

**СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ  
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОМПОЗИТНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ  
НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И МОНТМОРИЛЛОНИТА:  
ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАНОМАТРИЦ  
ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СТВОЛОВЫХ И РЕГЕНЕРАТИВНЫХ КЛЕТОК  
ДЛЯ ДЕРМАЛЬНОГО ЭКВИВАЛЕНТА**

*П.В. Попрядухин<sup>1</sup>, И.П. Добровольская<sup>1</sup>, В.Е. Юдин<sup>1</sup>, Е.М. Иванькова<sup>1</sup>, О.Г. Хурцилава<sup>3</sup>,  
А.Б. Смолянинов<sup>3,4</sup>, Н.В. Смирнова<sup>2,3</sup>*

<sup>1</sup> Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> ООО «Покровский банк стволовых клеток», Санкт-Петербург, Россия

**MODERN ASPECTS OF USE COMPOSITE NANOMATERIALS BASED  
ON CHITOSAN AND MONTMORILLONITE: PROSPECTS FOR USE AS  
A MATRIX FOR STEM AND REGENERATIVE CELLS CULTIVATION  
FOR DERMAL EQUIVALENT**

*P.V. Popryadukhin<sup>1</sup>, I.P. Dobrovolskaya<sup>1</sup>, V.E. Yudin<sup>1</sup>, E.M. Ivan'kova<sup>1</sup>, O.G. Hurcilava<sup>3</sup>,  
A.B. Smolyaninov<sup>3,4</sup>, N.V. Smirnova<sup>2,3</sup>*

<sup>1</sup> Institute of Macromolecular Compounds, RAS, Saint-Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

<sup>3</sup> North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia

<sup>4</sup> Stem Cell Bank Pokrovski, Saint-Petersburg, Russia

© Коллектив авторов, 2011

В настоящей работе рассматриваются структурные и механические свойства композитных наноматериалов на основе хитозана и 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, композитные наноматериалы, клеточная трансплантология, тканевая инженерия.

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

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

Материалы, предназначенные для контакта со средой живого организма и используемые для изготовления медицинских изделий и устройств, получили название «биоматериалы». Исследованиями последних лет заложены пред-

ставления о том, каким комплексом свойств должны обладать биоматериалы, на основе которых могут быть сформированы тканеинженерные наноконструкции для клеточной 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 наноконструкции в организм, стабилизации ее в области повреждения (терапии) и, при необходимости, легкое удаление.

Материал должен обладать комплексом свойств, обеспечивающих биосовместимость наноматрицы [1–5]. К таким свойствам относится отсутствие токсичности при взаимодействии с клетками *in vitro* и *in vivo* и минимализация возможных провоспалительных свойств в ткани. Матрица должна поддерживать адгезию, пролиферацию и, в случае необходимости, дифференцировку клеточных элементов в составе тканеинженерного нанопрепарата. 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 [6].

Таким образом, ключевой проблемой для успеха создания эффективных биоконструкций является наличие адекватного биодеградирующего и биосовместимого наноматериала. 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. Он включает 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, фиброинам шелка) и полиэфирам бактериального происхождения – полигидроксиалканатам (ПГА), синтезируемым микроорганизмами. К недостаткам природных нанобиополимеров относят высокую стоимость их получения, сложность обработки, недостаточную механическую

прочность. Довольно широкое применение в медицине нашли распространенные природные полисахариды хитозан [1, 3] 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 био- и нанотехнологии, наблюдаемое в последние годы, приводит ко все более широкому внедрению в медицине различных соединений, включая высокомолекулярные соединения как синтетического, так и природного происхождения. Разнообразие материалов и особенно полимеров, варьирование в широких пределах. Их стереоконфигурации и молекулярные массы, возможность получения нанокомпозитов в разнообразных сочетаниях с различными веществами, – все это является основой для получения широчайшего спектра новых материалов с новыми ценными свойствами для применения в современной медицине.

Нанокомпозиты – это многокомпонентные материалы, состоящие из полимерной, металлической, углеродной, керамической или другой основы, армированной наполнителями из волокон, нитевидных кристаллов, тонкодисперсных частиц и др. Нанокомпозитные материалы представляют собой смесь двух фаз или более, связанных вместе так, что передача напряжения происходит по их границе [5]. Создание нанокомпозитов 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 [7]. 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 могут быть использованы для создания биопрепаратов нового поколения, но они же несут и потенциальные риски.

