

Новые тканые матрицы на основе рассасывающегося природного полисахарида хитина для культивирования и трансплантации клеток кожи человека

Г.М. Михайлов¹, М.Ф. Лебедева¹, Г.П. Пинаев², Н.М. Юдинцева²,
М.И. Блинова², Е.Ф. Панарин¹

¹ Институт высокомолекулярных соединений РАН

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

G.M. Mikhailov¹, M.F. Lebedeva¹, G.P. Pinaev², N.M. Iudintseva²,
M.I. Blinova², E.F. Panarin¹

¹ Institute of Highmolecular compounds RAS

² Institute of Cytology RAS

**New woven matrix made of resorbed natural chitin polysaccharide
for culturing and transplantation of human skin cells**

Из биологически активного полисахарида – хитина, выделенного из панцирей дальневосточного краба и североморской креветки, методом «мокрого» формования растворов получены моно- и полифиламентные нити. Эти нити резорбируются под действием лизоцима до образования N-ацетилглюкозамина и глюкозамина.

Изучение монофиламентов в условиях культивирования клеток показало сохранение их деформационно-прочностных характеристик.

Из некрученных полифиламентных нитей методом ручного ткачества изготовлены образцы, на которых проведено культивирование нормальных фибробластов кожи человека. Результаты позволяют сделать положительное заключение о возможности выращивания дермальных фибробластов на тканой матрице из хитиновых волокон.

Ключевые слова: хитин, клеточная культура, матрица.

Mono- and polyfilament threads were obtained from biological active polysaccharide – chitin procured from Far East crab shell and North sea shrimp by means of «moisted» formation of solutions. These threads are reabsorbed to N-acetylglucosamin and glucosamin while being acted upon by lysothim.

The investigation of monofilaments in cells culturing showed that they retained the characteristics of deformity and endurance.

Some samples were handmade by weaving from nonlisle polyfilament threads that were used to culture normal fibroblasts of human skin. The results enable positive conclusions to be made about the possibility of dermal fibroblasts growing on woven matrix of chitin fibers.

Key words: chitin, cells culture, matrix.

Введение

Восстановление кожных покровов является одной из важнейших проблем лечения больных с обширными и глубокими ожогами, с трофическими язвами, с травматическими и другими видами повреждений кожи человека. В России количество обожженных достигает 20% от всех травматологических больных, при этом летальность достигает 11%. В США каждый год получают ожоги около 2 млн человек, из них 130 тыс. подвергаются госпитализации, 10–12 тыс. погибают. Множество клиник и лабораторий ведут исследования по разработке новых методов лечения пострадавших.

Традиционный метод – пересадка кожи, взятой у пострадавшего или донора – в случаях обширного или глубокого поражения часто бывает осложнен состоянием пациента, размерами сохранившихся участков кожи или другими обстоятельствами, не позволяющими к нему прибегнуть. В качестве пересадочного материала для закрытия раневой поверхности используют лиофилизированную или замороженную кожу животных или человека или искусственные материалы (ткани, пленки), изготовленные из резорбирующихся или нерассасывающихся полимеров; культивированные *in vitro* на полимерных матрицах кератиноциты и фибробласты [1, 2].

Аллотрансплантаты, полученные от трупов или добровольцев, отторгаются организмом пациента через одну или две недели и, следовательно, являются только временной защитой пораженной поверхности. Девитализированная замораживанием в глицерине или лиофилизированная кожа

животных или человека способствует восстановлению соединительной ткани и кровеносных сосудов и впоследствии рассасывается. Используют также и искусственную кожу, которая состоит из коллагена или хондроитина, или сеток из волокон, заменяющих дерму, покрытых полупроницаемой силиконовой пленкой. Эта пленка после восстановления тканей под ней удаляется и заменяется аутотрансплантатом или выращенными и размноженными *in vitro* кератиноцитами, фибробластами [3].

Методика массового производства кератиноцитов, разработанная около 30 лет тому назад, для клинических целей применяется только несколькими специализированными центрами. В процессе культивирования количество кератиноцитов может увеличиваться в 5–10 тысяч раз. Это означает, что кератиноциты, выращенные из кусочка кожи размером с почтовую марку (1,5 см²), могут покрыть поверхность в 1,5 м², что почти равно поверхности тела человека. Они обладают всеми существенными характеристиками кератиноцитов *in situ* – делятся, дифференцируются, образуют белковые структуры, необходимые для внутриклеточной связи и регуляции процессов клеточного деления и дифференцировки, выделяют цитокины [3].

