

### 3D-скаффолды на основе хитозана для культивирования клеток и тканевой инженерии<sup>#</sup>

### 3D Scaffolds Based on Chitosan for Cell Cultures and Tissue Engineering<sup>#</sup>

Исследования условий образования и культивирования клеток в 3D-скаффолдах позволяют создавать новые модели для изучения поведения клеток *in vitro* и с новых позиций рассмотреть клеточные механизмы опухолевого роста, регенерации, репарации тканей, формирования клеточных контактов, реакции 3D-структурированных клеточных культур на воздействия химических веществ и физических факторов и ряд других проблем.

Подобные модели в сравнении с обычными культурами клеток, формирующими монослои на подложках, более приближены к реальным условиям *in vivo*. Такие модели также могут быть использованы и в тканевой инженерии для замещения поврежденных органов и тканей (создание моделей для имплантации).

Первым этапом для формирования подобного рода моделей выступает создание подходящих 3D-скаффолдов, совместимых с клетками человека и животных, обеспечивающих комфортное существование клеток за пределами организма в течение длительного времени. Основные требования к скаффолдам: высокая степень пористости, большая площадь поверхности, пригодные размеры пор (порядка 100 мкм), интерконнекция пор, биосовместимость и биодegradация. Исходя из перечисленных требований, хорошей основой таких скаффолдов может быть хитозан – природный биополимер-полиэлектролит, обладающий уникальным комплексом физико-химических свойств и широким спектром биологической активности. Макромолекулы хитозана содержат звенья 2-амино-2-дезоксиглюкопиранозы и некоторую часть

Investigations of conditions of cell formation and culturing in 3D scaffolds enable to create new models for *in vitro* studying of cell behavior and to provide original research of cell mechanisms of tumorous growth, regeneration, reparation of tissue, formation of cell contacts, reaction of 3D-structured cell cultures on effect of chemical substances and physical factors and some other issues.

Such models if compared with the conventional cell cultures, forming monolayers on substrates are closer to real *in vivo* conditions. They may be used in tissue engineering for substitution of damaged organs and tissues (creation of models for implantation).

The first stage in formation of these models was creation of 3D scaffolds, compatible with human and animal cells, providing comfort existence of cells outside of an organism during long-term period. Basis requirements to scaffolds are a high rate of porosity, large surface, pore sizes (on the order of 100 μm), interconnection of pores, biocompatibility and biodegradation. Due to above-mentioned requirements chitosan may be appropriate basis of these scaffolds. It is a natural polyelectrolyte biopolymer with a unique complex of physical and chemical properties and a wide range of biological activity. Macromolecules of chitosan contain chains of 2-amino-2-deoxy-glucopyranose and a part of 2-acetamide-2-deoxyglucopyranose rings, a percentage of the first one in polymer determines a deacetylation rate (DR) of chitosan.

In our research we formed scaffolds from chitosan with a molecular mass of 200 kDa, DR of 82% and 500 kDa, DR of 80.5% (Bioprogress, Moscow), CaCl<sub>2</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaOH, CH<sub>3</sub>COOH ('chemically pure' grade),

<sup>1</sup>Институт прикладной физики НАН Украины, г. Сумы,

<sup>2</sup>Сумской государственной педагогический университет

<sup>3</sup>Медицинский институт Сумского государственного университета

<sup>4</sup>Национальный технический университет «ХПИ», г. Харьков

\*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Петропавловская, 58, г. Сумы, Украина 40030; электронная почта: kalinkevich@gmail.com

<sup>#</sup>Данное исследование было представлено на мини-симпозиуме «День стволовой клетки», проходившем 22 мая 2012 года в г. Харькове.

<sup>1</sup>Institute of Applied Physics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Sumy, Ukraine

<sup>2</sup>Sumy State Pedagogical University, Sumy, Ukraine

<sup>3</sup>Medical Institute of the Sumy State University, Sumy, Ukraine

<sup>4</sup>National Technical University 'Kharkiv Polytechnic Institute', Kharkov, Ukraine

\*To whom correspondence should be addressed: 58, Petropavlovskaya str., Sumy, Ukraine 40030; e-mail: kalinkevich@gmail.com

<sup>#</sup>This research was presented during minisymposium Stem Cell Day, held in Kharkov, Ukraine, on the 22<sup>nd</sup> of May, 2012.

2-ацетиламино-2-дезоксиглюкопиранозных колец, процент первых в полимере определяет степень деацетилирования хитозана (СД).