Известно, что введение в полимерную матрицу наночастиц различной формы увеличивает механические свойства композита за счет армирующего эффекта наполнителя и структурирования полимера [5,8]. Так, в литературе отмечается улучшение барьерных свойств полимера при введении в него наночастиц натрий монтмориллонита (Na-ММТ) [2]. 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 воздействии на клеточные процессы частиц Na-ММТ, находящихся в полимерной матрице [10].

**Цель работы** – исследование механических свойств нанокompозитных 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.

### Материалы и методы

**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 молекулярной массой 255 кДа, степенью деацетилирования 80%, зольностью 0,5%. Наполнителем являлся Na-ММТ с катион-обменной емкостью 92,6 мэкв/100 г (Southern Clay Products, Inc., США). Пленочные композиционные образцы получали методом формования через щелевую фильеру на стеклянную подложку жидкой композиции, состоящей из 4% раствора хитозана в 2% уксусной кислоте и наполнителя Na-ММТ. При получении таких композитов 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. Лиофилизацию композитного раствора проводили при -50°C 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 постоянного веса.

Использовали культуры дермальных фибробластов ПФЧ-М и мезенхимных стволовых клеток жировой ткани ASCs-1 человека, полученные в ходе стандартных процедур в Институте цитологии РАН (Санкт-Петербург). ПФЧ-М культивировали в питательной среде MEM powder (autoclavable) с добавлением бикарбоната натрия, L-глутамина, 12% эмбриональной сыворотки телят и антибиотиков (100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (все реактивы Gibco, США). ASCs-1 культивировали в питательной среде MEM Alpha Modification с добавлением 15% эмбриональной сыворотки телят и антибиотиков (100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина) (все реактивы Gibco, США).

Клетки культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C, в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> 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% раствором формальдегида в PBS и окрашивали 20 мин 0,1% раствором генцианвиолета. Краситель растворяли 10% 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 помощью калибровочной прямой по величине опти-

ческой 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 в культуральной среде. Полученные образцы среды использовали для культивирования мезенхимных стволовых клеток жировой ткани ASC-1. Клетки высевали в 24-луночные платы с плотностью 50 тысяч 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°C в условиях насыщающей влажности в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>, 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°C. 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 в культуральной среде. 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% растворе формальдегида в PBS на льду. Отмывали от фиксатора раствором PBS трижды быстро и в течение 30 мин на качалке. Далее для перфорации плазматической мембраны клетки инкубировали в течение 5 мин в растворе PBS, содержащем 3% Тритон X-100 (Helicon, Россия). Проводили отмывку аналогично предыдущей. Препараты инкубировали от 30 мин до 12 ч в 1% растворе BSA (Sigma, США) на PBS, который далее также отмывали. Для визуализации фокусов образцы инкубировали последовательно с антителами против  $\gamma$ -H2AX (Abcam, США) и Alexa Fluor® 488 F(ab')<sub>2</sub> 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% растворе BSA (Sigma, США) в PBS. Между инкубациями с

антителами стекла промывали 30 мин в 0,1% растворе Tween-20 (Хеликон, Россия) на PBS.

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

Для исследования *методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ)* была проведена процедура фиксации клеток 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% раствором глутарового альдегида 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 и далее высушивали на воздухе. Затем 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 их 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% 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).

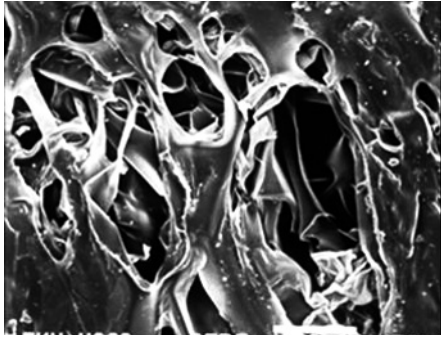


Рис. 1. Электронная микрофотография структуры блочной наноматрицы, синтезированной на основе 0,2% раствора хитозана, после термической обработки (масштабная линейка: 100 мкм)

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 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 наноконструкции (рис. 2).

