



ПОЛУЧЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННОЙ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ С КОНТРОЛИРУЕМЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ВИНИЛЬНЫХ ГРУПП С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ СКАФФОЛДОВ МЕТОДОМ ФОТОИНДУЦИРУЕМОЙ РЕАКЦИИ СШИВКИ

© 2021 г. А. В. Сочилина*, **, #, А. Г. Савельев**, ***, Р. А. Акасов*, **, ***, В. П. Зубов*, Е. В. Хайдуков*, **, ***, А. Н. Генералова*

*ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

**Федеральный научно-исследовательский центр “Кристаллография и фотоника” РАН, Россия, 119333 Москва, Ленинский просп., 59

***Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8/2

Поступила в редакцию 17.08.2020 г.

После доработки 20.08.2020 г.

Принята к публикации 26.08.2020 г.

Материалы на основе гиалуроновой кислоты (ГК) активно используют в качестве скаффолдов для решения задач тканевой инженерии. Один из способов их получения – реакция фотоиндуцируемой сшивки, которая требует модификации ГК винильными группами, способными вступать в радикальную реакцию под действием света. Важная характеристика модифицированной ГК (мГК) – количество привитых винильных групп, представленное в виде степени замещения (СЗ), отвечающей за механические, химические и биологические свойства скаффолдов. В данной работе показана возможность контролируемого управления СЗ путем изменения параметров реакции (состава и концентрации компонентов, условий реакции), а также влияние СЗ на вязкость растворов мГК. Продемонстрирован пример фотоиндуцированной реакции мГК в присутствии флавиномононуклеотида в качестве инициатора для создания методом 3D-печати скаффолдов, которые не проявляют цитотоксических свойств. Изучен характер роста фибробластов на поверхности скаффолда.

Ключевые слова: гиалуроновая кислота, глицидилметакрилат, скаффолды, полимераналогичные реакции

DOI: 10.31857/S0132342321040199

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время активно развивается такое инновационное направление науки, как тканевая инженерия, цель которой – создание конструкций, способных поддерживать, восстанавливать и замещать поврежденные ткани и органы. Основой таких конструкций служат скаффолды, представляющие собой трехмерные каркасные структуры, на поверхности и внутри которых могут закрепляться и пролиферировать клетки [1–3]. После имплантации скаффолдов в месте дефекта формируется новая биоткань, а изначальный

каркас деградирует или удаляется хирургически. Для применения в сфере тканевой инженерии скаффолды должны удовлетворять ряду требований [4, 5]: 1) биосовместимость, отсутствие цитотоксичности, иммуногенности и пирогенности как самих изделий, так и продуктов их распада; 2) биodeградируемость, которая определяет возможность замещения искусственных конструкций собственными тканями организма; 3) свойства поверхности, способствующие адгезии, пролиферации и сохранению функций клеток; 4) механическая прочность, аналогичная таковой у замещаемой ткани; 5) оптимальная пористость для свободного распределения клеток и вырабатываемого ими межклеточного матрикса, а также для эффективного обмена веществ; при этом должен соблюдаться баланс между пористостью и механической прочностью.

Помимо перечисленных требований, методика изготовления скаффолдов должна быть хоро-

Сокращения: ГК – гиалуроновая кислота; мГК – модифицированная гиалуроновая кислота; ГМА – глицидилметакрилат; ДМФА – диметилформамид; МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид; ПЭГДА – диакрилат полиэтиленгликоля; СЗ – степень замещения; ТЭА – триэтиламин; ТЭАБ – тетраэтиламмоний бромид; ФОК – фотоотверждаемая композиция.

Автор для связи: (эл. почта: ddraig@yandex.ru).

