полимерам (альгинатам, коллагену, желатину, хитозанам, фибринам шелка) и полиэфирам бактериального происхождения — полигидроксиалканоатам (ПГА), синтезируемым микроорганизмами. К недостаткам природных биополи-

меров относят высокую стоимость их получения, сложность обработки, недостаточную механическую прочность. Довольно широкое применение в медицине нашли распространенные природные полисахариды хитозан (Нудьга, 2002) и альгинат, которые по структурным характеристикам сходны с гликозаминогликанами.

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в биоматериаловедении к настоящему времени, такие материалы все еще дефицитны, и пока не удалось создать субстанции, полностью совместимые с живым организмом. Стремительное развитие биотехнологии, наблюдаемое в последние годы, приводит к все более широкому внедрению в медицину различных соединений, включая высокомолекулярные соединения как синтетического, так и природного происхождения. Разнообразие материалов и особенно полимеров, варьирование в широких пределах их стереоконфигурации и молекулярной массы, возможность получения композитов в разнообразных сочетаниях с различными веществами — все это является основой для получения широчайшего спектра новых материалов с новыми ценными свойствами.

Композиты — это многокомпонентные материалы, состоящие из полимерной, металлической, углеродной, керамической или другой основы, армированной наполнителями из волокон, нитевидных кристаллов, тонкодисперсных частиц и др. Композитные материалы представляют собой смесь двух или более фаз, связанных вместе так, что передача напряжения происходит по их границе. Создание композитов стало перспективной областью материаловедения, которая позволяет на базе сочетания уже известных и выпускаемых материалов более эффективно и быстро придать им принципиально новые свойства по сравнению с трудоемким и длительным путем создания новых материалов. Использование в качестве регуляторного механизма наночастиц, с одной стороны, существенно расширяет возможности варьирования физико-химических свойств таких конструкций и соответственно их клинического применения, но, с другой стороны, ставит перед исследователями дополнительные задачи анализа возможного токсического влияния наночастиц на клеточные составляющие тканеинженерного препарата на основе композита (Шехтер, Розанова, 1999). Очень высокая удельная поверхность наноматериалов увеличивает их адсорбционную емкость, химическую реакционную способность и каталитические свойства. Это может приводить, в частности, к увеличению продукции свободных радикалов и активных форм кислорода и далее к повреждению биологических структур (липидов, белков, нуклеиновых кислот, в частности ДНК). Изменение растворимости, реакционной (каталитической) способности может быть использовано для создания биопрепаратов нового поколения, но это же несет и потенциальные риски.

Известно, что введение в полимерную матрицу наночастиц различной формы увеличивает механические свойства композита за счет армирующего эффекта наполнителя и структурирования полимера (Hussain et al., 2006; Yudin et al., 2007; Smirnova et al., 2009). Так, в литературе отмечается улучшение барьерных свойств полимера при введении в него наночастиц натрий-монтмориллонита (Na-ММТ) (Lin et al., 2005). Поэтому можно предположить, что введение наночастиц Na-ММТ в хитозановую матрицу будет способствовать стабилизации структуры матрицы, сохранению пористой структуры материала в жидкой среде. Однако в настоящее время нет полной картины данных о влиянии на клеточные процессы частиц

Na-ММТ, находящихся в полимерной матрице (Голохваст, Памирский, 2010).

Цель настоящей работы — исследование механических свойств композитных матриц на основе хитозана и Na-ММТ в условиях стерилизационной обработки и культивирования клеток, оценка пригодности композитного материала для адгезии и пролиферации мезенхимных стволовых клеток жировой ткани и первичных дермальных фибробластов, а также анализ цито- и генотоксических свойств материала.

Материал и методика

Синтез биоматериалов. Для получения хитозановых и композитных пленок и губок использовали хитозан — 2-амино-2-дезоксид-(1-4)-β-D-глюкопираноза (Fluka Chemie, BioChemika line, Швейцария) с мол. массой 255 кДа, степенью деацетилирования 80 % и зольностью 0.5%. Наполнителем являлся Na-ММТ с катионообменной емкостью 92.6 мэкв на 100 г (Southern Clay Products, Inc., США). Пленочные композиционные образцы получали методом формования через щелевую фильеру на стеклянную подложку жидкой композиции, состоящую из 4%-ного раствора хитозана в 2%-ной уксусной кислоте и наполнителя Na-ММТ. При получении таких композиций перед введением в раствор полимера Na-ММТ подвергали ультразвуковому диспергированию в воде в течение 1 ч при частоте 40 кГц на установке УЗВ-1.3.

