

УДК 606

## Биопластичный материал на основе ионно-трековых раневых покрытий и нанокаркаса хитозана

© 2021 И.И. ВИНОГРАДОВ<sup>1,2\*</sup>, П.С. ЕРЕМИН<sup>3</sup>, А.В. ПОДДУБИКОВ<sup>4</sup>,  
И.Р. ГИЛЬМУТДИНОВА<sup>3</sup>, А.Н. НЕЧАЕВ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Государственный университет «Дубна», Дубна, 141980

<sup>2</sup> Объединённый институт ядерных исследований (ОИЯИ), Дубна, 141980

<sup>3</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, 121099

<sup>4</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, 105064

\*e-mail: Ily7345@gmail.com

Поступила в редакцию 02.07.2021 г.

После доработки 16.07.2021 г.

Принята к публикации 06.09.2021 г.

Создан биопластичный материал на основе металлизированного титаном ионно-трекового раневого покрытия и нанокаркаса хитозана, обладающий высокой прочностью, эластичностью, водо- и газопроницаемостью. Изучены его прочностные характеристики и проведена оценка бактериостатичности, бактерицидности, цитотоксичности и биосовместимости. Данный материал не токсичен и может быть платформой для раневых покрытий нового поколения в регенеративной медицине после проведения доклинических и клинических испытаний

*Ключевые слова:* биопластичный материал, ионно-трековые раневые покрытия, хитозан, нанокаркас.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2021-37-5-55-60

Интенсивное развитие клеточных технологий, применяемых в новой области медицины — регенеративной медицине, требует разработки новых биопластичных материалов, которые могут служить матрицами/скаффолдами для культивируемых клеток [1]. Для многих отраслей медицины разработаны раневые покрытия из хитозана, коллагена и других биопластичных полимеров. Одним из перспективных направлений в области бионанотехнологий является технология бескапиллярного электроформования нановолокон из растворов полимеров, отличающихся сверхразвитой структурой и пористостью [2]. Нанокаркасы из хитозана, коллагена, гиалуроновой кислоты и других биопластичных полимеров являются основой раневых покрытий последних поколений. Они в точности повторяют структуру

внеклеточного матрикса, что позволяет поддерживать диффузию питательных веществ, метаболитов и других растворимых агентов [2–5]. Важным направлением совершенствования пленочных раневых покрытий является повышение их паропроницаемости при сохранении барьерной функции в отношении микроорганизмов. Таким барьером может служить трековая мембрана, в составе потенциального раневого покрытия, выпускаемого на базе Лаборатории ядерных реакций им. Г.Н. Флерова Объединенного института Ядерных исследований (ЛЯР ОИЯИ). Мембрана обеспечивает задаваемые параметры газо- и водопроницаемости, а также предотвращает риск бактериальной и возможно вирусной контаминации в регенерируемых кожных покровах [6–8]. Совмещение нанокаркаса хитозана и ионно-трекового

*Список сокращений:* (по алфавиту): БМ — биопластичный материал; ГА — глутаровый альдегид; ИТРП — ионно-трековое раневое покрытие; ПЭО — полиэтиленоксид; ПЭТФ — полиэтилентерефталат; ТМ — трековая мембрана; ЭФ — электроформование.

раневого покрытия позволит получить материал для регенеративной медицины, обладающий вышеописанными свойствами.