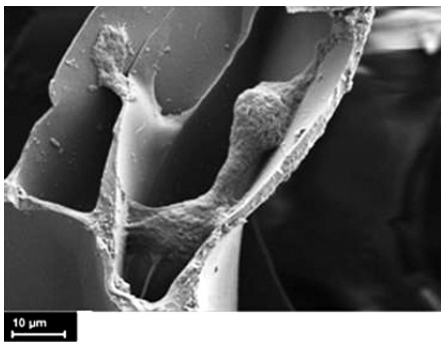


Рис. 2. Электронная микрофотография мезенхимных стволовых клеток жировой ткани ASCs-1, культивированных в толще блочной наноматрицы, синтезированной на основе 4% раствора хитозана

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

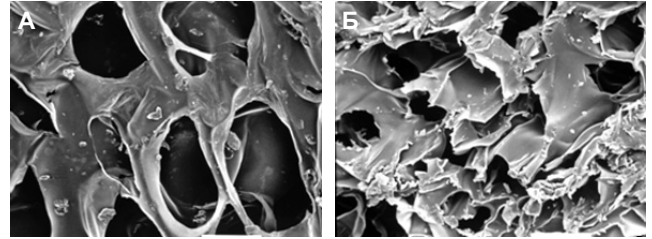


Рис. 3. Электронные микрофотографии композитных наноматриц на основе хитозана, содержащих 10 (А) или 5 (Б) wt% Na-ММТ (масштабная линейка: 100 мкм)

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

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

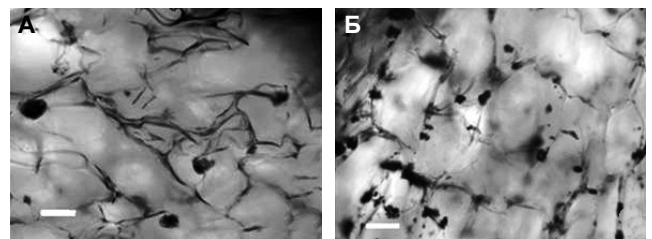


Рис. 4. Культивирование мезенхимных стволовых клеток жировой ткани ASC-1 в толще блочной матрицы на основе хитозана (А) и композита на основе хитозана и 5 wt% Na-ММТ (Б) (масштабная линейка: 50 мкм)

При использовании матрицы на основе хитозана с добавлением 5 wt% Na-ММТ клетки проникают в поры на всем их протяжении, что обеспечивает образование многочисленных жизнеспособных небольших колоний (рис. 4Б). Объемная равномерная пролиферация клеток в толще матриц, содержащих Na-ММТ, обусловлена стабильностью структуры, сохранением сквозной пористости в жидкой среде, что обеспечивает проникновение к клетке 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-ММТ существенно улучшает их механические свойства при использовании для культивирования клеток. На рис. 5 показано, каким образом меняется 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-ММТ повышает прочность и стабильность формы образцов. Добавление Na-ММТ способствует и механической стабильности пленок в ходе стерилизационной обработки путем автоклавирования (1 атм., 1200С, в течение 20 мин). Пленки, не содержащие Na-ММТ, после автоклавирования были подвержены скручиванию, что затрудняло их последующее практическое использование.

Показано, что на поверхности пленочного композита на основе хитозана, содержащего 5 wt% Na-ММТ, наблюдается хорошая адгезия и стабильная пролиферация дермальных фибробластов ПФЧ-М.

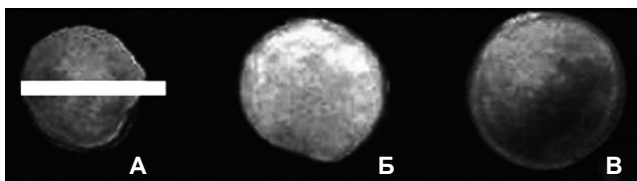


Рис. 5. Фотографии фрагментов матриц на основе хитозана, содержащих 0 (А), 3 (Б) и 5 (В) wt% Na-ММТ, после выдерживания в культуральной среде и высушивания (изначальный размер фрагментов и размер масштабной линейки: 30 мм)

Степень адгезии первичных дермальных фибробластов человека к пленкам на основе хитозана, а также композитным пленкам, содержащим 5 wt% Na-ММТ, сопоставлялась с адгезией клеток к покровному стеклу. Показано, что добавление Na-ММТ улучшает адгезию клеток на пленке (рис. 6).