Использование кератиноцитов в свободной форме *in vivo* не приводит к высокой активности из-за короткого времени их жизни и низкой адгезии к раневой поверхности. С целью пролонгирования действия и увеличения адгезии их к поверхностным тканям раны клетками импрегнировали резорбируемые желатиновые микросферы. Исследования,



выполненные на морских свинках, показали, что эти микросферы ускоряют рост кератиноцитов и образование капилляров. Они могут быть использованы для оптимизации регенерации тканей [4].

Однако покровные материалы на резорбирующей основе гораздо удобнее при трансплантации и закрытии раневых поверхностей, они могут быть использованы для культивирования и последующей пересадки человеческих кератиноцитов и фибробластов. С этой целью были исследованы коллагеновые губки, матричные системы, состоявшие из коллагена, гликозамина и хитозана, а также из коллагена разной степени сшивки дифенилфосфорилазидом [5]. Поскольку коллаген частично денатурировался из-за низкой термостойкости и растворялся при культивировании фибробластов, пролиферация была достаточно низкой. На матрицах, образованных коллагеном, гликозамином и хитозаном, отмечена высокая скорость роста фибробластов. Авторы отмечают эту систему для культивирования и формирования дермального слоя как лучшую из исследованных.

Известны многослойные матрицы. Их авторы [6] испытывали для лечения глубоких ран заменитель кожи, в котором было два слоя из резорбируемых полимеров. Пористый нижний слой служил для лучшей адгезии материала к раневой поверхности. На нем было проведено культивирование фибробластов, а верхний более плотный слой служил подложкой для кератиноцитов.

В качестве матричных материалов были исследованы природные полимеры (коллаген, хитозан), а также создан и исследован обширный ряд синтетических полимеров [6]. Эта работа позволила сформулировать требования к материалам и выбрать соответствующие требованиям полимеры для матриц при регенерации дермальных тканей (коллаген, полилактиды и полигликолиды). В частности, для культивирования клеток кожного покрова с последующей трансплантацией их на пораженные участки было предложено использовать полимеры-носители, которые после восстановления кожного покрова могли бы рассосаться, не причинив никакого вреда организму пациента. Это синтетические полимеры – полидиоксаноны и полигликолиды, на основе которых изготавливают рассасывающиеся в организме пациента хирургические шовные нити – Даксон, Викрил и Этикон.

В отличие от традиционных материалов – кетгута и коллагена, являющихся чужеродными белками и поэтому способными вызывать хронические воспаления, некрозы, инфицирование раны, ее рубцевание и т.д., эти синтетические полимеры не антигенны и не вызывают воспалительных процессов в окружающих тканях. Однако в последнее время появились сообщения, что при медленно заживающих ранах, т.е. в условиях, требующих длительного сохранения деформационно-прочностных свойств имплантированного материала, они преждевременно рассасываются и заживление раны не наступает. Также имеются упоминания о повышении жесткости материалов, что приводило к затруднениям их использования и дополнительному травмированию тканей. При хранении, из-за гидролиза полимера, они резко снижают свои прочностные характеристики. Кроме этого, продукты резорбции синтетических полимеров не являются специфическими для организма пациента материалами и могут вызывать дополнительные осложнения в процессах регенерации кожного покрова.

Переход от биологически инертных полимеров (полигликолиды, полилактиды) к биологически активным системам (полисахаридам), которые позволяют иммобилизовать факторы роста, регуляции пролиферации клеток, открывает широкие возможности регенерации не только кожных покровов, но и других жизненно-важных клеточных систем организма человека. Такими полимерами, из которых возможно

изготовление рассасывающихся в организме пациента материалов, являются природные полисахариды – хитин и его производное – хитозан. Хитин и хитозан распадаются в организме пациента энзиматически (расщепляются под воздействием лизоцима). Скорость резорбции (рассасывания) этих материалов можно изменять, варьируя степень ацетилирования и/или толщину нити. Они устойчивы к гидролизу, что обуславливает их длительную сохранность без существенного изменения механических свойств. Исследования шовных материалов подтвердили, что они фиксируют ткани до наступления полного заживления раны, а позднее рассасываются бесследно, делая шов косметическим, рубцевания тканей не происходит [7, 8].