Целью работы являлось создание перспективного биопластичного материала, а также исследование его функциональных свойств, в том числе бактериостатичности, цитотоксичности и биосовместимости.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Для проведения экспериментов использовали Хитозан (Mw 200000) «Биопрогресс» (Россия), полиэтиленоксид (Mw 300000) Sigma-Aldrich (Германия), леяную уксусную кислоту PanReas AppliChem (Испания), спирт этиловый неденатурированный с объемной долей спирта не менее 95% («Ферейн» Россия)

Биопластичный материал получали на основе ионно-трекового раневого покрытия и нанокаркаса хитозана. В качестве ИТРП использовали специально разработанную ПЭТФ ТМ с титаном, выпускаемую ЛЯР ОИЯИ, с диаметром пор 0,3 мкм (по точке пузырька) и пористостью 12–15%. Металлизацию ПЭТФ ТМ выполняли магнетронным напылением на коммерческой установке УМН-180 ООО «Ивтехномаш» (Россия). Толщина напыленного слоя титана составила 40 нм [9]. Полученный ИТРП использовали в качестве осадительного электрода коллектора для электроформования нанокаркаса хитозана, которое осуществляли на базе коммерческой установки Nanon — 01A (МЕСС СО, Япония). Использовали следующие параметры процесса: напряжение 28 кВ; скорость дозирования раствора 1 мл/ч; размер фильеры 0,210 мм (27 G); расстояние от фильеры до электрода 15 см; угол между фильерой и электродом 90°; скорость вращения барабанного коллектора 50 об/мин; скорость движения фильеры по оси X — 1 см/с, количество напыляемого раствора 1 мл ( $m_{\text{навески}} = 0,04$  г). В качестве базового формовочного раствора хитозана использовали 4%-ный раствор смеси Хитозан/ПЭО (90/10 массовых частей), в 90%-ной уксусной кислоте. В качестве дополнительного формовочного раствора использовали 4%-ный Хитозан/ПЭО (90/10 массовых частей) в смеси растворителей следующего состава вода/спирт/уксусная кислота = 55/40/5.

Свежесформованные нано-каркасы хитозана быстро деградируют в водной среде. Для предотвращения этого производили термическую или химическую сшивку нанокаркаса хитозана [10–12]. Термическую сшивку проводили в сушильном шкафу при температуре 120 °С в течение 1 ч, химическую в парах ГА. Образцы нанокаркаса

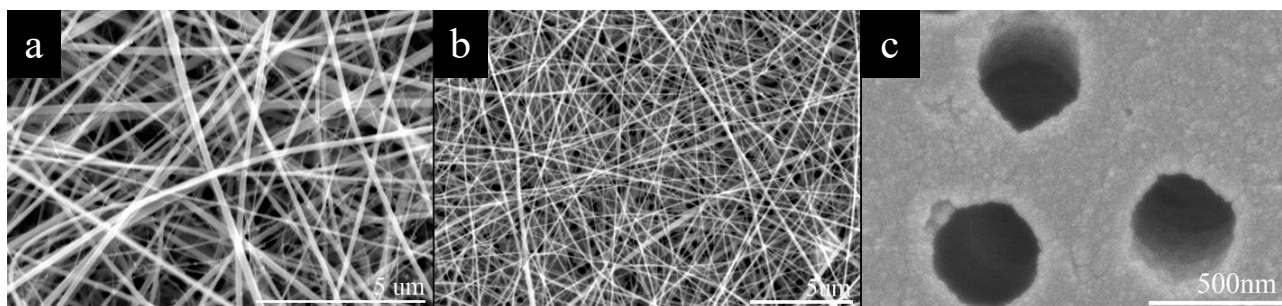
хитозана и 10 мл 25%-ного раствора ГА помещали в вакуумный сушильный шкаф с температурой 37 °С, откачивали воздух до предельного вакуума  $3 \cdot 10^{-3}$  мбар, и нановолокна выдерживали в течение 24 ч.