В нашей работе для формирования скаффолдов был использован хитозан с молекулярной массой 200 кДа, СД 82% и 500 кДа, СД 80,5% («Биопрогресс», Москва),  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (х.ч.),  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , глицерин (фарм.). Электронные микрофотографии получали с помощью растрового электронного микроскопа РЭММА-102 (ОАО «Selmi», Украина). Фазовый анализ образцов, содержащих кристаллическую фазу, проводили методом порошковой рентгеновской дифракции с помощью дифрактометра ДРОН-4 (К $\alpha$  линия меди). Инфракрасные спектры были получены на приборе «Spectrum One» («Perkin Elmer», США).

Важным параметром для скаффолдов является пористая структура. Именно на ее создании концентрируют внимание исследователи. Мы использовали для формирования пор методы лиофилизации, замораживания-желирования [1] и формирования мультимембранных гидрогелей [2]. Нами были получены следующие варианты скаффолдов: хитозановая губка, хитозановые «бусы», хитозан, армированный нанокристаллическим гидроксилапатитом, и мультимембранный гидрогель.

На рис. 1–3 представлены фотографии полученных скаффолдов. Все они (кроме мультимембранного гидрогеля) характеризуются наличием большого количества связанных между собой пор, что дает возможность предполагать успешное заселение скаффолдов клетками. Введение в состав скаффолда гидроксилапатита – биогенного минерала – повышает биосовместимость, улучшает пористость. Использование метода замораживания-желирования дает возможность избежать энергозатратной стадии лиофилизации. При этом функциональные свойства скаффолдов сохраняются.

Мультимембранный гидрогель характеризуется луковичеподобной архитектурой. Межмембранные пространства достаточны для заселения клетками. Мультимембранная структура также может быть

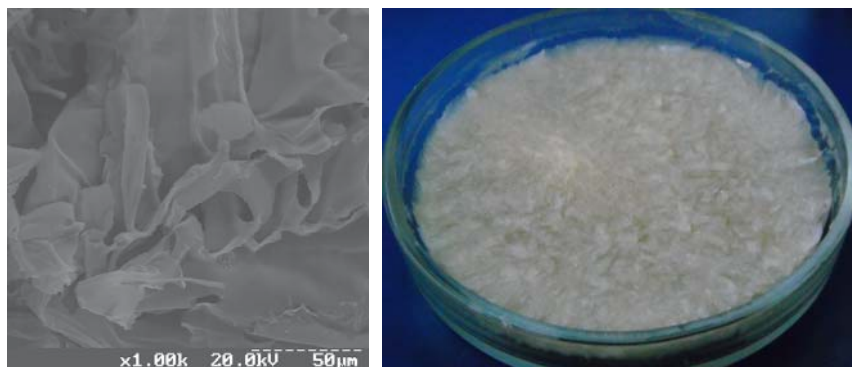


Рис. 1. Лиофилизированная пористая губка на основе хитозана.

Fig. 1. Freeze-dried porous sponge based on chitosan.