Следует особо отметить, что хитин и хитозан активируют фагоцитарную активность макрофагов, что приводит к увеличению количества мигрирующих в очаг воспаления фагоцитов. Эти полисахариды не только ускоряют заживление ран, но и способствуют восстановлению кожи на пораженных участках без образования грубых рубцов, потери функциональности, ускоряют образование коллагена, индуцируют новообразование кровеносных сосудов, восстанавливают слизистую оболочку полости рта. Побочных эффектов при этом не наблюдается [7, 9].

Природные полисахариды (хитин, хитозан) резорбируются до необходимых организму веществ: N-ацетилгликозамина или гликозамина. Они обладают иммуномодулирующим, адъювантным, противомикробным, фунгистатическим, противоопухолевым, радиозащитным, ранозаживляющим, антихолестерическим, гемостатическим действием [10]. Изучение цитохимическими методами метаболизма фагоцитирующих клеток показало, что хитин и хитозан увеличивают активность ферментов гликолиза [11]. Частично деацетилированный хитин, используемый при лечении обожженных участков кожи, также активирует макрофаги, демонстрирует высокую иммунологическую активность, расщепляется лизоцимом интенсивнее [7].

Эти природные полисахариды являются перспективными материалами при создании рассасывающихся матриц для культивирования фибробластов и кератиноцитов. Выращенные на таких матрицах культуры клеток кожи человека могут быть использованы для лечения ожоговых и травматических ран. Они обеспечивают сохранность внеклеточного матрикса и нужную ориентацию клеток при переносе трансплантата на раневую поверхность. Можно полагать, что матричные материалы на основе этих природных полимеров окажутся более перспективными, чем материалы на основе коллагена или рассасывающихся синтетических полимеров при культивировании и трансплантации клеток кожи человека.

Сырьевой источник, условия выделения хитина определяют свойства конечного продукта. Для получения волокон необходим высокомолекулярный полимер. А так как наиболее высокомолекулярный хитин может быть получен из панцирей крабов, то это сырье наиболее предпочтительно для получения волокон. Молекулярная масса хитина зависит от источника, из которого он выделен, и от способа выделения. Как правило, она находится в пределах 100–500 тыс. Da, хотя встречаются образцы и более высокомолекулярные – до 1 млн Da. Однако высокая кристалличность и межмолекулярные взаимодействия не позволяют перерабатывать эти полимеры в изделия через расплав, как синтетические. Матричные материалы – волокна и пленки могут быть получены только при переработке растворов этих полимеров.

В 1975 г. С. J. Brine и P. R. Austin предложили для растворения хитина трихлоруксусную кислоту (ТХУК), которая плавится при 57°C [12]. При добавлении к ТХУК 40% хлоралгидрата и 20% метилхлорида был получен 2% раствор хитина. В качестве коагулянта использован ацетон. Осажденное

волокно нейтрализовали раствором гидроокиси калия в изопропанол и промывали водой. Полученное волокно имело прочность (σ) 63 кг/мм² (618 МПа) и удлинение (ϵ) 13%. Сформованные из такого раствора на стеклянной подложке пленки обладали $\sigma = 104$ кг/мм² (1,02 ГПа) и $\epsilon = 44\%$. Эти работы показали возможность мокрого формования хитинового волокна и что, регулируя скорость экструзии и подобрав коагулянт, можно существенно улучшить его механические характеристики [13].

Kifune [14] использовал для растворения хитина смесь ТХУК и хлорированных углеводов: хлорметана, дихлорметана, 1,2-дихлорэтана, 1,1,1-трихлорэтана, и 1,1,2-трихлорэтана. Концентрация ТХУК в смесях составляла 25–75% (вес). Растворение хитина производили при пониженной температуре и получили 1–10% растворы хитина. Волокно формовали через фильеры с $d_{\text{отв}} = 0,04\text{--}0,08$ мм в ацетон с последующей промывкой в метанольной ванне. Высушенное волокно имело $\sigma = 1,67\text{--}3,1$ г/денье (2,15–4,00 МПа) при $\epsilon = 8,7\text{--}20,0\%$. После выдерживания волокна в 0,5% растворе гидроксида натрия прочностные характеристики волокна улучшались до $\sigma = 2,25\text{--}3,2$ г/денье (2,9–4,12 МПа) и $\epsilon = 19,2\text{--}27,3\%$. Полученные волокна были опробованы в качестве рассасывающихся хирургических нитей [16].