Блочные пористые образцы (губки) получали методом лиофильной сушки раствора хитозана, содержащего соответствующее количество наполнителя. Лيوфилизацию композитного раствора проводили при –50 °С с последующей вакуумной сушкой в течение 48 ч.

Для исследования формоустойчивости губок вырезали диски диаметром 30 мм и толщиной 7 мм. Образцы выдерживали в культуральной жидкой среде в течение 5 сут, затем сушили на воздухе до постоянной массы.

Использовали культуры дермальных фибробластов ПФЧ-М и мезенхимных стволовых клеток жировой ткани ASCs-1 человека, полученные в ходе стандартных процедур в Институте цитологии РАН. ПФЧ-М культивировали в питательной среде MEM powder (autoclavable), содержащей бикарбонат натрия, L-глутамин, 12 % эмбриональной сыворотки телят и антибиотики (100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина). ASCs-1 культивировали в питательной среде MEM Alpha Modification, содержащей 15 % эмбриональной сыворотки телят и те же антибиотики. Все реактивы от фирмы Gibco (США).

Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при 37 °С, в атмосфере 5 % CO₂ и повышенной влажности.

Оценка степени адгезии клеток к различным субстратам.

Использовали платы с квадратными лунками (Nunc, США), в которые помещали исследуемые пленки и предметные стекла. Снятые с культуральной подложки клетки промывали трижды средой MEM без сыворотки с последующим их осаждением при 1000 g в течение 5 мин. Затем клетки в среде без сыворотки высевали в платы по 50 тыс. клеток на 1 лунку. После инкубации в течение определенного времени неприкрепившиеся клетки удаляли, а прикрепившиеся фиксировали в течение 10 мин при комнатной температуре 4%-ным раствором формальдегида в PBS и окрашивали 20 мин 0.1%-ным раствором ген-

циан-виолета. Краситель растворяли 10%-ной уксусной кислотой. Равные аликвоты растворов из лунок переносили в 96-луночные платы. Оптическую плотность раствора измеряли при длине волны 570 нм на приборе Multiskan. Была построена калибровочная прямая. О количестве клеток, прикрепившихся к субстрату, судили с ее помощью по величине оптической плотности растворов в лунках при длине волны 570 нм.

Оценка цитотоксичности матриц с помощью МТТ-теста. Образцы, содержащие 0, 3, 5 или 8 % Na-ММТ, в течение 7 сут инкубировали с культуральной средой. Полученные образцы среды использовали для культивирования мезенхимных стволовых клеток жировой ткани ASC-1. Клетки высевали в 24-луночные платы с плотностью 50 тыс. клеток на 1 лунку. Через 2 сут для определения количества жизнеспособных клеток в лунках плат в культуральную среду добавляли раствор МТТ (Invitrogen, США) до конечной концентрации 0.25 мг/мл. Инкубировали в течение 3 ч при 37 °С в условиях насыщающей влажности в атмосфере, содержащей 5% CO₂, после чего удаляли культуральную среду и клетки однократно промывали раствором PBS. Далее к клеткам добавляли 100 мкл ДМСО и инкубировали в течение 30 мин при непрерывном перемешивании в термостатируемом шейкере при 37 °С. Измерение оптической плотности, соответствующее числу жизнеспособных клеток, проводили на приборе Multiskan при длине волны 570 нм.