Оценку морфологии поверхности полученного БМ проводили с использованием растрового электронного микроскопа Hitachi S-3400N (Hitachi, Япония) с термоэмиссией в режиме вторичных электронов. Ускоряющее напряжение составляло 15 кВ. Полученные изображения были обработаны в программной оболочке Gatan DigitalMicrograph. Водопроницаемость образцов изучали на стенде из фильтрационных ячеек Millipore (США) в тупиковом режиме. Ячейку подключали к общей системе подачи воды из резервуара. Сжатым азотом из баллона нагнетали давление от 0,2 бар до 0,6 бар с шагом в 0,1 бар. Газопроницаемость образцов изучали на порометре капиллярного потока POROLUX 1000 компании POROMETER (Бельгия). Рабочий диапазон давления газа составлял от 0,1 бар до 0,6 бар с шагом в 0,1 бар. Диаметр исследуемого образца составлял 25 мм. Для определения предела прочности на растяжение использовали разрывную машину серии AGS-X (Shimadzu, Япония). Исследуемые образцы имели сечение  $10 \times 0,023$  мм. Рабочий отрезок составлял 40 мм.

Для оценки бактериостатичности и бактерицидности разработанного БМ использовали штаммы микроорганизмов *Bacillus cereus* ATCC 10702, *Candida albicans* № 15, *Escherichia coli* 2584, *Pseudomonas aeruginosa* ГКПМ 190155, *Staphylococcus aureus* № 209-Р, *Bacillus subtilis* № 6633, *Klebsiella pneumonia* № 3156, полученные из «Коллекции микроорганизмов III и IV групп патогенности НИИВС им И.И. Мечникова» Центра коллективного пользования НИИВС им. И.И. Мечникова (ЦКП НИИВС им И.И. Мечникова).

В качестве питательной среды для культивирования микроорганизмов использовали ГРМ-бульон, ГРМ-агар и агар Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМП, Россия). Подготовку питательных сред и восстановление лиофилизированных культур тестовых штаммов микроорганизмов выполняли в соответствии с ОФС.1.2.4.0002.18 ГФ XIV.

Для приготовления инокулята колонии бактерий и грибов второго пассажа суспендировали в стерильном изотоническом растворе до плотности 0,5 ед. мутности МакФарланда (Densi-Lameter II, Erba Lachema s.r.o., Чехия). Инокулят 0,02 мл (0,5 Ед McF) пипеткой наносили на исследуемые образцы ИТРП и БМ диаметром 25 мм, расположенные по 3 диска на чашке Петри диаметром



**Рис. 1.** Типичная электронная микрофотография образцов БМ: *a* — 4% (ИТРП + Хитозан/ПЭО) 90/10 в 90%-ной уксусной кислоте; *b* — 4% (ИТРП + Хитозан/ПЭО) 90/10 в смеси Вода/Спирт/Уксусная кислота 55/40/5; *c* — ИТРП.

**Fig. 1.** Typical electronic micrography of BM samples: *a* — 4% (ITWC + Chitosan/PEO) 90/10 in 90% acetic acid; *b* — 4% (ITWC + Chitosan/PEO) 90/10 in mixture Water/Alcohol/ acetic acid 55/40/5

90 мм с соответствующим микроорганизму питательным агаром, и на ограниченный пробойником участок агара, соответствующий по диаметру, исследуемому диску (контроль). Посевной материал равномерно распределяли по поверхности ИТРП и БМ с помощью микробиологической петли. Чашки культивировали при температуре 37 °С в течение 72 ч. Смыть биомассы с исследуемых образцов осуществляли через 24, 48 и 72 ч культивирования путем шуттелирования в течение 30 мин в стеклянной пробирке, содержащей 5 мл стерильного физиологического раствора.

Исследование цитотоксичности биопластичного материала выполняли на коммерческой культуре клеток фибробластов кожи человека HDF (Cell Applications, США, кат. № 106К-05а). В качестве ростовой среды использовали DMEM с высоким содержанием глюкозы с добавлением 10% FBS, 2 мМ L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (все перечисленные реагенты StemCell Technology, США).

На образцы размером 1 см<sup>2</sup> вносили 1 мл суспензии клеток фибробластов кожи человека HDF в количестве  $12,5 \cdot 10^3$ , формируя «каплю». Выдерживали 30 мин в CO<sub>2</sub>-инкубаторе, после чего доливали ростовую среду и культивировали в течение 3 сут. Исследование образцов матрицы, а также прикрепленных к ней клеток проводили с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 510 META на базе инвертированного микроскопа Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Структурные и физико-химические характеристики БМ

Методом растровой электронной микроскопии получены снимки разработанного БМ.