Нативный хитин прекрасно кристаллизуется, а это приводит к повышенной жесткости и хрупкости волокон. В данном случае волокна характеризуются высокой эластичностью, удлинение при разрыве достигает 19–27%. Автор не проводил элементный анализ регенерированного хитина и не определял наличие в волокнах хлора.

P.R. Austin et al., описали способ получения хитиновых пленок и волокон. Они использовали прядильные растворы с концентрацией 2% хитина в трихлоруксусной кислоте, растворенной в хлорированных растворителях [17]. Формование волокна осуществляли «мокрым способом» при осаждении в ацетон с последующей обработкой полученного волокна раствором гидроокиси калия в изопропанол и промывкой водой. Однако полученное волокно по данным элементного анализа содержало 5,03% азота и до 9,455% хлора, от которого оказалось невозможно отмыть полученное волокно [18]. Можно предполагать, что трихлоруксусная кислота реагирует непосредственно с хитином, поскольку после отмывания различными растворителями не удается снизить содержание хлора в целевом продукте ниже 5–10 масс. %. Только при длительном воздействии кипящего 1% раствора едкого натра в н-пропанол удалось снизить содержание хлора до 1%. Такое волокно нельзя использовать в качестве хирургического шовного материала, а соответственно и для изготовления матриц для культивирования клеток.

В перечисленных способах для растворения хитина используют трихлоруксусную кислоту, которая является агрессивным реагентом, вызывающим не только интенсивную коррозию оборудования, но и активную деполимеризацию хитина в прядильных растворах на всех стадиях получения конечного продукта.

Названных выше недостатков фактически не имеет комплексный растворитель на основе диметилацетамида (ДМАА) или N-метилпирролидона (N-МП) с 5–10% содержанием LiCl. Эту систему, растворяющую хитин, предложил P.R. Austin в 1977 г. [19]. В таком растворителе можно получить 3–5% растворы хитина, проведя предварительную активацию хитина водой с последующей инклюзией метанолом и безводным DMAA. В качестве коагуляционной ванны был использован ацетон, окончательную промывку волокна осуществляли водой. Сформованное волокно имело $\sigma = 24\text{--}60$ кг/мм² (236–592 МПа) [20]. Использование в качестве осадителя бутанола позволило получить волокна с прочностью $\sigma = 50$ кг/мм²

(493 МПа) [21, 22]. Однако использование этих волокон было ограничено – их использовали только при получении рассасывающихся нетканых перевязочных материалов. Вероятно, причина была обусловлена высокой хрупкостью волокон, низким удлинением при разрыве. В цитированных источниках этой характеристики нитей нет.

Исследуя волокнообразующую способность хитина, мы установили, что причина высокой хрупкости хитиновых волокон обусловлена высокой способностью его к кристаллизации [23]. Было получено хитиновое волокно из 3–3,5% раствора хитина в смеси N-МП/ДМАА 50/50 с 5% LiCl при мокром формовании в осадительную ванну состава DMAA/этиленгликоль/этанол 40/20/40. После промывки водой и сушки волокна имели $\sigma = 390$ МПа и $\epsilon = 3\%$. Исследование полученного волокна методом сканирующей электронной микроскопии показало, что оно имеет ленточно-фибрилярную структуру и разрушение его при растяжении происходит по хрупкому механизму. Такой характер разрушения связан с высокой упорядоченностью макромолекул хитина в волокне, что следует из данных рентгеноструктурного и электронно-микроскопического анализов.

Используя апротонные растворители DMAA и МП, в которых растворяли до 9% хлорида лития, мы получили растворы хитина. Если раствор хитина предохранен от взаимодействия с влагой воздуха, то он сохраняет годами свои свойства (более 5 лет) и из него можно получать волокна с неизменными деформационно-прочностными характеристиками. В этом растворителе гидролиз хитина не происходит. Система DMAA/LiCl – экологична, ее компоненты могут быть регенерированы из растворов.

Увеличение структурной неоднородности системы, при частичном гетерогенном деацетилировании хитина, приводит к затруднениям в процессах кристаллизации полимера при получении волокна и позволяет повысить его эластичность. При степени деацетилирования хитина $\leq 0,30$ волокно завязывается в узел и сохраняет 40% исходной прочности. Гетерогенное деацетилирование связано с жестким воздействием на хитин концентрированной щелочи (30–50%) при высокой температуре и часто приводит к получению продуктов с трудно воспроизводимыми характеристиками. Поэтому включение такой ступени в технологию нецелесообразно из-за нестабильности характеристик получаемого сополимера (растворимость, гелеобразование, возможность образования глюкуроновых кислот и т.д.), не только осложняющих, но часто делающих невозможным получение прядильных растворов и формование волокна [24].