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Для оценки генотоксического действия хитозановых композитных матриц образцы, содержащие 5 % Na-ММТ, в течение 7 сут инкубировали с культуральной средой. Полученные образцы среды использовали для культивирования дермальных фибробластов. Клетки выращивали на поверхности покровных стекол до достижения субконфлюэнтного состояния. Далее отмывали ростовую питательную среду раствором PBS (Биолот, Россия). После промывки PBS клетки фиксировали 10 мин в 3.7%-ном растворе формальдегида в PBS на льду. Отмывали от фиксатора раствором PBS трижды быстро, затем в течение 30 мин на качалке. Далее для перфорации плазматической мембраны клетки инкубировали в течение 5 мин в растворе PBS, содержащем 3 % Тритона X-100 (Helicon, Россия). Проводили отмывку аналогично предыдущей. Препараты инкубировали от 30 мин до 12 ч в 1%-ном растворе BSA (Sigma, США) на PBS, который далее также отмывали. Для визуализации фокусов образцы инкубировали последовательно с антителами против γ -H2AX (Abcam, США) и Alexa Fluor® 488 F(ab')₂ fragment of goat anti-mouse IgG (H+L) или Rhodamine Red™-X goat anti-rabbit IgG (H+L) (Invitrogen, США).

Антитела разводили в 0.1%-ном растворе BSA (Sigma, США) в PBS. Между инкубациями с антителами стекла промывали 30 мин в 0.1%-ном растворе Tween-20 (Хеликон, Россия) на PBS.

Препараты анализировали с помощью лазерного сканирующего флуоресцентного микроскопа Zeiss LSM 5 PASCAL. Для визуализации флуоресценции использовали аргоновый (488 нм) и гелиево-неоновый (543 нм) лазеры.

Для исследования методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) клетки фиксировали на поверхности материалов. По истечении 72 ч с момента посева клеток образцы промывали 0.1 М PBS, pH 7.4, после чего фиксировали в течение 40 мин

2.5%-ным раствором глутаральдегида в PBS. После удаления фиксирующего раствора образцы промывали PBS и проводили дегидратацию материала восходящими концентрациями спиртов. После удаления этанола образцы помещали на 30 мин в гексаметилдисилазан, после чего высушивали на воздухе. После этого их фиксировали на предметные столики и напыляли золото, используя установку Eiko-IB3 (Ion coater), при следующем режиме: ионный ток — 6 мА, межэлектродное напряжение — 1.5 кВ, что позволяло получать толщину слоя напыления около 25 нм. Изучение объектов проводили на аппарате Supra 55VP (Carl Zeiss) в режиме регистрации вторичных электронов при ускоряющем напряжении 20 кВ. Захват и обработку видеоизображения на персональном компьютере реализовывали с использованием программно-аппаратного комплекса Microcapture 2.2 (системы для микроскопии и анализа).

Результаты и обсуждение

При исследовании возможности использования материалов для культивирования клеток первичными ограничивающими условиями являются этапы стерилизационной обработки матриц путем автоклавирования и инкубирование матриц в жидких средах без потери формы и изменения механических свойств в ходе стерилизационной обработки, подготовки матрицы к культивированию и собственно культивирования клеток.

Трехмерные пористые структуры из хитозана и композитов на его основе получали методом лиофильной сушки. Губки, полученные из 0.2%-ного раствора хитозана в уксусной кислоте, имеют излишне гетерогенные по своему размеру поры. При термической обработке поры дополнительно увеличиваются и достигают размера 300 мкм (рис. 1).

Увеличение содержания хитозана в растворе до 4 % делает структуру матрицы высокопористой со средним размером пор 20—30 мкм. Термическая обработка такого образца приводит к увеличению среднего размера пор до 50—70 мкм, гетерогенность по размеру пор при этом увеличивается не столь сильно, как при низких концентрациях хитозана. Подобная структура оказывается, с одной

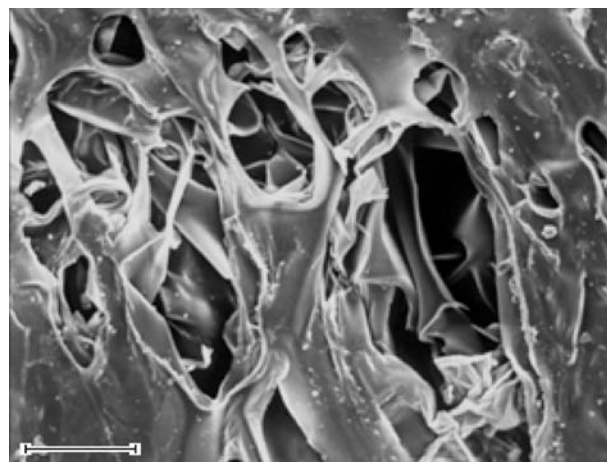


Рис. 1. Электронная микрофотография структуры блочной матрицы, синтезированной на основе 0.2%-ного раствора хитозана, после термической обработки.