Сторона с нанокаркасом хитозана имела «паутинообразную», хаотично сплетенную структуру волокон диаметром меньше 100 нм. (рис. 1*a, b*). Морфологических различий между БМ с нанокаркасом хитозана, полученным из формовочного раствора с высокой концентрацией уксусной кислоты, и водно-спиртового раствора с низкой концентрацией уксусной кислоты не выявлено. Обратная сторона БМ сохраняла морфологию поверхности исходного ИТРП (рис. 1*c*).

Термическая и химическая сшивка ГА нанокаркасов хитозана обеспечивают их устойчивость в водных средах. Термическая сшивка нанокаркаса хитозана на поверхности БМ незначительно уменьшает водопроницаемость (*W*) исходного ИТРП ( $W = 0,62$  л/ч/см<sup>2</sup>,  $P_{\text{воды}} = 0,06$  МПа) за счет частичного набухания нанокаркаса хитозана в воде. Биопластичный материал с нанокаркасом хитозана, химически сшитым ГА, сохраняет водопроницаемость исходного ИТРП.

Результаты, полученные при исследовании газопроницаемости (*V<sub>p</sub>*) БМ на основе нанокаркаса хитозана свидетельствуют о том, что этот параметр практически не изменяется ( $V_p = 2,5$  л/мин/см<sup>2</sup>,  $P_{\text{газа}} = 0,06$  МПа). При исследовании прочностных характеристик было установлено, что БМ с нанокаркасом хитозана, сшитым термически, сохраняет предел прочности исходного ИТРП ( $\sigma = 28,67 \pm 2,78$  МПа), в то время как химическая сшивка ГА увеличивает предел прочности БМ ( $\sigma = 36,14 \pm 1,28$  МПа).

Таким образом, полученный БМ имеет такую же водо- и газопроницаемость как ИТРП. Слой нанокаркаса хитозана на поверхности БМ позволяет поддерживать диффузию питательных веществ, метаболитов и других растворимых агентов [2–5]. Прочность и гибкость БМ позволяет использовать его на участках кожи со сложным рельефом и/или на подвижных участках.

### Оценка бактериостатичности и бактерицидности БМ и ИТРП

Количественный учет выросших на полученном БМ и ИТРП микроорганизмов определяли с помощью прибора для определения мутности бактериальной суспензии Erba Densi-La-Meter (Чехия) в единицах оптической плотности Мак-Фарланда (McF) (табл. 1).

Таблица 1

#### Динамика роста и накопления биомассы тестовых штаммов микроорганизмов на поверхности ИТРП и БМ

Dynamics of growth and accumulation of biomass of test strains of microorganisms on the surface of ITWC and BM.

Тест-штамм	Время инкубации	Оптическая плотность бактериальной взвеси Ед McF	
		ИТРП	БМ
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10702	24	3,8	6,5
	48	5,4	8,7
	72	11	10
<i>Bacillus subtilis</i> № 6633	24	11	12
	48	11	12
	72	12	13
<i>Klebsiella pneumoniae</i> № 3156	24	10	9,2
	48	10	11
	72	11	11
<i>Escherichia coli</i> 2584	24	8,7	10
	48	8,8	11
	72	11	11
<i>Staphylococcus aureus</i> № 209-Р	24	9,5	10
	48	12	12
	72	14	14
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ГКПМ 190155	24	9,3	10
	48	9,4	11
	72	9,3	11
<i>Candida albicans</i> № 15	24	10	8,5
	48	13	9,5
	72	15	15

Рост и накопление биомассы бактерий *Bacillus cereus* штамма ATCC 10702 на поверхности ИТРП и БМ свидетельствуют о наличии бактериостатического эффекта, проявляющегося в течение первых 48 ч наблюдения и более выраженного у ИТРП.