В дальнейшем, изучая влияние условий формования на морфологию и механические характеристики волокон, мы разработали условия получения эластичных хитиновых нитей с достаточной прочностью и сохраняющих прочность в узле до 70% от исходной. Испытания показали, что эти волокна биосовместимы, рассасываются в течение времени, необходимого для полного заживления раны, не аллергенны, их механические свойства полностью соответствуют существующим требованиям к хирургическим шовным материалам. Радиационная, а также обычная жаро-паровая стерилизации не изменяют деформационно-прочностные характеристики волокон.

Такие волокна можно использовать для изготовления рассасывающихся хирургических шовных материалов, а соответственно и для получения тканых матриц для выращивания клеток кожи человека.

Материалы и методы

При проведении работ были использованы: диметилацетамид – фирмы «Вектон» (РФ), который обезвоживали, перегоняли в вакууме и отбирали фракцию, кипевшую при

42°C и остаточном давлении 7 мм. рт. ст.; хлористый литий – кристаллогидрат, обезвоженный при 400°C.

Был использован хитин из крабов, производство АО «Восток–Бор», (Дальнегорск) и североморской креветки (Мурманск).

Из измельченного панциря удаляли остаточный белок и зольные элементы.

Обеззоливание измельченных панцирей крабов осуществляли при охлаждении до 4–10°C многократной обработкой 1 N соляной кислотой; дистиллированной водой удаляли образовавшиеся соли. После чего для удаления остаточного белка хитин обрабатывали 1 N водным раствором едкого натра при 35–45°C, промывали водой, водным раствором 1–5% уксусной кислоты, водой, ацетоном и сушили при 60°C в вакууме. Получен хитин с M 170 тыс. Da. Зола и белки отсутствовали.

Растворение хитина осуществляли в комплексном растворителе – ДМАА + 9% LiCl при комнатной температуре и интенсивном перемешивании. Содержание полимера в растворе – 3% масс.

Формование волокна осуществляли на установке ПИФВ–01, используя шприц – дозатор и фильеру – 300/0,08. Осадительная ванна – спиртовая, пластификационная ванна – вода. Отмывка от волокна хлористого лития осуществлена горячей водой (80°C) до полного отсутствия в промывных водах иона хлора (проба на азотнокислосеребро). Волокна высушены при 105°C.

Полифиламентные волокна характеризуются прочностью до 293 МПа (21,1 сН/текс), сохранением прочности в узле до 70% и удлинением при разрыве – 7,5%. Диаметр монофиламента – 10 мкм.

При использовании фильеры 1/0,4 была получена мононить с прочностью при разрыве 333 МПа, удлинением – 11,7% и с диаметром 80 мкм.

Степень ацетилирования (DA) определяли согласно методике [25]. Навеску полимера или волокна заливали 5 мл раствора 0.1 N соляной кислоты и оставляли на ночь. После такой выдержки проводили титрование щелочью при перемешивании на магнитной мешалке.

Расчет проводили по формулам:

$$DA = \frac{1 - 161Q}{1 + 42Q}; Q = \frac{N \cdot \Delta V}{m},$$

где N – нормальность раствора NaOH (моль/л), ΔV – объем раствора между точками перегиба на кривой титрования (л), m – сухой вес образца полимера (г).

Механические испытания выполнены на универсальной разрывной машине Инстрон–110. Диаграммы растяжения получены на базе образца – 50 мм при скорости нагружения – 5 мм/мин. Образцы перед проведением испытания выдерживали сутки в эксикаторе над концентрированным водным раствором ацетата магния, т.е. при относительной влажности 65%.

Рентгенографические исследования проводили на дифрактометре ДРОН–2 и в камере РКВ–86 с использованием излучения CuK α , фильтрованного никелем. Волокна образованы хитином, имеющим β -структуру и характеризуются мезоморфной надмолекулярной организацией.

Результаты и их обсуждение

Поверхность и морфология на срезе хитинового монофиламента представлена электронно-микроскопическим снимком (рис.1).

