

*O. Manchenko, V. Nizhnik, L. Linets*

## CHEMICAL PLASTICIZATION OF POLY(ALKYL METHACRYLATES)

*The changes of glass transition temperature ( $T_g$ ), the cohesion energy ( $E_{coh}$ ), cohesive energy density ( $e_{coh}$ ), shear modulus ( $G$ ), specific thermal expansion coefficient ( $e_{ve}$ ) (in a highly elastic state) value in the poly(alkyl methacrylates) and their copolymers with vinyl butyl ether were analysed. The dependences of the characteristics of poly(alkyl methacrylates) on the van der Waals volume of macromolecule ( $VW$ ) were established.*

*It was shown that increasing the macromolecule chain kinetic flexibility of the methyl methacrylate with vinyl butyl ether copolymer is achieved by increasing the free volume fraction of the polymer, and the same effect in the buthyl methacrylate - vinyl butyl ether copolymer is achieved mainly by decreasing of units polarity (their average dipole moment) and the cohesive energy density. This reduces the attraction forces between macromolecules.*

**Key words:** poly(alkyl methacrylates), chemical plasticization, glass transition temperature, chain flexibility, dipole moments, Van-der-Waals volume.

*Матеріал надійшов 25.01.2013*

УДК 544.72.05: 576.535

*Білько Д. І., Загородько О. В., Антонюк Н. Г., Колесник І. С., Борбуляк І. З.*

## ХІТОЗАН-КОЛАГЕНОВІ ПЛІВКИ ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ НАЩАДКІВ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

*Розроблено методикау отримання плівок на основі хітозан-колагенових комплексів, придатних для вирощування нащадків мезенхімальних стовбурових клітин. Отримані плівки мають задовільні механічні та оптичні характеристики, що уможливує їх використання як біосумісних матриць для культивування адгезивно залежних клітин. Експерименти *in vivo* показали, що отримані мембрани резорбують у організмі протягом 40 діб.*

**Ключові слова:** хітозан, колаген, плівки, стовбурові клітини.

### Вступ

Використання речовин природного походження у медицині є актуальним, що пояснюється їх низькою енергетичною цінністю, дешевизною промислового процесу отримання, сумісністю з організмом людини та придатністю до хімічної модифікації. До таких речовин належать біополімери, які виділяють з організмів нижчих та вищих рослин і тварин. Найбільш перспективним є використання як біополімеру хітозану, його похідних та комплек-

сів на їх основі.

Такі комплекси характеризуються біосумісністю, також бактерицидністю й широко застосовуються в медицині, косметології та тканинній інженерії. Пошук та впровадження біосумісних матеріалів пришвидшило би появу штучних органів, які не відторгалися б організмом. Для цього, перш за все, треба визначити умови культивування клітин різного походження, у тому числі мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин на таких матеріалах. Це дозволить також вивчати питання

культивування адгезивно залежних стовбурових клітин на полімерних носіях. Дослідження такого плану є дуже актуальними, тому що вирощені на біополімерній підложці стовбурові клітини здатні до проліферації та диференціювання, а сам матеріал може стати зручним біосумісним носієм для стовбурових клітин у експериментальних, а з часом і клінічних дослідженнях. Впровадження такої технології стало б революційним досягненням у клітинній та тканинній біоінженерії.

### Матеріали і методи

Були використані хітозан молекулярної маси 750 кДа (Fluka, Японія); колаген типу I (Fluka, Японія); целюлоза хірургічна, стерильна; живильне середовище (RPMI-1640 з підвищеним вмістом глюкози з L-глутаміном, 110 мг/мл, фетальна теляча сироватка (Sigma, Японія); ацетатна кислота (ч. д. а.); гідроксид натрію (ч. д. а.); етанол (96%); глутаровий ангідрид (Sigma, Японія); сульфатна кислота (ч. д. а.); перйодат натрію (ч. д. а.); антибіотики – бенпеніцилін та стрептоміцин («Київмедпрепарат»).

*Методики одержання та дослідження плівок.* Хітозанові плівки одержували трьома різними методиками з 1,5 мас. % розчину хітозану в 1,5 % оцтовій кислоті. Отриманий розчин рівномірним шаром наносили на чашки Петрі. За першою методикою чашки Петрі витримували при 40-80 °C для випарювання розчинника. За другою – плівки зшивали глутаровим альдегідом з концентрацією 0,2 % та 0,02 %. Згідно з третьою методикою, плівки зшивали сульфатною кислотою з концентрацією 2-50 %. Отримані плівки спочатку відмивали бідистильованою водою для видалення залишків зшивальних агентів, а потім обробляли розчином лугу для нейтралізації оцтової кислоти.