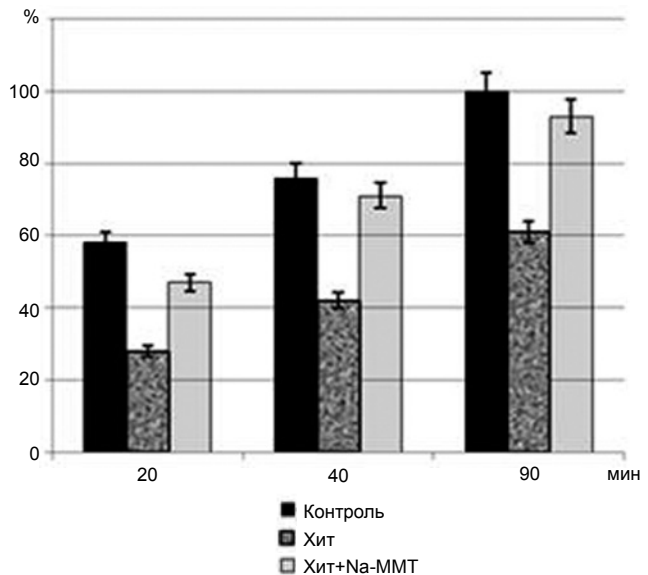


Рис. 6. Степень адгезии дермальных фибробластов человека ПФЧ-М к поверхности покровного стекла (контроль), хитозановой и композитной наноматрицы на основе хитозана, содержащей 5 wt% Na-ММТ

Структура расположения клеток не искажается, видны типичные для фибробластов человека дугообразные траектории роста, без признаков избегания включений Na-ММТ. Клетки имели типичную морфологию и размеры, что свидетельствует об оптимальных условиях адгезии, распластывания, движения и пролиферации (рис. 7).

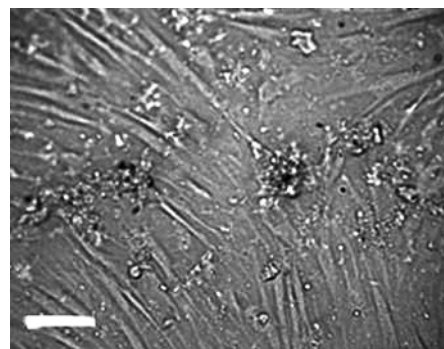


Рис. 7. Культивирование дермальных фибробластов человека ПФЧ-М на поверхности композитной наноматрицы, содержащей 5 wt% Na-ММТ (масштабная линейка: 20 мкм)

**Анализ жизнеспособности мезенхимных стволовых клеток жировой ткани ASCs-1 для выявления цитотоксического действия наноматриц на основе хитозана и композитов на основе хитозана и Na-MMT**

Показатели	Количество жизнеспособных клеток (отн. ед. и %) при различном содержании Na-MMT			
	Без матриц (контроль)	0 wt%	3 wt%	5 wt%
Вид матрицы				
min	0,487	0,457	0,457	0,462
max	0,514	0,502	0,509	0,520
Среднее значение	0,500±0,0110	0,481±0,0226	0,475±0,0297	0,484±0,0312
Относительная оптическая плотность, %	100,0±2,21	96,1±4,52	94,9±5,95	96,9±6,24

*Примечание:* различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

Используя для проведения МТТ-теста питательную среду, в которой проводили экстракцию образцов матриц, исследовали возможное цитотоксическое действие матриц на культуру мезенхимных стволовых клеток жировой ткани ASCs-1. Оказалось, что матрицы, состоящие из хитозана, композиты на основе хитозана и Na-MMT не оказывают достоверного цитотоксического действия на клетки (табл.).

Исследование генотоксического действия материалов на основе хитозана и Na-MMT на фибробласты человека показало, что в ядрах клеток, культивируемых в культуральной среде, в которой до этого инкубировали матрицы на основе хитозана, содержащие 5 wt% Na-MMT, не выявляется стабилизация фокусов гистона гамма-H2AX (рис. 8А), которая является показателем генотоксического воздействия, ведущего к стандартному ответу клетки на повреждение (остановке клеточного цикла и репарации ДНК, апоптоза или индуцированного клеточного старения).

