

КОМПОЗИТНЫЕ НАНОВОЛОКНА НА ОСНОВЕ ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА И ХИТОЗАНА ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

В.А. Лебедева¹, М.Г. Дроздова², А.Н. Сони́на³, Г.А. Вихорева³, Е.А. Марквичева²

¹ Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

² ФГБУ науки Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва

³ ФГБОУ Московский государственный университет дизайна и технологии, Москва

Электронный адрес: lera-91@mail.ru



Введение

Нановолокна на основе композитных материалов широко используются для восстановления костной, хрящевой ткани, связок, а также в качестве раневых покрытий^[1]. Для создания таких матриц часто используют поливиниловый спирт (ПВС) благодаря его биосовместимости. Для придания биологически активных свойств покрытиям в состав также вводят хитозан, поскольку известно, что покрытия с его добавлением воздухо- и паропроницаемы, препятствуют инвазии раны микроорганизмами извне, обладают антимикробными свойствами, создают оптимальный микроклимат в ране, а также способствуют клеточной адгезии, росту и пролиферации.

Цель данной работы заключалась в получении нановолокон из смесей хитозана с ПВС различного состава, исследовании их структуры и роста клеток на таких композитных матрицах.

Методы и материалы



Рис. 1. Бесфильтровая установка NanospiderTM NS LAB 200S на которой производилось ЭФ.

Получение нановолокон:

Матрицы, используемые в работе, были получены методом бескапиллярного электроформирования (ЭФ) из смеси растворов полимеров в 30%-ной уксусной кислоте^[2]. Перед исследованием образцы стабилизировали термообработкой в течение 3 часов при 115°C и стерилизовали этиловым спиртом и ультрафиолетовым облучением.

Исследование роста клеток на нановолокнах:

В качестве модельной использовали линию клеток мышечных фибробластов L929. Рост клеток контролировали с помощью оптической и конфокальной микроскопии, а количество жизнеспособных клеток определяли с помощью МТТ-теста после 4 дней и 7 дней культивирования.

Образцы нановолокон с клетками для конфокальной микроскопии красили двумя красителями: Hoechst 33342 – для окрашивания ядер клеток синим цветом и Calcein AM – для окрашивания цитоплазм живых клеток зеленым цветом.

Результаты и обсуждения

Были исследованы нановолокна из смесей ПВС с хитозаном (ПВС/Хит) в следующих мольных соотношениях: 90:10, 75:25, 50:50. В качестве контроля также изучали нановолокна на основе ПВС без модифицирующей добавки хитозана. По результатам сканирующей электронной и сканирующей конфокальной микроскопии можно сказать, что структура матрицы и размер волокон напрямую зависят от состава (рис.2 и 3). Добавление хитозана приводит к уменьшению диаметра волокон со среднего для нановолокон ПВС - 1,4 мкм до 1,1 мкм для ПВС:Хит 75:25. Увеличение содержания хитозана до 50 % позволяет получать нановолокна со средним диаметром 0,2 мкм. Кроме того структура нановолокнистого матрикса также изменяется: с увеличением содержания хитозана волокна становятся более плотно упакованы. Такие изменения могут быть объяснены снижением набухаемости нановолокон: введение хитозана, нерастворимого в воде снижает набухаемость волокон на основе гидрофильного полимера ПВС.

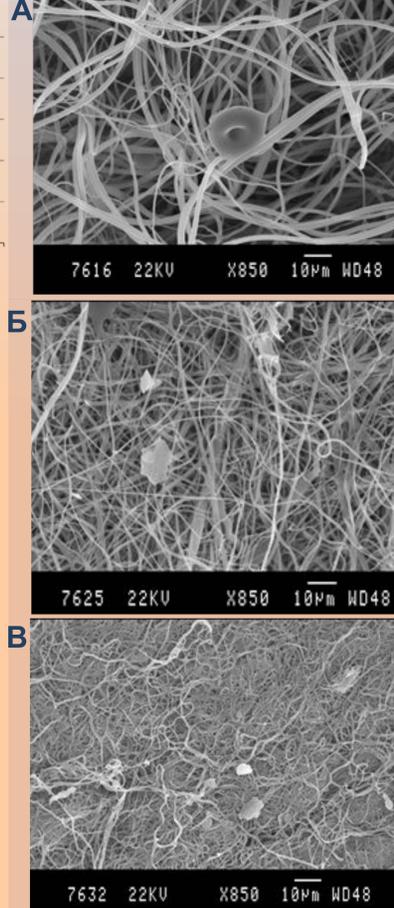
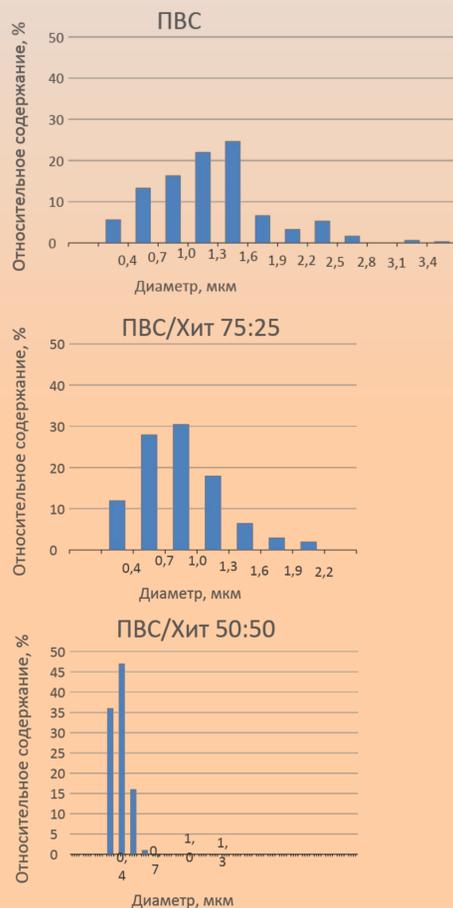


Рис. 3 Микрофотографии нановолокон полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа (А) ПВС, (Б) ПВС:Хит 75:25, (В) ПВС:Хит 50:50.