Перед сканированием волокно было подвергнуто лущению на 1/3 диаметра. На снимке видна поверхность волокна – левая сторона снимка, и поверхность лущения, которая

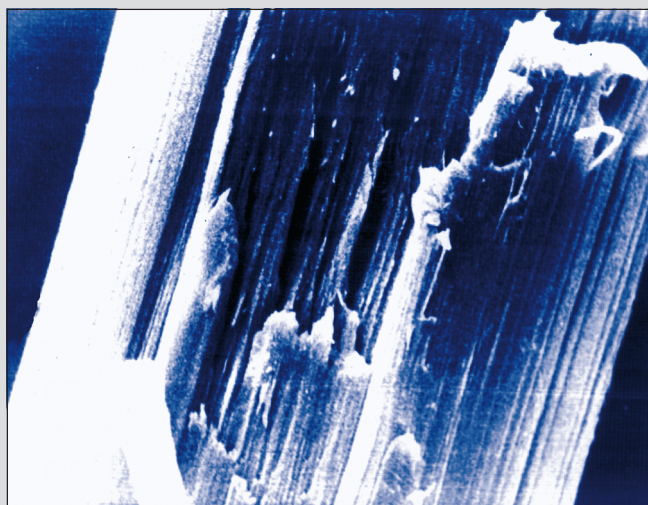


Рис. 1. Хитиновое волокно (монофиламент)
Сканирующая электронная микроскопия. Ув.: $\times 3000$

характеризует его внутреннее строение. Видны протяженные, кристаллоподобные ламеллы, составляющие их микрофибриллы и поры.

С целью выяснения возможных влияний питательной среды, в которой выращивают клетки, на свойства волокон, образцы (монофиламенты), были проверены в условиях культивирования клеток. Их помещали в питательную среду DMEM, в фосфатный буфер – PBS и выдерживали при температуре 37°C. После выдержки в течение разного времени, вплоть до 257 часов, волокна изымали для проведения механических испытаний, как в мокром, так и в сухом состоянии. Результаты испытаний волокон приведены в таблице.

Анализ данных, приведенных в таблице, показывает, что волокно на основе хитина способно длительно сохранять свои механические характеристики в средах для культивирования клеток. Если исходное волокно имело прочность при разрыве 333 МПа, то после выдержки в течение 257 часов при $T = 37^\circ\text{C}$ в среде PBS и последующей сушки его прочность составила 317 МПа, а в среде DMEM – 292 МПа; удлинение при разрыве составило 13%.

Волокно в процессе длительного выдерживания в использованных средах сохраняет достаточно высокий уровень прочности в мокром состоянии (около 250 МПа после выдержки в течение 257 часов) и практически постоянное, близкое к исходному значение удлинения при разрыве – порядка 11%. Это свидетельствует о том, что волокно, длительно находящееся в этих средах, не разрушается и, следовательно, может быть использовано в качестве матричного материала.

С целью выявления возможности культивирования фибробластов из полученных некрученных полифиламентных нитей методом ручного ткачества были изготовлены ленты. Чтобы волокна были закреплены в образцах, ленты проклеивали прядильным раствором хитина, из которого были сформованы и сами хитиновые волокна. Проклейку осуществляли, формируя ткань, которую в дальнейшем использовали в качестве образца для культивирования клеток.

Поскольку адгезионное взаимодействие клеток и матрицы является одним из ключевых факторов, определяющих рост и развитие клеток (в частности, кератиноцитов), матричные образцы подвергали поверхностной модификации, изменяя степень ацетилирования поверхности хитиновых волокон. Были разработаны методы поверхностного деацетилирования

Таблица. Деформационно-прочностные характеристики волокон на основе хитина после выдержки в растворах PBS и ДМЕЛ при $T = 37^{\circ}\text{C}$

Время выдержки, ч	$\varnothing$, мкм	f_p , г	σ_p , МПа	ε_p , %	$\varnothing$, мкм	f_p , г	σ_p , МПа	ε_p , %
После выдержки в PBS					После сушки			
0	80	173	333	11,7				
23	92,9	145	216	10,75	79,3	182,4	366	10,3
48	96,7	154,8	211	12,0	77,5	192,8	393	10,9
100	94,4	145,3	211	11,4	84,3	179,4	318	11,1
180	81,9	149,3	282	11,1	80,0	162,8	318	11,0
257	88,1	153	249	11,8	77,9	152,4	317	13,0
После выдержки в ДМЕЛ					После сушки			
0	80	173	333	11,7				
23	93,75	148,5	213	10,1	76,1	188,6	408	12,1
48	92,1	139	209	10,8	75,6	176,4	388	10,5
100	91,9	150	224	10,6	83,6	196,7	354	11,3
180	76,4	133	298	11,2	77,75	171,4	356	11,1
257	86,9	145,5	246	11,2	78,64	145,3	292	13,0

матриц и оценки степени ацетилирования (СА) хитиновых волокон в матрице. Исходные образцы характеризуются СА = 0,96. Степень ацетилирования остальных матриц изменялась от 0,91 до 0,78.