Масштабная линейка — 100 мкм.

стороны, вполне адекватной размеру дермальных фибробластов и мезенхимных стволовых клеток и позволяет клеткам проникать в толщу блочной матрицы, прикрепляться и пролиферировать в ее полостях, а с другой — уменьшает вымывание клеток и внеклеточного матрикса из тканеинженерной конструкции (рис. 2).

Для модификации структуры хитозана и повышения его устойчивости к воздействию нагревания при стерилизации и воздействию жидких сред в 4%-ный раствор хитозана вводили диспергированные частицы Na-MMT в количестве 10 % от массы полимера. Размер пор в таких образцах составлял около 100 мкм и выше (рис. 3, а).

Частицы Na-MMT в матрицах находятся частично в эксфолиированном и интеркалированном состояниях, частично — в нативном. Последнее, видимо, связано с высокой концентрацией наполнителя — 10 % от массы (wt %), способствующей конгломерации диспергированных частиц. Это обстоятельство обосновывало необходимость исследования матриц с более низкими концентрациями Na-MMT — 3 или 5 % от массы. Было установлено, что введение в структуру матриц частиц Na-MMT в концентрации 5 % способствует образованию стабильных неспадающихся каналов, направленных в толщу образца (рис. 3, б).

При культивировании в толще матриц стволовые клетки жировой ткани образуют колонии внутри каналов матрицы. При использовании скаффолдов на основе хитозана без добавления Na-MMT образуются немногочисленные крупные колонии (рис. 4, а). Таким образом, при высоком набухании хитозановой матрицы, не содержащей наполнителя, возможно сужение диаметра пор, вплоть до полного слипания, что приводит к уменьшению диффузионных процессов. Следствием этого являются ограничение роста клеток, неравномерное распределение клеток в объеме матрицы, формирование отдельных колоний и нежизнеспособность клеток в центре колонии. Кроме того, губки без Na-MMT, находившиеся в жидкой среде, не обладают необходимой жесткостью, что вызывает затруднения при манипуляциях.

При использовании матрицы на основе хитозана с добавлением 5 % Na-MMT клетки проникают в поры на всем их протяжении, что обеспечивает образование многочисленных жизнеспособных небольших колоний

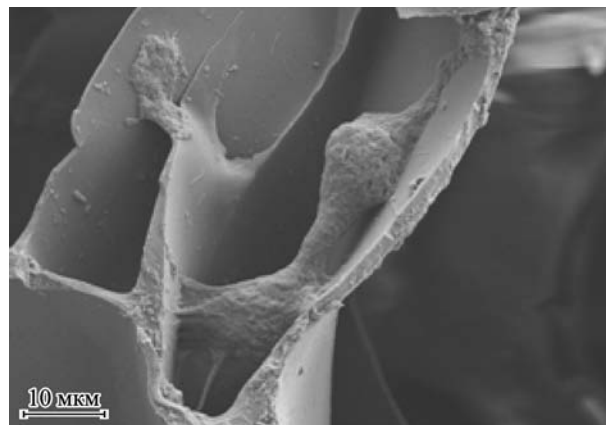


Рис. 2. Электронная микрофотография мезенхимных стволовых клеток жировой ткани ASCs-1, культивированных в толще блочной матрицы, синтезированной на основе 4%-ного раствора хитозана.

(рис. 4, б). Объемная равномерная пролиферация клеток в толще матриц, содержащих Na-MMT, обусловлена стабильностью структуры, сохранением сквозной пористости в жидкой среде, что обеспечивает поступление в клетку питательных веществ из культуральной среды, поддержание газообмена и нормальное протекание других обменных процессов.