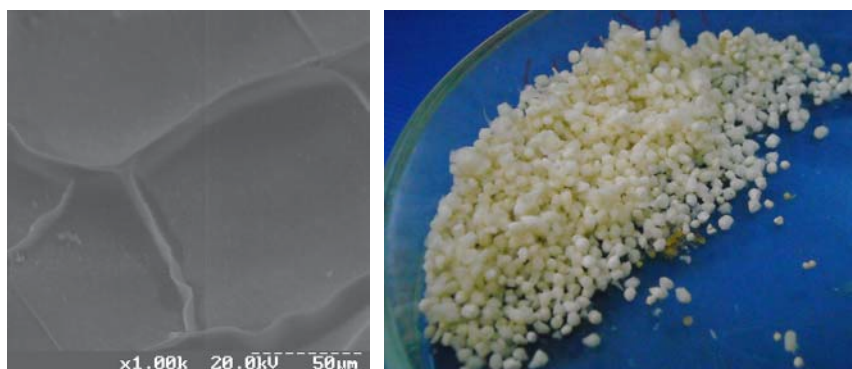


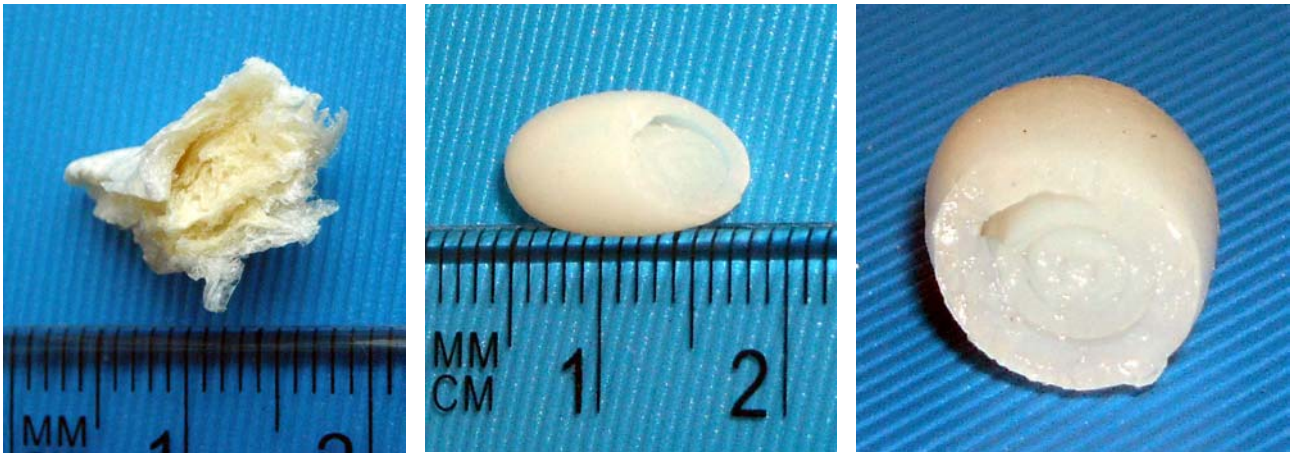
Рис. 2. «Бусы» на основе хитозана.

Fig. 2. Beads based on chitosan.

$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , glycerol ('pharmacological' grade). Electron microimaging was performed with REMMA-102 raster electron microscope (Selmi, Ukraine). Phase analysis of samples, containing crystal phase was performed by powder X-ray diffraction with DRON-4 diffractometer (K $\alpha$  cuprum line). Infrared spectra were obtained with Spectrum One device (Perkin Elmer, USA).

Important feature of scaffolds is a porous structure. Namely its formation is the main target for investigators. To form the pores we used freeze-drying, freeze-gelation [1] and creating of multimembrane hydrogels [1]. There were obtained the following variants of scaffolds: chitosan sponge, chitosan beads, hydroxylapatite nanocrystal armoured chitosan and multimembrane hydrogel.

Figures 1–3 represent the images of obtained scaffolds, which (except multimembrane hydrogel) were characterized by the presence of a large number of connected pores, that allowed to expect a successful colonization of scaffolds by cells. Introduction of hydroxylapatite (biogenic mineral) into scaffold increased biocompatibility and improved porosity. The usage of freeze-gelation enabled to avoid energy consumption at freeze-drying and moreover to preserve functional properties of scaffolds.



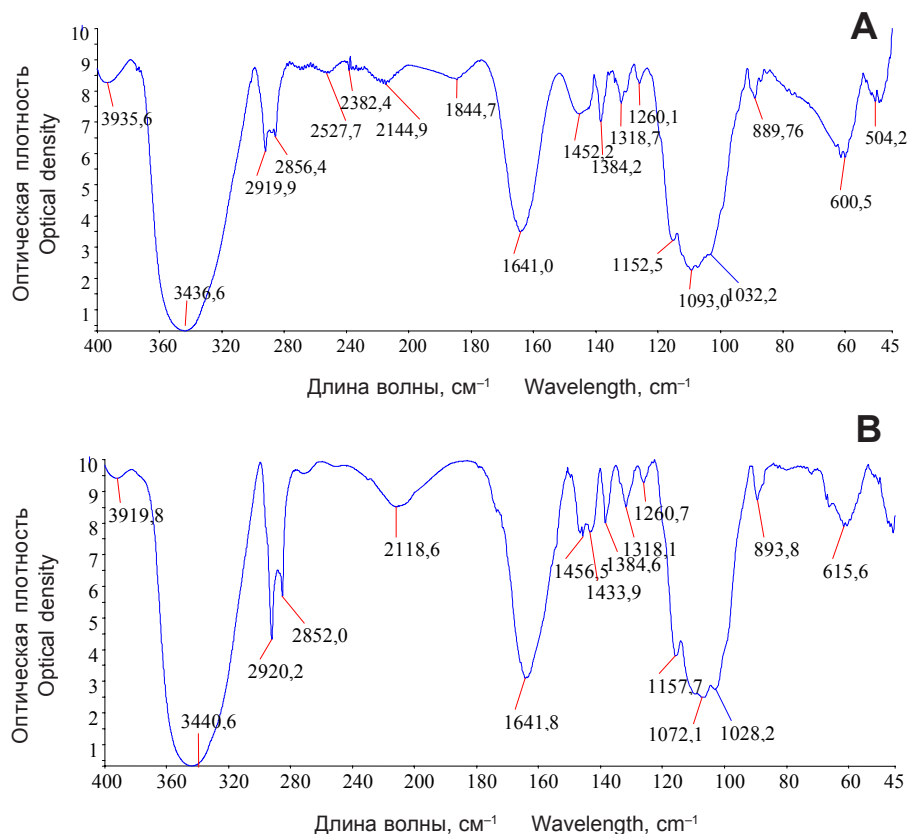
**Рис. 3.** Нелиофилизированная губка (слева) и мультимембранный гидрогель (в центре и справа).  
**Fig. 3.** Non-freeze-dried porous sponge (left) and multimembrane hydrogel (in the centre and at the right).