Известно, что полисахариды являются прекрасными сорбентами. Ткань по сравнению с другими материалами, например, пленками, имеет большую поверхность и, соответственно, обладает большей сорбционной емкостью. Можно было ожидать, что помещение ткани в культуральную жидкость приведет к изменению состава питательной среды, что может повлиять на пролиферацию и апоптоз

клеток. В связи с этим были проведены эксперименты по установлению сорбции ионов железа, кальция и магния.

Оказалось, что в модельных условиях ионы биогенных элементов (магния и кальция) из их водных растворов хитином не сорбируются, а ионы железа сорбируются интенсивно. При этом сорбция ионов железа зависит от их концентрации в растворе и времени контакта. Следовательно, сорбция ионов железа из питательной среды для культивирования клеток может привести к нарушению обмена веществ и, следовательно, к замедлению или прекращению роста клеток.

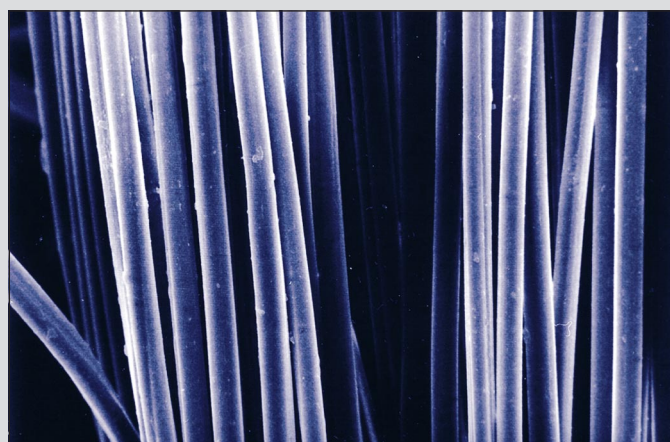


Рис. 2. Исходные хитиновые волокна (СА = 0,96) в тканой матрице без клеток. Сканирующая электронная микроскопия. Ув.: $\times 600$

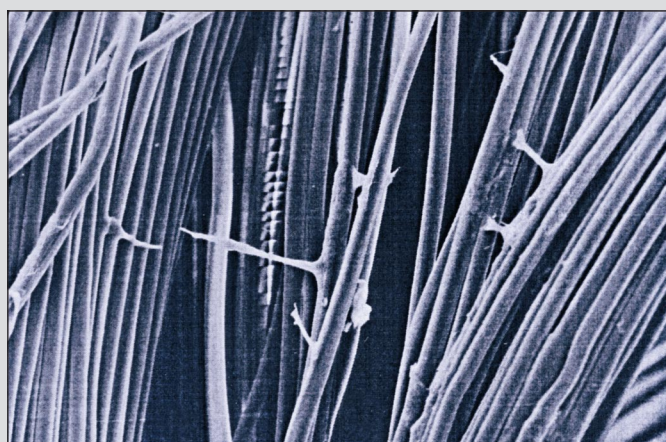


Рис. 3. Хитиновые волокна с СА = 94% матрицы через 5 суток культивирования на них фибробластов кожи человека. Сканирующая электронная микроскопия. Ув.: $\times 400$

Для того, чтобы питательная среда в процессе культивирования клеток не обеднялась, образцы после стерилизации помещали в культуральную среду ДМЕМ с добавлением фетальной сыворотки коров (Hy Clon), которые меняли каждый день в течение 5 суток. На подготовленные таким образом матрицы высевали нормальные дермальные фибробласты кожи человека. Доза посева клеток на каждый образец составляла 10⁵ клеток/см². Из-за того, что тканые матрицы непрозрачны, состояние культивируемых клеток на матрице оценивали методом сканирующей электронной микроскопии.

Результаты тестирования образцов показали, что фибробласты могут адгезироваться к волокнам и расплываться, облегая их слоем с толщиной от 2 до 5 мкм. Между

отдельными удаленными волокнами возникают тяжи фибробластов (рис. 3).