Исследованию подвергали композиты не только в виде блоков, но и пленочные матрицы. При исследовании пленочных матриц на основе хитозана показали, что добавление в структуру материала Na-MMT существенно улучшает их механические свойства при использовании для культивирования клеток. На рис. 5 показано, каким образом меняются форма и размер изначально круглых фрагментов матриц после инкубирования их в течение 5 сут в культуральной среде и последующего высушивания. Очевидно, что увеличение процентного содержания Na-MMT повышает прочность и стабильность формы образцов. Добавление Na-MMT способствует и механической стабильности пленок в ходе стерилизационной обработки путем автоклавирования (1 атм, 120 °C в течение 20 мин). Пленки, не содержащие Na-MMT, после автокла-

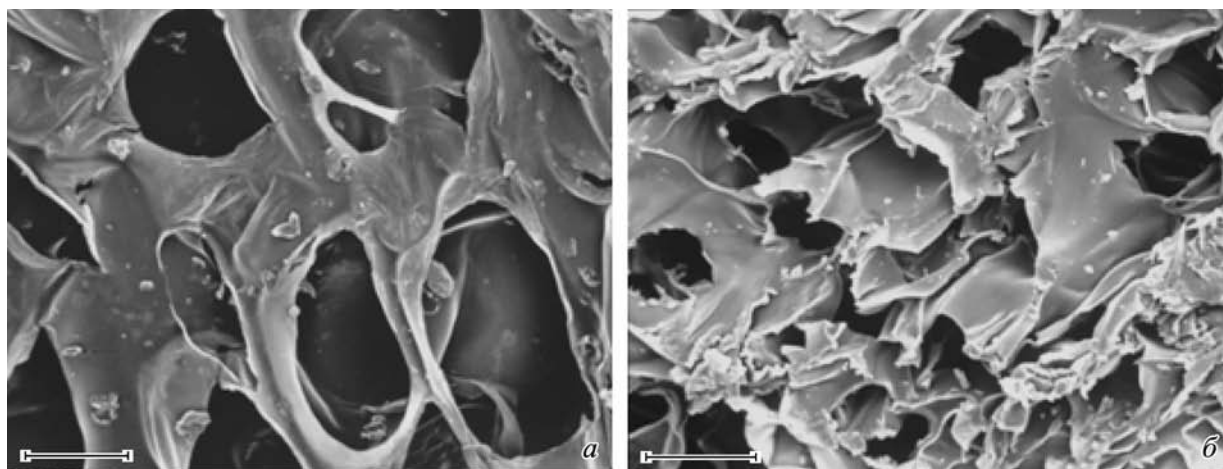


Рис. 3. Электронные микрофотографии композитных матриц на основе хитозана, содержащих 10 (а) или 5 (б) % от массы Na-MMT.

Масштабная линейка — 100 мкм.

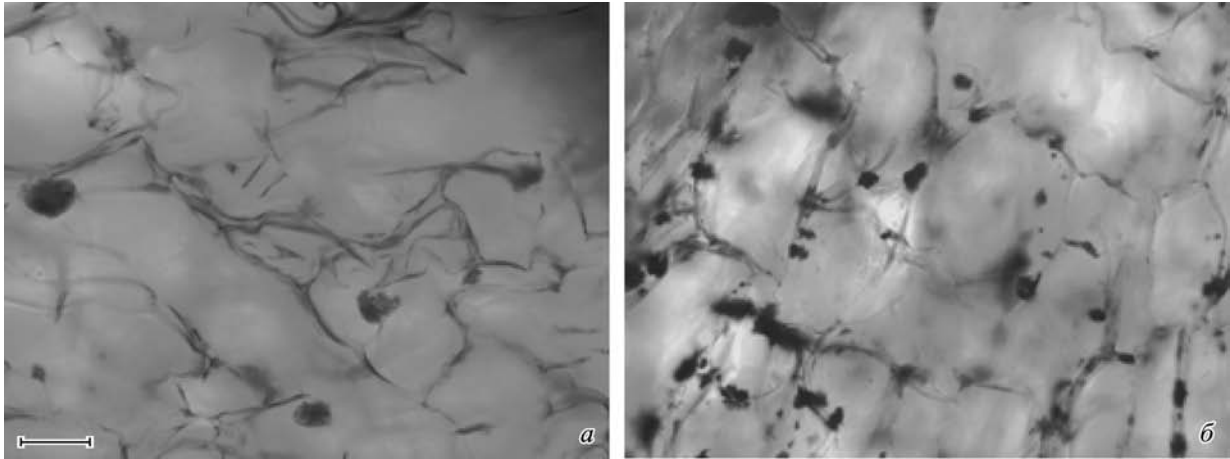


Рис. 4. Культивирование мезенхимных стволовых клеток жировой ткани ASC-1 в толще блочной матрицы на основе хитозана (а) и композита на основе хитозана и 5 % Na-MMT (б).