На рост и накопление биомассы штаммами *Escherichia coli* 2584 и *Pseudomonas aeruginosa* ГКПМ 190155 влияние БМ отсутствует, а ИТРП

слабее. В отношении штамма *Candida albicans* № 15 напротив отмечена бактериостатическая активность БМ и отсутствие таковой у ИТРП. На рост культуры штаммов *Staphylococcus aureus* № 209-Р, *Bacillus subtilis* № 6633 и *Klebsiella pneumoniae* № 3156 ИТРП и БМ влияния практически не оказывали. Сравняя интенсивность роста и накопление биомассы исследованных штаммов бактерий, можно утверждать о наличии выраженного бактериостатического влияния обоих видов использованных покрытий на культуру штамма *Bacillus cereus* в течение 48 ч инкубации.

Таким образом, ИТРП и БМ обладали бактериостатическим действием на штамм *Bacillus cereus* ATCC 10702, обнаруженная активность не связана с хитозаном. В отношении других использованных штаммов микроорганизмов антимикробное действие в условиях эксперимента отсутствовало или было незначительным.

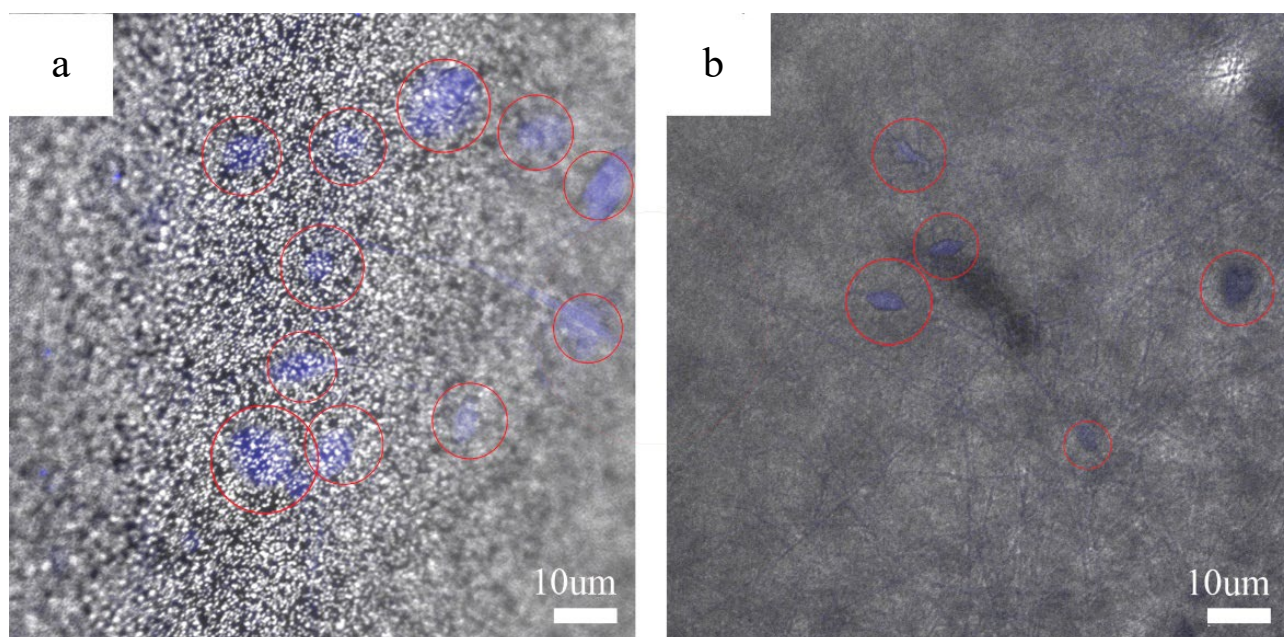
Известно, что протонированные NH<sub>2</sub> группы хитозана способны взаимодействовать с анионными группами поверхности клетки и за счет электростатических и ионных взаимодействий формировать полиэлектролитные комплексы с компонентами бактериальной поверхности, вызывая гибель бактерий и/или микроорганизмов. Антимикробное действие зависит от концентрации полимера, значения pH, температуры, ионной силы раствора и др. [13]. Возможно, бактериостатические свойства ИТРП и БМ в условиях раневого процесса будут отличаться от полученных в лабораторном эксперименте и требуют дальнейшего изучения.