Для приготування хітозан-колагенових плівок використовували розчини суміші хітозану і колагену в різних пропорціях (від 1:2 до 10:1).

Для одержання хітозан-колагенових плівок з фібрами целюлози окиснену перйодатом натрію та відмиту дистильованою водою фібру целюлози при перемішуванні додавали до розчину суміші хітозану (0,015 г/мл) і колагену (0,015 г/мл) в 2 % оцтовій кислоті. Отриманий розчин рівномірним шаром наносили на чашки Петрі і висушували при температурі 40-45 °C протягом 7 годин. Плівки після виготовлення промивали бідистильютом до нейтральної реакції.

Для дослідження структури плівок використовували методи ІЧ-спектроскопії та світлової мікроскопії. Фізико-механічні властивості досліджували за допомогою розривної машини 2166 P-5. Гідрофільність поверхні визначали методом сидячої краплі.

Плівки стерилізували двома способами. В одному випадку плівку зневоднювали шляхом поступового занурення в розчини етилового спирту різної концентрації і зберігали в його 70 % розчині. Для використання плівку повертали до нормального стану шляхом зворотного занурювання у фізіологічний розчин.

У другому випадку плівки після виготовлення промивали бідистильютом до нейтральної реакції, а потім обробляли розчином антибіотиків (бензпеніциліну (50 од/мл) та стрептоміцину (100 мкг/мл)). Плівки зберігали у розчині антибіотиків до моменту застосування.

*Методика культивування клітин.* Мезенхімальні клітини отримували зі стегнової кістки щура Вістар. Підрахунок та життєздатність клітин визначали у камері Горяєва із забарвленням трипановим синім. Клітини у концентрації  $1 \times 10^5$  переносили на підготовані стерильні мембрани та культивували у живильному середовищі RPMI-1640 з додаванням 10 % фетальної телячої сироватки. Культури підтримували в умовах інкубатора при 37 °C в атмосфері з 5% CO<sub>2</sub>.

*Дослідження біосумісності отриманих плівок in vivo.* Визначення біосумісності плівок *in vivo* проводили шляхом їх імплантування в організм щура Вістар підшкірно та в черевну порожнину. Аналізували плівки через 37-40 діб після імплантування.

*Дослідження адгезивних властивостей плівок.* Матеріалом для перевірки цитотоксичності мембран слугувала культура адгезивно залежних мезенхімальних клітин кісткового мозку щура у фазі експансійного росту з рівнем конфлюєнції 40-60 %. Формовані відмиті плівки діаметром 5 мм поміщали у культуральне середовище та залишали на 24-36 годин.

Для виявлення адгезії клітин використовували методи інвертованої світлової мікроскопії і фотографування поля зору мікроскопу з використанням камери.

### Результати та їх обговорення

*Дослідження плівок методом ІЧ-спектроскопії.* З використанням ІЧ-спектроскопії було досліджено плівки з хітозану, незшиті та зшиті сульфатною кислотою та глутаровим альдегідом, хітозан-колагенові

плівки і хітозан-колаген-целюлозні плівки.

Характерними коливаннями хітозану (рис. 1) будуть коливання, які відповідають вільним аміногрупам:

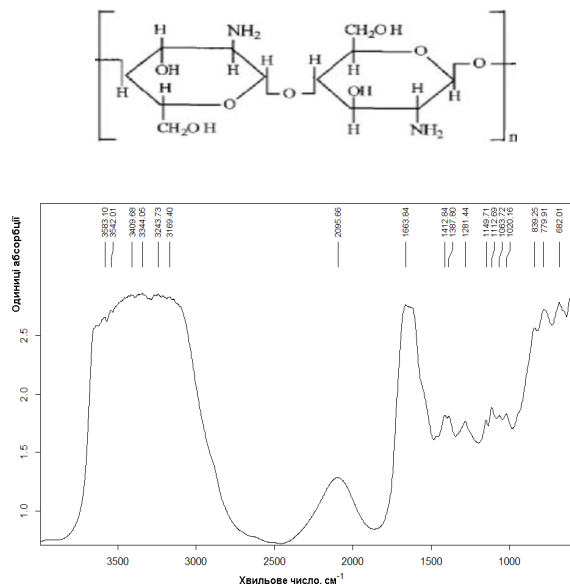


Рис. 1. ІЧ-спектр хітозану

На ІЧ-спектрі хітозану видно широкий пік, що відповідає поглинанню ОН-груп у межах  $3583\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$  і уширений пік аліфатичного  $\text{--C--H}$  зв'язку при  $3243\text{--}3169\text{ cm}^{-1}$ . Піки коливання  $\text{--OH}$  і аліфатичного  $\text{--C--H}$  зв'язків накладаються і утворюється широкий пік у межах  $3580\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ . Аміногрупи в позиції С2 глюкозаміну дають два піки – при  $1281\text{ cm}^{-1}$  і  $1020\text{ cm}^{-1}$ . Пік при  $1663\text{ cm}^{-1}$  відповідає ацетилюваним аміногрупам хітину, що вказує на неповне дезацетилювання. Пік при  $1387\text{ cm}^{-1}$  відповідає  $\text{--C--O}$  зв'язку первинної спиртової групи ( $\text{--CH}_2\text{OH}$ ). При взаємодії колагену і хітозану в розчині утворюються переважно водневі зв'язки і в незначній кількості – ковалентні (рис.2).

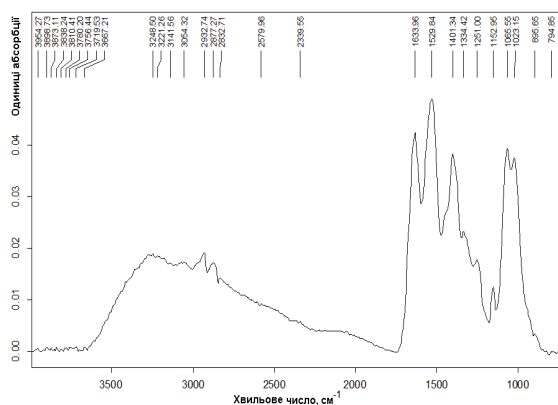


Рис. 2. ІЧ-спектр незшитої колаген-хітозанової плівки

ІЧ-спектр незшитої колаген-хітозанової плівки свідчить про те, що піки коливання  $\text{--OH}$  і аліфатичного  $\text{--C--H}$  зв'язків накладаються і утворюється широкий пік в межах  $3580\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$ . Характеристичний пік хітозану – аміногрупи в позиції С2 глюкозаміну дають піки при  $1265$  і  $1023\text{ cm}^{-1}$ . Пік при  $1633\text{ cm}^{-1}$  відповідає амідним групам хітину і колагену. Поглинанню  $\text{--OH}$  груп колагену відповідають два піки –  $1023$  і  $1152\text{ cm}^{-1}$  (валентні коливання вуглеводних компонентів, зв'язаних із білком). Адсорбція при  $1334$ ,  $1401$  і  $1251\text{ cm}^{-1}$  відповідає коливанням  $\text{--CH}_2$  і  $\text{--CH}_3$  груп (коливальні й деформаційні) і  $\text{C--N}$  (валентні коливання). Піки, які відповідають амідам I і II, виявлені при  $1633$  і  $1529\text{ cm}^{-1}$ .

Для покращення фізико-механічних властивостей плівок проведено їх модифікування різними зшивальними агентами. Глутаровий альдегід, який належить до найпоширеніших зшивальних агентів, здатен утворювати основи Шиффа з хітозаном і колагеном [1]. Результатом зшивання глутаровим альдегідом є збільшення механічної міцності плівки, але при цьому зменшується гідрофільність (через зменшення кількості вільних аміногруп) [2] і з'являються довгі гідрофобні алкільні ланцюги. У результаті знижується вибіркова проникність плівки чи мембрани [3].

Оскільки глутаровий альдегід збільшує крихкість плівок і є токсичним для біологічного матеріалу, в подальшій роботі як зшивальний агент використовували сульфатну кислоту.

Сульфат-іони існують в широкому інтервалі рН. Було показано, що зшивання відбувається за рахунок електростатичних зв'язків між  $\text{NH}_4^+$  групами хітозану та сульфат-іоном. Зшивання сульфатною кислотою призводить до зменшення проміжків між молекулами і зменшення рухливості хітозанових молекул. Отримані ІЧ-спектри хітозан-колагенових плівок, зшитих сульфатною кислотою, підтверджують наявність сульфогруп. Механізм зшивання наведено на рис. 3.