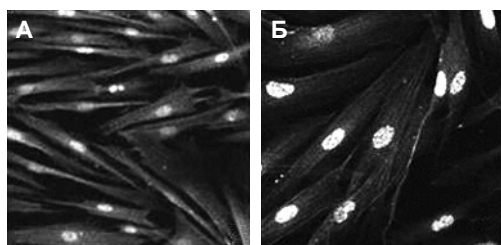


Рис. 8. Иммунофлуоресцентное мечение фибробластов человека ПФЧ-М антителами против гамма-H2AX гистона: А – клетки, культивируемые в среде после инкубации в ней фрагмента композитной матрицы на основе хитозана, содержащей 5 wt% Na-MMT; Б – клетки, в которых введением 500 мкМ перекиси водорода индуцировано образование фокусов гамма-H2AX гистона

Используя аналогичную схему исследования, другие авторы выявили стабилизацию фокусов фосфорилированной формы H2AX в ядрах фибробластов в ответ на воздействие наночастиц диоксида титана [11]. Пример аналогичного воздействия перекиси водорода можно увидеть на рис. 8Б, на котором показано образование в ядрах клеток фокусов гамма-H2AX гистона. Таким образом, можно сделать вывод, что введение в состав композита микро- и наночастиц Na-MMT не оказывает острого генотоксического воздействия на клетки.

Таким образом, проведенные исследования демонстрируют перспективность синтеза композитных наноматериалов на основе 4% раствора хитозана в уксусной кислоте и наполнителя Na-MMT в концентрации 5 wt%. Данный материал не оказывает цито- и генотоксического действия на клетки в составе тканеинженерных наноконструкций. По своим структурным, механическим свойствам и критериям биосовместимости композит пригоден 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.

### Литература

1. Нудьга, Л.А. Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение / Л.А. Нудьга. – М.: Наука, 2002. – 368 с.
2. Lin, K.-F. A novel method to prepare chitosan/montmorillonite nanocomposites / K.-F. Lin [et al.] // J. Applied Polymer Sci. – 2005. – № 98. – P. 2042–2047.
3. Добровольская, И.П. Структура и свойства волокон на основе хитозана, содержащих хризотил и галлуазит / И.П. Добровольская [и др.] //

Высокомолекулярные соединения – 2011. – Т. 53, № 5. – С. 1–7.

4. Добровольская, И.П. Структура и свойства пористых пленочных материалов на основе алифатического сополиамида / И.П. Добровольская [и др.] // Журнал прикл. химии. – 2010. – № 10. – С. 20–24.

5. Yudin, V.E. New polyimide nanocomposites based on silicate type nanotubes: Dispersion, processing and properties Polymer / V.E. Yudin [et al.]. – 2007. – № 48. – P. 1306–1315.

6. Волова, Т.Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии / Т.Г. Волова, Е.И. Шишацкая, П.В. Миронов. – Красноярск : ИПК СФУ, 2009. – 262 с.

7. Шехтер, А.Б. Тканевая реакция на имплантат / А.Б. Шехтер, И.Б. Розанова // Биосовместимость. – М. : Наука, 1999. – 211 с.

8. Hussain, F. Review article. Polymer-matrix nanocomposites, processing, manufacturing, and application / F. Hussain [et al.] // Overview J. Composite Materials. – 2006. – № 40. – P. 1511–1575.

9. Smirnova, V.E. Orientated crystallization in drawn thermoplastic polyimide modified by carbon nanofibers / V.E. Smirnova [et al.] // Polym. Eng. Sci. – 2009. – № 49. – P. 217–222.

10. Голохваст, К.С. Экологические и нанотоксикологические аспекты взаимодействия минералов и белков / К.С. Голохваст, И.Э. Памирский // Вестник новых мед. технологий. – 2010. – № 17 (2), – P. 53–55.

11. Trouiller, B. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice / Trouiller B. [et al.] // Cancer Res. – 2009. – № 69. – P. 8784–8789.

---

А.Б. Смолянинов

e-mail: stemcellbank@inbox.ru