Масштабная линейка — 50 мкм.



Рис. 5. Фотографии фрагментов матриц на основе хитозана, содержащих 0 (а), 3 (б) и 5 (в) % Na-MMT, после выдерживания в культуральной среде и высушивания.

Размер фрагментов до обработки и размер масштабной линейки — 30 мм.

вирования были подвержены скручиванию, что затрудняло их последующее практическое использование.

Показано, что на поверхности пленочного композита на основе хитозана, содержащего 5 % Na-MMT, наблюда-

ются хорошая адгезия и стабильная пролиферация дермальных фибробластов ПФЧ-М.

Степень адгезии первичных дермальных фибробластов человека к пленкам на основе хитозана, а также композитным пленкам, содержащим 5 % Na-MMT, сопоставляли с адгезией клеток к покровному стеклу. Показали, что добавление Na-MMT улучшает адгезию клеток на пленке (рис. 6). Структура расположения клеток не искажается, видны типичные для фибробластов человека дугообразные траектории роста без признаков избегания включений Na-MMT. Клетки имели типичную морфологию и размеры, что свидетельствует об оптимальных условиях адгезии, распластывания, движения и пролиферации (рис. 7).

Питательную среду, в которой инкубировали образцы матриц, использовали для проведения МТТ-теста на возможное цитотоксическое действие матриц на культуру мезенхимных стволовых клеток жировой ткани ASCs-1.

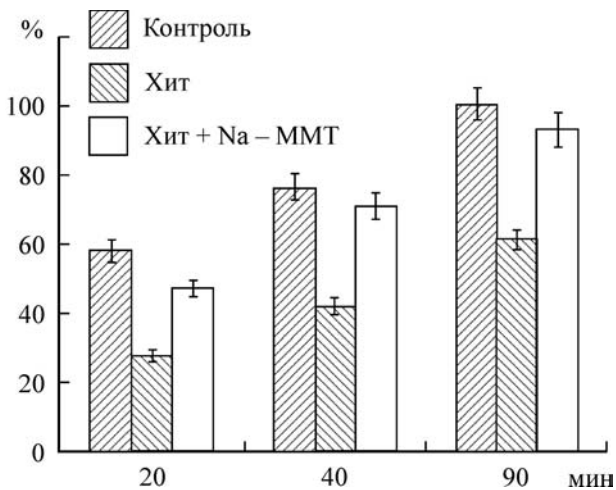


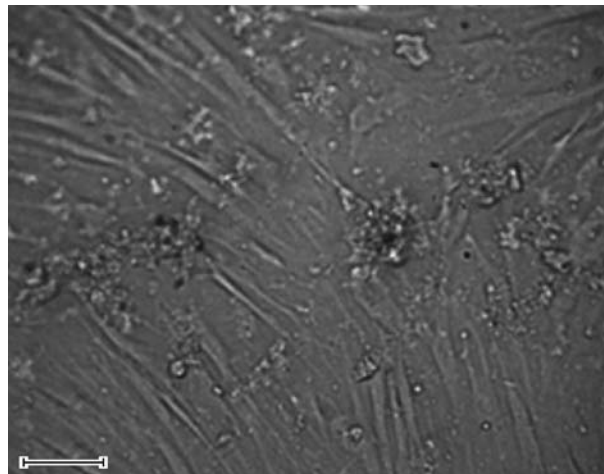
Рис. 6. Степень адгезии дермальных фибробластов человека ПФЧ-М к поверхности покровного стекла (контроль), хитозановой и композитной матрицы на основе хитозана, содержащей 5 % Na-MMT.

Рис. 7. Культивирование дермальных фибробластов человека ПФЧ-М на поверхности композитной матрицы, содержащей 5 % Na-ММТ.

Масштабная линейка — 20 мкм.

Оказалось, что матрицы, состоящие из хитозана, композиты на основе хитозана и Na-ММТ не оказывают цитотоксического действия на клетки. Достоверной разницы при $P < 0.05$ между контрольными и опытными значениями не оказалось (см. таблицу).