#### Оценка цитотоксичности и биосовместимости БМ

Как было описано выше, полученный БМ является микрофильтрационным материалом. Это позволяет задерживать бактерии и вирусы и одновременно производить газообмен раневой поверхности с окружающей средой, выводить экссудат и адресно доставлять лекарственные препараты. Эластичность и прочность БМ дает возможность использовать его на участках кожи со сложным рельефом и/или на подвижных участках.

При исследовании стабильности БМ установлено, что термически сшитый нанокаркас хитозана подвергался гидролитической деструкции при 37 °С через 3 сут, а химически сшитый ГА — через 7 сут.

При культивировании фибробластов человека на исследуемом БМ цитотоксического действия на культуру клеток выявлено не было. Все клетки прикреплялись к поверхности материала в течение первых суток. Мигрирующих



**Рис. 2.** Клеточная культура фибробластов человека на поверхности БМ. Время культивирования 72 ч. Ядра клеток выявлены DAPI. *a* — БМ с нанокаркасом хитозана, сшитым термически (120 °С); *b* — БМ с нанокаркасом хитозана, сшитым химически (ГА)

**Fig. 2.** Cell culture of human fibroblasts on the surface of BM. Cultivation time is 72 h. The cell nuclei were detected by DAPI. *a* — BM with thermally crosslinked chitosan nano-scaffolds (120 °C); *b* — BM with chemically crosslinked chitosan nano-scaffolds (HA)

и погибших клеток на поверхность чашки Петри не обнаружено.

Несмотря на то, что ГА является для клеток токсичным агентом, его использование для химической сшивки нанокаркаса хитозана не влияет на биологические свойства БМ. Клетки, прикрепленные к поверхности, не меняют морфологические параметры. Это свидетельствует не только об отсутствии цитотоксичности БМ с нанокаркасом хитозана, сшитым ГА, но и о биосовместимости этого БМ (рис. 2*a*).

Следует отметить, что несмотря на то, что нанокаркас хитозана сшитый термически подвергся быстрой гидролитической деструкции, клеточная культура фибробластов адгезировалась на ИТРП, что подтверждает его биосовместимость (рис. 2*b*).

Таким образом, создан биопластичный материал на основе ионно-трековых раневых покрытий и нанокаркаса хитозана обладающий высокой прочностью, эластичностью, водо- и газопроницаемостью. Его структура, состав и физическо-химические свойства обеспечивают достаточные условия для пролиферации клеток. Данный материал не токсичен и может быть платформой для раневых покрытий нового поколения в регенеративной медицине после проведения доклинических и клинических испытаний. Разработанная методика позволяет получать БМ по технологии, используемой в производстве рулонных материалов.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке гранта для молодых научных сотрудников ОИЯИ (№ 21-502-02).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Панарин Е.Ф., Нудьга П.А., Петрова В.А. и др. Композиционные матрицы на основе хитина и хитозана для культивирования клеток кожи человека. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*, 2010, 5(1), 65–73.
2. Прокопчук Н.Р., Меламед В.Д., Прищепенко Д.В. Инновационные раневые покрытия с нановолокнами хитозана. *Труды БГДУ*, 2017, 1(2), 15–22.
3. Chen Z.G., Wang P.W., Wei B., et al. Electrospun collagen–chitosan nanofiber: A biomimetic extracellular matrix for endothelial cell and smooth muscle cell. *Acta Biomater.*, 2010, 6(2), 372–382. doi: 10.1016/j.actbio.2009.07.024.
4. Madihally S.V., Matthew H.W. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 1999, 20(12), 1133–1142. doi: 10.1016/s0142-9612(99)00011-3.
5. Yagi K., Kurikawa N., Kurikawa N., Nakashima Y. Effectiveness of fructose-modified as a scaffold for hepatocyte attachment. *Biol. Pharm. Bull.*, 1997, 20(12) 1290–1294. doi:10.1248/bpb.20.1290