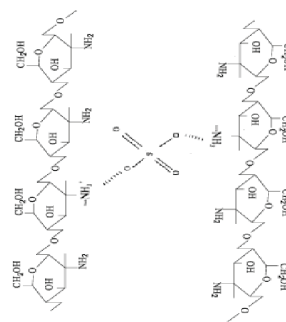


Рис. 3. Механізм зшивання хітозанових ланцюгів сульфатною кислотою

На ІЧ-спектрі колаген-хітозанової плівки, зшитої сульфатною кислотою, видно характеристичний пік сульфогрупи при  $1027\text{ см}^{-1}$ , який зливається з піком аміногруп хітозану (рис. 4).

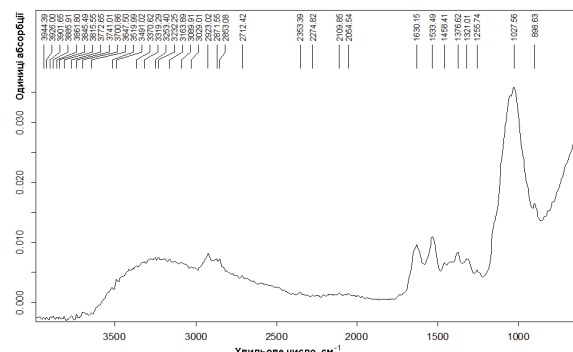


Рис. 4. ІЧ-спектр колаген-хітозанової плівки, зшитої сульфатною кислотою

При культивуванні клітин із часом відбувалися зміни в структурі плівки (спостерігався перехід у гелеподібний стан). Для надання плівці більшої міцності до формувального розчину додавали волокна окисненої целюлози (рис. 5).

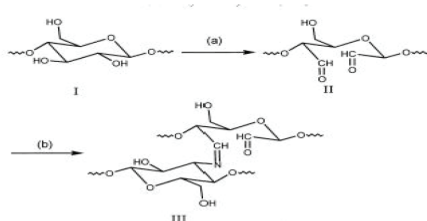


Рис. 5. Механізм взаємодії целюлози, окисненої періодатом натрію, з хітозаном: а – періодат натрію; б – хітозан

На ІЧ-спектрі колаген-хітозанової плівки з волокнами окисненої целюлози видно, що піки коливання  $\text{-OH}$  і аліфатичних  $\text{-C-H}$  зв'язків накладаються, і утворюється широкий пік у межах  $3580\text{-}2000\text{ см}^{-1}$  (рис. 6).

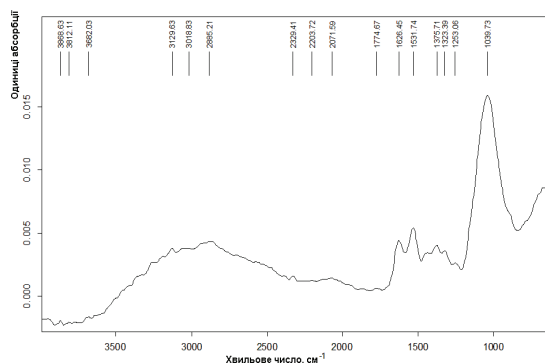


Рис. 6. ІЧ-спектр колаген-хітозанової плівки з волокнами окисненої целюлози

Фізико-механічні властивості отриманих плівок досліджено з використанням розривної машини 2166 Р-5. Результати досліджень представлені в табл. 1.

Таблиця 1. Фізико-механічні властивості хітозанових та хітозанвмісних плівок

Плівка	Міцність при розриві, $\sigma$ , МПа	Відносне видовження, $\epsilon$ , %
Хітозанова	43,0	7,7
Хітозан-целюлозна	20,7	30,0
Хітозан-колагенова	35,7	25,5
Хітозан-колаген-целюлозна	44,1	35,0

Модифіковані целюлозою плівки, хоча і мають меншу міцність при розриві, проте характеризуються більшим відносним видовженням (приблизно в 4 рази), тобто є еластичнішими, що забезпечує відповідну механічну міцність плівки, робить її придатною для проведення експериментів без порушення цілісності.

Проведення кореляції між величинами крайового кута змочування і біосумісністю дозволили встановити, що при значенні цього кута приблизно  $60^\circ$  матеріал придатний до використання в медичних цілях. У результаті серії дослідів було отримано ряд значень крайових кутів змочування, наведених у табл. 2.