Исследование генотоксического действия материалов на основе хитозана и Na-ММТ на фибробласты человека показало, что в ядрах клеток, культивируемых в культуральной среде, в которой до этого инкубировали матрицы на основе хитозана, содержащие 5 % Na-ММТ, не выявляется стабилизация фокусов гистона гамма-H2AX (рис. 8, а), которая является показателем генотоксического воздействия, ведущего к стандартному ответу клетки на повреждения (остановке клеточного цикла и репарации ДНК, апоптозу или индуцированному клеточному старению). Используя аналогичную схему исследования, другие авторы выявили стабилизацию фокусов фосфори-



лированной формы H2AX в ядрах фибробластов в ответ на воздействие наночастиц диоксида титана (Trouiller et al., 2009). Пример аналогичного воздействия перекиси водорода можно увидеть на рис. 8, б, на котором показано образование в ядрах клеток фокусов гамма-H2AX гисто-

Оценка цитотоксического действия матриц на основе хитозана и Na-ММТ на мезенхимные стволовые клетки жировой ткани ASCs-1

Количество жизнеспособных клеток при различном содержании Na-ММТ (% от массы)			
без матриц (контроль)	0	3	5
0.500 ± 0.011 (0.487—0.514) Или 100.0 %	0.4810 ± 0.0226 (0.457—0.502) Или 96.10 ± 4.52 %	0.4750 ± 0.0297 (0.457—0.509) Или 94.90 ± 5.95 %	0.4840 ± 0.0312 (0.462—0.520) Или 96.90 ± 6.24 %

Примечание. Долю жизнеспособных клеток определяли с помощью МТТ-теста. Приведены значения оптической плотности в отн. ед. В скобках указаны ее минимальное и максимальное значения.

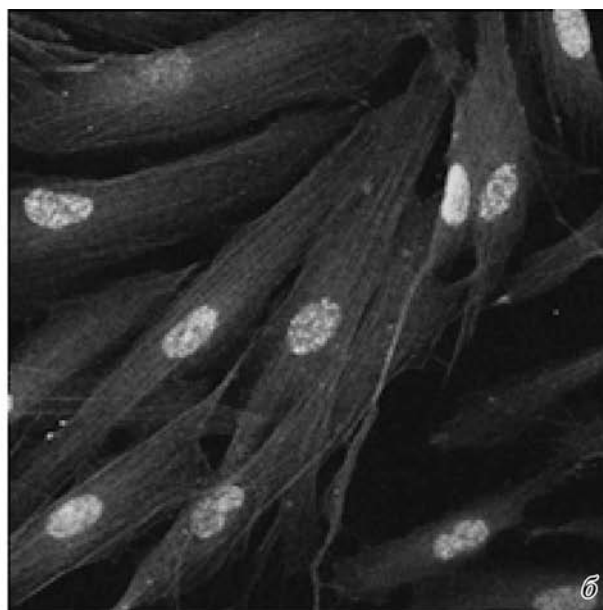
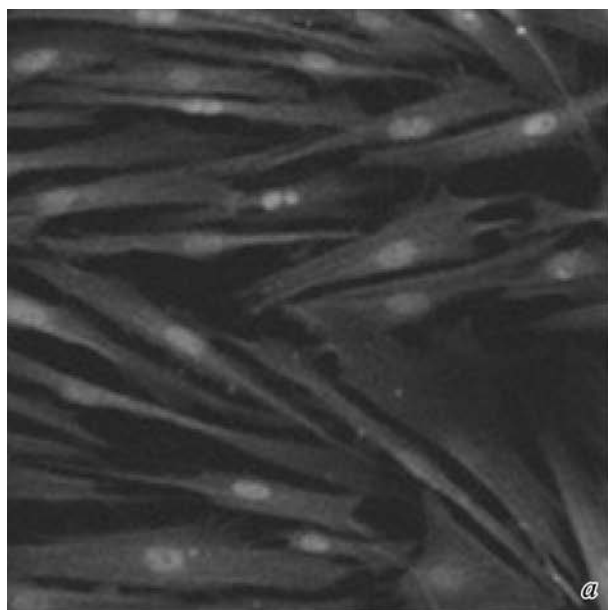


Рис. 8. Иммунофлуоресцентное мечение фибробластов человека ПФЧ-М антителами против гамма-H2AX гистона.