При изучении роста фибробластов L929 на нановолокнах с помощью конфокальной сканирующей микроскопии было получено, что, благодаря трехмерной структуре матриц с содержанием хитозана 10% и 25%, клетки способны проникать вглубь матриц и равномерно распределяться по всему объему. В случае нановолокон с высоким содержанием хитозана образуется очень плотная структура, не позволяющая проникнуть клеткам вглубь, таким образом представляя двумерную структуру. Это может объяснить результаты МТТ теста, которые показывают, что нановолокна с высоким содержанием хитозана не способны поддерживать пролиферацию в той же мере, что и матрицы на основе волокон с меньшим содержанием хитозана.

Также было показано, что введение хитозана в состав волокон существенно влияет на поведение клеток (рис.4, 5). Так как ПВС является биологически инертным полимером, то включение в состав хитозана способствует созданию благоприятной поверхности для роста и расплывания клеток. При этом наилучший рост клеток наблюдается на нановолокнах ПВС/Хит 90:10 и ПВС/Хит 75:25 благодаря сочетанию

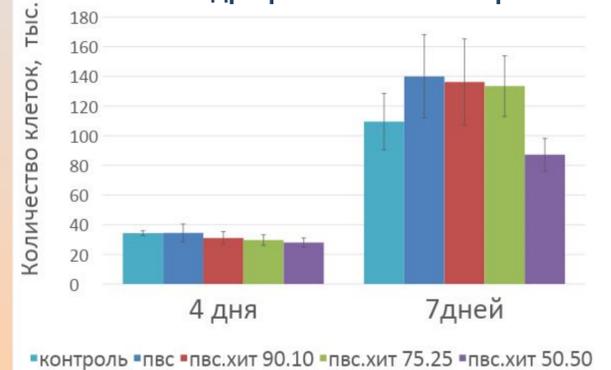


Рис. 4. Выживаемость клеток линии мышечных фибробластов L929. Результат МТТ-теста, контроль (100%) – монослой клеток.

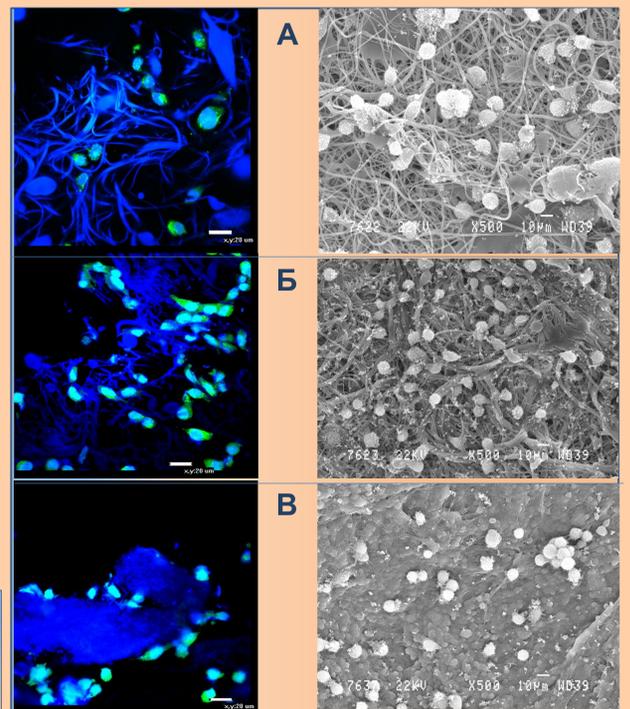


Рис.5 Микрофотографии клеток растущих на нановолокнах полученные с помощью сканирующего конфокального (слева) и сканирующего электронного (справа) микроскопа (А) ПВС, (Б) ПВС:Хит 75:25, (В) ПВС:Хит 50:50

Выводы

По полученным данным можно сделать вывод, что структура матриц и размер исследуемых волокон сильно зависят от содержания хитозана и увеличение содержания этого компонента приводит к уменьшению среднего диаметра волокон и уплотнению структуры.

Кроме того показано, что включение хитозана в состав нановолокон способствует адгезии и расплыванию клеток. При этом оптимальными для роста и пролиферации фибробластов оказались матрицы на основе нановолокон ПВС/Хит 90:10 и ПВС/Хит 75:25.

Таким образом, матрицы на основе таких композитных нановолокон являются перспективными для применения в тканевой инженерии.

Литература

- Janković B., Pelipenko J., Škarabot M., Mušević I., Kristl J. The design trend in tissue-engineering scaffolds based on nanomechanical properties of individual electrospun nanofibers// Int J Pharm. 2013; 455(1-2); 338-347.
- Сони́на А.Н., Вихорева Г.А., Велешко И.Е., Велешко А.Н., Дроздова М.Г., Марквичева Е.А., Гальбрайт Л.С. Структура и свойства хитозан содержащего нановолокна // Химические волокна. 2013; 2: 20-25.