Таблиця 2. Усереднені значення крайових кутів змочування водою для хітозанових та хітозанвмісних плівок.

Тип плівки	Усереднене значення крайового кута змочування поверхні
Хітозанова	45
Хітозан-колагенова (2:1)	52
Хітозан-колагенова (1:1)	50
Хітозан-колагенова (1:2)	53
Хітозан-колагенова (1:1) з волокнами окисненої целюлози, зшита глутаровим альдегідом	67
Хітозан-колагенова (1:1) з волокнами окисненої целюлози, зшита сульфатною кислотою	57

Однак значення крайового кута змочування лише в першому наближенні вказують на біосумісність, оскільки ефекти змочування можуть залежати від мікрогетерогенності, шор-

сткості поверхні, пористості і об'єму модифікувального шару.

Оптимальніше значення крайового кута змочування води для прогнозування біосумісності має хітозан-колагенова плівка з волокнами целюлози, зшита сульфатною кислотою.

*Дослідження біосумісності плівок in vivo.* У черевну порожнину та підшкірно щурам кластеру Вістар під загальним наркозом введено по одній плівці кожного типу. Розріз зшивали шовним матеріалом, який не резорбує в організмі. Щурів позначали відповідно до стандартної методики. Експеримент тривав протягом 37-40 днів.

Через 37-40 днів здійснювали пошаровий розріз на межі шкірної і власної фасції передньої і бокової черевної стінки з лівого боку. Виявлено конгломерат сполучної тканини в лівій пахвинній частині. Васкуляризація відсутня. Плівка викликала активацію сполучної тканини. Сама плівка практично відсутня, але суцільно інфільтрована елементами сполучної тканини.

Плівки, отримані осадженням шляхом занурення, не виявлені ні в черевній порожнині, ні під шкірою, що свідчить про те, що вони повністю резорбували (табл. 3).

*Адгезія клітин та життєстійкість.* Як контроль використовували культуру мезенхімальних клітин кісткового мозку, вирощену на культуральному пластику.

Зшита хітозан-целюлозна плівка має пористу структуру. Ріст клітин у товщі плівки спостерігається дуже рідко, часто – відсутній. У плів-

ці клітини, асоційовані з фіброю, трапляються дуже рідко, частіше відсутні. Характер плівки можна описати як слабкоопалесцентний або прозорий. Ріст клітин на пластику задовільний. Чіткого краю у плівки немає (рис. 7), що свідчить про перехід полімерів у гелеподібний стан.

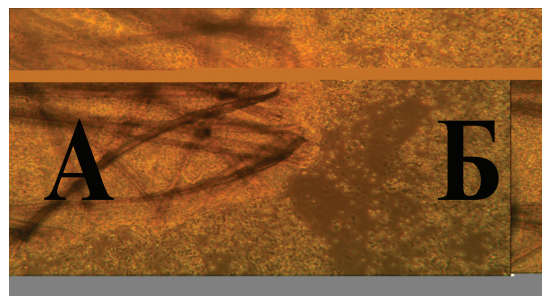


Рис. 7. Клітини на поверхні хітозан-целюлозної плівки (А) та на поверхні культурального пластику (Б) (x100)

*Адгезія клітин на зшитих хітозан-колагенових плівках із волокнами окисненої целюлози.* Спостерігається значний ріст сфероподібних клітин після 14-денного культивування як на пластику, так і на плівці. Клітини займають усю площу і глибину плівки. 40 % клітин асоційовані з фіброю, інші – у товщі плівки. Через 14 днів відмічалася часткова деструкція плівки. Шматки плівки містили велику кількість клітин. Край плівки чіткий і не розірваний. Як контроль використовували культуру клітин, вирощену з додаванням фібри на культуральному пластику. У контрольного зразка спостерігали слабку асоціацію клітин із

Таблиця 3. Показники біосумісності плівок різних типів при імплантації щурам Вістар

Плівка	Імунна відповідь	Стійкість	Біологічна активність	Патології та аномалії
Осаджена зануренням	-	>15 днів	-	-
Хітозанова (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Фібозна капсула	25-30	-	-
Хітозан-колагенова(H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	-	35-40	Інфільтрована сполучною тканиною	-
Хітозан-колаген-целюлозна (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	-	35-40	Інфільтрована сполучною тканиною	-