а — клетки, культивируемые в среде после инкубации в ней фрагмента композитной матрицы на основе хитозана, содержащей 5 % Na-ММТ; б — клетки, в которых индуцировано образование фокусов гамма-H2AX гистона после введения в среду 500 мкМ перекиси водорода.

на. Таким образом, можно заключить, что введение в состав композита микро- и наночастиц Na-ММТ не оказывает острого генотоксического воздействия на клетки.

Таким образом, проведенные исследования демонстрируют перспективность синтеза композитных материалов на основе 4%-ного раствора хитозана в уксусной кислоте и наполнителя Na-ММТ в концентрации 5 wt %. Данный материал не оказывает цито- и генотоксического действия на клетки в составе тканеинженерных конструкций. Композит пригоден по своим структурным и механическим свойствам и критериям биосовместимости для создания на его основе матриц для клеточной трансплантологии и тканевой инженерии. Удобство манипуляций с блочными и пленочными матрицами из композита делает его кандидатом для решения различных биотехнологических и клинических задач.

Список литературы

- Волова Т. Г., Шишацкая Е. И. Миронов П. В. 2009. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии. Красноярск: ИПК СФУ. 262 с.
- Голохваст К. С., Памирский И. Э. 2010. Экологические и нанотоксикологические аспекты взаимодействия минералов и белков. Вестник новых мед. технологий. 17 (2): 53—55.
- Худьга Л. А. 2002. Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. М., Наука. 368 с.
- Шехтер А. Б., Розанова И. Б. 1999. Тканевая реакция на имплантат. В кн.: Биосовместимость. М.: Наука. 174—211.
- Hussain F., Hojjati M., Okamoto M., Gorga R. E. 2006. Review article. Polymer-matrix nanocomposites, processing, manufacturing, and application. Overview J. Composite Materials. 40 : 1511—1575.
- Lin K.-F., Hsu C.-Y., Huang T.-S., Chiu W.-Y., Lee Y.-H., Young T.-H. 2005. A novel method to prepare chitosan/montmorillonite nanocomposites. J. application Polymer Sci. 98 : 2042—2047.
- Smirnova V. E., Gofman I. V., Yudin V. E., Dobrovolskaya I. P., Shumakov A. N., Didenko A. L., Svetlichnyi V. M., Wachtel E., Shechter R., Harel H., Marom G. 2009. Orientated crystallization in drawn thermoplastic polyimide modified by carbon nanofibers. Polym. Eng. Sci. 49 : 217—222.
- Trouiller B., Reliene R., Westbrook A., Solaimani P., Schiestl R. H. 2009. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability *in vivo* in mice. Cancer Res. 69 : 8784—8789.
- Yudin V. E., Otaigbe J. U., Gladchenko S., Olson B. G., Nazarenko S., Korytkova E. N., Gusarov V. V. 2007. New polyimide nanocomposites based on silicate type nanotubes: dispersion, processing and properties. Polymer. 48 : 1306—1315.

Поступила 8 VII 2011

COMPOSITE MATERIALS BASED ON CHITOSAN AND MONTMORILLONITE PROSPECTS FOR USE AS A MATRIX FOR STEM AND REGENERATIVE CELL CULTIVATION

P. V. Popryadukhin,¹ * I. P. Dobrovolskaya,¹ V. E. Yudin,¹ E. M. Ivan'kova,¹ A. B. Smolyaninov,² N. V. Smirnova^{2, 3}

¹ Institute of Macromolecular Compounds RAS,

² Cell Technologies Laboratory of the Medical Academy of Postgraduate Education and ³ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

* e-mail: pavel-pn@mail.ru

This paper examines the structural and mechanical properties of composite mat based on chitosan and micro- and nanoparticles of Na-montmorillonite and possible application for cultivation and targeted delivery of mesenchymal stem cells regenerative cells. It's have been shown by addition of Na-montmorillonite biomat acquires stability of structural and mechanical properties in the sterilization process the handling of liquid media in cell culture. In vitro studies using dermal fibroblasts adipose tissue mesenchymal stem cells demonstrated that this material has a st properties to ensure matrix biocompatibility.

Key words: biomaterial, chitosan. Na-montmorillonite. mesenchymal stem cells, dermal fibroblasts, cell transplantation, tissue engineering.