6. Apel P.Yu. Ion-track membranes and their use in biological and medical applications. *AIP Conference Proceedings*, 2007, 912, 488–494. doi: 10.1063/1.2746627
7. Андреев Д.Ю., Парамонов Б.А., Мухтарова А.М. Современные раневые покрытия. Часть I. *Вестник хирургии имени И.И. Грекова*, 2009, 168(3), 98–102.
8. Herzog H., Loudos G., Storchi L. Preface. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment*, 2013, 702, 1. doi.org/10.1016/j.nima.2013.01.001
9. Артошина О.В., Россоу А., Семина В.К. и др. Структурные и физико-химические свойства тонких пленок диоксида титана, полученных методом реактивного магнетронного напыления, на поверхности трековых мембран. *Мембраны и мембранные технологии*, 2015, 5(4), 243–253. doi: 10.1134/S221811721504001X
10. Bin Li, Chan-Lin Shan, Quing Zhou, et al. Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activity of Cross-Linked Chitosan-Glutaraldehyde. *Marine drugs*, 2013, 11(5), 1534–1552. doi:10.3390/md11051534
11. Панарин Е.Ф., Нудьга П.А., Петрова В.А. и др. Матрицы для культивирования клеток кожи человека на основе природных полисахаридов Хитина и Хитозана. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*, 2009, 4(3), 42–46.
12. Зоткин М.А., Вихорева Г.А., Кечекьян А.С. Термомодификация хитозановых пленок в форме солей с различными кислотами. *Высокомолекулярные соединения*, 2004, 46(2), 359–363.
13. Луньков А.П., Ильина А.В., Варламов В.П. Антиоксидантные, антибактериальные и фунгицидные свойства пленок на основе хитозана (Обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*, 2018, 54(5), 444–454. doi: 10.1134/S0555109918050124

## Bioplastic material based on ion-track wound coatings and chitosan nano-scaffold

I.I. VINOGRADOV<sup>1,2\*</sup>, P.S. EREMIN<sup>3</sup>, A.V. PODDUBIKOV<sup>4</sup>, I.R. GILMUTDINOVA<sup>3</sup>, and A.N. NECHAEV<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> The State University “Dubna”, Dubna, 141980, Russia

<sup>2</sup> Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, 141980, Russia

<sup>3</sup> FSBI “National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology” of the Ministry of Health of Russia, Moscow, 121099, Russia

<sup>4</sup> FGBNU “I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums”, Moscow, 105064, Russia

\*e-mail: Ily7345@gmail.com

Received July 2, 2021

Revised July 16, 2021

Accepted September 6, 2021

**Abstract**—A bioplastic material based on a titanium-metallized ion-track wound coating and a chitosan nano-scaffold has been created, which has high strength, elasticity, as well as water and gas permeability. Its strength characteristics were studied and its bacteriostaticity, bactericidal activity, cytotoxicity and biocompatibility were evaluated. This material is non-toxic and, after preclinical and clinical trials, can serve as a platform for a new generation of wound coatings in regenerative medicine.

**Key words:** bioplastic material, ion-track wound coatings, chitosan, nano-scaffold

**Funding**—The work was supported by a grant for JINR young researchers (no. 21-502-02).

**doi:** 10.21519/0234-2758-2021-37-5-55-60