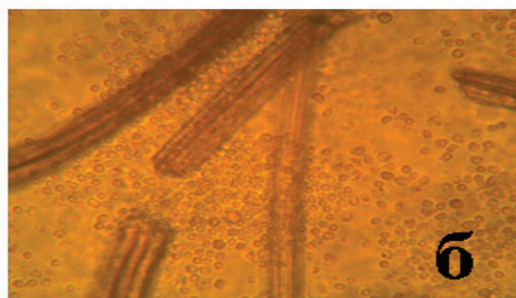
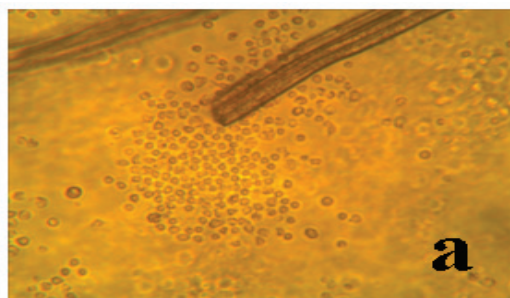


Рис. 8. Культура клітин на хітозан-колаген-целюлозних плівках (x400)

фіброю.

При великому збільшенні (рис. 8) видно колонію клітин (8, а), що вказує на наявність серії поділів цих клітин і колонію клітин, асоційованих з целюлозною фіброю (8, б).

При культивуванні клітин понад 21 добу і більше спостерігається значний рівень деструкції плівки та випадіння фібри на поверхню пластика. Залишки гелеподібної плівки містять велику кількість клітин. До 5 % клітин асоційовані з фіброю у гелі. Частки зруйнованої плівки трапляються по всій площі поля зору. Чіткого краю немає.

Проведені дослідження підтверджують можливість використання отриманих зшитих хітозан-колаген-целюлозних плівок для культивування адгезивно залежних мезенхімальних стовбурових клітин та потенційного застосування їх як носіїв таких клітин в експериментах *in vivo* та *in vitro*.

### Висновки

Отримані хітозан-колагенові плівки з волокнами окисненої целюлози відповідають вимо-

гам щодо матриць для культивування мезенхімальних стовбурових клітин (прозорі, стійкі при рН=7,2-7,4, міцність при розриві – 43,0 МПа (хітозанових), 20,7 МПа (хітозан-целюлозних), 44,1 МПа (хітозан-колаген-целюлозних), відносне видовження – 7,7 % (хітозанова), 30,0 % (хітозан-целюлозна), 25,5 % (хітозан-колагенова), 35,0% (хітозан-колаген-целюлозна), гідрофільні (кут змочування ~ 600), стійкі протягом 40 днів). Вони можуть бути рекомендовані для вирощування нащадків мезенхімальних стовбурових клітин та подальшого використання в біотехнології чи тканинній інженерії.

У результаті дослідів визначено, що оптимальними умовами для формування плівок є:

- використання методики випарювання розчинника;
- концентрації колагену і хітозану – по 1,5%;
- концентрація розчинника – 2 %;
- температура формування – 50-60 °С;
- концентрації глутарового альдегіду і сульфатної кислоти – 0,2 % і 2 %, відповідно;
- співвідношення хітозану, колагену і целюлози (за масою) – 30:30:1.

### Список літератури

1. Chandy T. Chitosan as a biomaterial / T. Chandy, C. Sharma // Biomater. Art. Cells Art. Org. – 1990. – Vol. 18, №1. – P. 143-150.
2. Harish Prashanth K.V., Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential – an overview / K.V. Harish Prashanth, R.N. Tharanathan // Trends in Food Science & Technology. – 2007. – Vol. 18. – P. 117-131.
3. Huang-Shian Tsai. Properties of hydrophilic chitosan network membranes by introducing binary crosslink agents / Huang-Shian Tsai, Yen-Zen Wang // Polymer bulletin. – 2008. – Vol. 60. – P. 103-113.

*D. Bilko, O. Zagorodko, N. Antoniuk, I. Kolesnyk, I. Borbulyak*

## CHITOSAN-COLLAGEN FILMS FOR GROWTH OF MESENCHYMAL STEM CELLS

*A method for production of biocompatible, thin-layered chitosan-collagen films were developed for propagation of growth of mesenchymal stem cells in vitro. Obtained films were characterized by appropriate mechanical and optical characteristics that make them useful for use as biocompatible matrices for propagation of adhesion-dependent cell types. In vivo experiment indicated complete resorption of the films within 40 days after implantation.*

**Key words:** : chitosan, collagen, films, mesenchymal stem cells.

*Матеріал надійшов 23.01.2013*