Заключение

Таким образом, из хитина изготовлены волокна и тканые рассасывающиеся матрицы для культивирования на них клеток кожи человека. Полученные результаты позволяют сделать положительное заключение о возможности выращивания дермальных фибробластов на тканой матрице из хитиновых волокон.

Работа выполняется по программе фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине».

ЛИТЕРАТУРА

1. Lanza R., Langer R., Chick W. Principles of Tissue Engineering. 1997; R.C. Landes Company: 273–93.
2. Naughton G.K. Skin and epithelia. Principles of tissue engineering, edited by R. Lanza, R. Langer, W.Chick. 1997. R.G. Landes Company; 769–79.
3. Boranic M., Jakic-Razumovic J., Stanovic S. et al. Skin cell culture: utilization in plastic surgery and laboratory studies. Lijec Vjesn 1999; 121(4–5): 137–43.
4. Kowai K., Suzuki S., Tabata Y. et al. Accelerated tissue regeneration through incorporation of basic fibroblast growth factor – impregnated gelatin microspheres into artificial dermis. Biomaterials 2000; 21(5): 489–99.
5. Vassiere G., Chevallay B., Herbage D., Damour O. Comparative analysis of different collagen-based biomaterials as scaffolds for long-term culture of human fibroblasts. Med. Biol. Eng. Comput. 2000; 38(2): 205–10.
6. Beumer G.J., van Blitterswijk C.A., Bakker D., Ponc M. A new biodegradable matrix as part of cell seeded substitute for the treatment of deep skin defects: a physico-chemical characterization. Clin. Mater. 1993; 14(1): 21–7.
7. Shigemasa A., Minami S. Использование хитина и хитозана в медицине. Кобунши како 1997; 46(2): 27–33.
8. Singh D.K., Ray A.R. Biomedical applications of chitin and chitosan, and their derivatives. J. macromol. Sci. 2000; 40(1): 60–83.
9. Новак А.А., Цыган В.Н., Жоголев К.Д., Никитин Ю.В. Применение препаратов на основе хитина и хитозана в медицине. Проблемы окружающей среды и природных ресурсов. М.: ВИНТИ 2000; 8: 90–106.
10. Жоголев К.Д., Никитин В.Ю., Буланьков Ю.И.. Изучение влияния препаратов хитина и хитозана на течение раневого процесса. // Актуальные проблемы гнойно-септических инфекций. – СПб.1996, С. 36 – 37.
11. Жоголев К.Д., Никитин В.Ю., Цыган В.Н. Препараты на основе хитина

и хитозана в медицине и рациональном питании. Медицинская иммунология 2001; 3(2): 316–7.

12. Brine C.J., Austin P.R. Am. Chem. Soc. Symp. Ser. Marine Chemistry in the Coastal Environment 1975; 1:505–8.

13. Masatoshi Y. et al. JP 8092820. Production of chitin fiber and chitin film. CO8B 37/08.

14. Kifune et al. // U.S. Pat. 4,932,404. Chitin fibers and process for the production of the same. 128/335.5, 334 R; 428/375.

15. Austin et al. // US Pat. 4,062,921. Solvents for and purification of chitin. 264/233.

16. Rutherford E.A., Austin P.R. Proceedings of the 1–st International Conference on Chitin and Chitosan, Cambridge, Massachusetts; 1978.

17. Austin P.R. et al. US Patent 4 029 727. Chitin films and fibers.

18. Austin P.R., Brine C.J. Ger. Offen 2 615 952; Chem. Abstr. 86: 18653a

19. Austin P.R. et al. US Pat. 4,059,457. Chitin solution. CO8B37/08; CO8L5/08.

20. Rutherford F.A., Austin P.R. Proc. 5th Intern. Conf. on Chitin and Chitosan 1977: 182–92.

21. Austin P.R. US Patent 4309534.

22. Kifune K., Yamaguchi Y., Tanse H. US Patent 4 651 725. Wound dressing.

23. Суханова Т.Е., Сидорович А.В., Горяинов Г.И. и др. Высокомолек. соед. Сер. Б 1989; 31(5): 381–4.

24. Нудьга Л.А., Баклагина Ю.Г., Петропавловский Г.А. и др. Высокомолек. соед. Сер. Б 1991; 33(11): 864–8.

25. McCormick C.L., Callais P.A., Hutchinson B.H. Macromolecules 1985; 18: 2394.