использована для одновременной доставки в пораженный орган нескольких несовместимых ингредиентов, а также для моделирования процессов, происходящих в клетке, разделенной, как известно, на компартменты мембранными структурами.

ИК-спектры чистого порошка хитозана и скаффолда (рис. 4) свидетельствуют о том, что в процессе формирования необходимой нам структуры не происходят изменения в химическом составе материала,

Multimembrane hydrogel is characterized by a bulb-like architecture. Intermembrane spaces are sufficient for population with cells. Multimembrane structure can be also used for simultaneous delivery of several non-compatible ingredients in affected organ as well as for modeling of processes occurring in a cell divided as known in compartments by membrane structures.

Infrared spectra of pure chitosan powder and scaffold (Fig. 4) attest the fact that when a necessary struc-

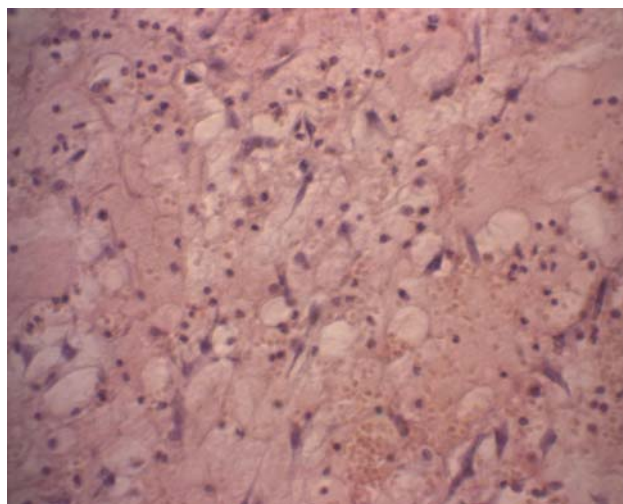


**Рис. 4.** Инфракрасные спектры исходного хитозана (А) и скаффолда на основе хитозана – «бусы» (В).

**Fig. 4.** Infrared spectra of initial chitosan (A) and scaffold on the base of chitosan, beads (B).

**Рис. 5.** Подкожная имплантация скаффолда, 7 дней после операции, ×400. Проникновение фибробластов в поры материала.

**Fig. 5.** Subdermal implantation of scaffold, a week after surgery, ×400. Penetration of fibroblasts in pores of the material.



что важно для сохранения биологических свойств хитозана по отношению к клеткам.

О биосовместимости скаффолдов свидетельствует тест с подкожным вживлением (на примере скаффолда, содержащего гидроксилапатит) (рис. 5). Через 1 неделю поры импланта заполнены клетками.

Таким образом, использование природного биополимера хитозана в скаффолд-технологиях позволяет получить биосовместимые трехмерные матрицы различной морфологии и архитектуры для культивирования клеток с сохранением биологических свойств хитозана.

ture is forming the chemical composition of material is not changed that is essential for preserving biological properties of chitosan in relation to cells.

Test with subdermal implantation of scaffold containing hydroxylapatite testifies to the biocompatibility of scaffolds (Fig. 5). In a week the implant pores are filled with cells.

Thus, the use of natural biopolymer chitosan in scaffold technologies allows to obtain biocompatible 3D matrices of different morphology and architecture for cell culturing and to preserve the biological properties of chitosan.

### Литература

1. Ho M.-H., Kuo P.-Y., Hsien H.-J. et al. Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods // *Biomaterials*. – 2004. – Vol. 25, №1. – P. 129–138.
2. Ladet S., David L., Domard A. Multi-membrane hydrogels // *Nature*. – 2008. – Vol. 452, №7183. – P. 76–79.

### References

1. Ho M.-H., Kuo P.-Y., Hsien H.-J. et al. Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods // *Biomaterials*. – 2004. – Vol. 25, N1. – P. 129–138.
2. Ladet S., David L., Domard A. Multi-membrane hydrogels // *Nature*. – 2008. – Vol. 452, N7183. – P. 76–79.

*Поступила 01.06.2012*

*Accepted 01.06.2012*