шо воспроизводимой, масштабируемой и экономически целесообразной. Скаффолды могут быть изготовлены на основе металлов, керамики, синтетических и природных полимеров, а также их композитов. Скаффолды на основе металлов и керамики не подвергаются деградации, что может вызывать осложнения при длительном применении. Использование для формирования скаффолдов синтетических полимеров, имеющих преимущественно гидрофобную поверхность, затрудняет прикрепление клеток, а также приводит к появлению токсичных продуктов деградации, как, например, в случае сополимера лактида с гликолидом, допущенного FDA к применению [4–6]. В последнее время большое внимание уделяют материалам на основе природных полимеров и их производных, особенно эндогенным соединениям, поскольку они *a priori* обладают хорошей биосовместимостью и способностью к ферментативной деградации в организме. Один из таких полимеров – линейный полисахарид – гиалуроновая кислота (ГК), состоящая из повторяющихся неразветвленных звеньев глюкуроновой кислоты и *N*-ацетилглюкозамина. ГК – один из основных компонентов внеклеточного матрикса, входит в состав соединительной, эпителиальной и нервной тканей, содержится во многих биологических жидкостях (слюне, синовиальной жидкости и др.), а также принимает активное участие в пролиферации и миграции клеток [7, 8]. Однако изготовление скаффолдов на ее основе затруднено из-за чрезвычайно высокого коэффициента набухания и неспособности полисахарида удерживать заданную форму гидрогеля.

Разработаны методы получения композитных скаффолдов на основе ГК за счет образования нековалентных связей, например, с коллагеном, фибриноим шелка, комплементарной ДНК или поливиниловым спиртом [9–12], а также за счет модификации ГК термочувствительными полимерами [13]. Однако нековалентная сшивка не способна решить проблему слабой механической прочности гидрогелей ГК, поэтому перспективное направление – разработка методов получения скаффолдов ГК за счет реакции ковалентной внутри- и межмолекулярной сшивки цепей ГК. Один из подходов – модификация ГК путем введения винильных групп и проведение радикальной реакции сшивки, которая может быть реализована не только с участием химических реагентов, но и под действием света. Фотоиндуцированные реакции сшивки позволяют создавать материалы с требуемыми физико-химическими свойствами при сохранении биосовместимости и способности к биodeградации. Изготовление скаффолдов может проводиться методом микромолдинга или лазерной 3D-печати [14–17], кроме того, формирование конструкции может быть реализовано непосредственно в живом организме без предварительной стадии *in vitro* [18].

Для получения производных ГК, содержащих винильные группы, активно используют реакцию полимераналогичных превращений с участием ангидрида метакриловой кислоты или глицидилметакрилата (ГМА) [19–22]. Ключевым параметром при получении таких производных – концентрация винильных групп, которая может быть представлена в виде степени замещения (СЗ) групп полимера остатками ГМА. СЗ влияет не только на степень сшивки, но и на цитотоксичность, биodeградируемость и механические свойства получаемых скаффолдов. Управление СЗ – настраиваемый инструмент для получения скаффолдов с заданными свойствами. СЗ может быть оценена с помощью ИК- [23] и ¹H-ЯМР-спектроскопии [20, 22], однако точное определение СЗ такими методами затруднено вследствие высокой гигроскопичности и полимерной природы модифицированной ГК (мГК), что приводит к уширению пиков и появлению многочисленных шумов. В данной работе количественное определение СЗ проводили с помощью разработанного ранее [24] титриметрического анализа при участии перманганата калия. СЗ использовали в качестве параметра, позволяющего сравнивать образцы мГК и, соответственно, влияние условий на протекание реакции полимераналогичных превращений.

Цель данной работы – анализ влияния параметров реакции ГК с ГМА (условия и состав реакционной смеси) на СЗ, которая определяет свойства мГК и скаффолдов на ее основе. В работе продемонстрирован способ получения скаффолдов в процессе фотоотверждаемой реакции при использовании в качестве инициатора эндогенного нетоксичного соединения флавиномононуклеотида. Исследованы цитотоксические свойства полученных скаффолдов и возможность культивирования клеток на их поверхности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полимераналогичная реакция ГК с ГМА для введения звеньев с двойной связью может проходить как гетерофазная реакция в водной среде со слабо растворимым в воде ГМА [19], гомофазная реакция в органических растворителях после замены иона натрия в ГК на липофильный ион тетрабутиламмония [20] или гомофазная реакция в водно-органической среде [21]. В данной работе для модификации ГК с помощью ГМА была выбрана простая и легко управляемая реакция в водно-органической среде [21]. В результате проведения данной реакции в среде вода/ДМФА = 1.6 : 1 (ГК 0.36 мас. %, тетраэтиламмоний бромид (ТЭАБ) 0.36 мас. %, 18 мл ГМА на 1 г ГК) при 25°C в течение 4 сут были получены образцы, в которых степень замещения групп ГК звеньями с двойной связью (СЗ) составила 40%. Для анализа влияния параметров реакции ГК с ГМА на СЗ и использование их в качестве инструмента управ-

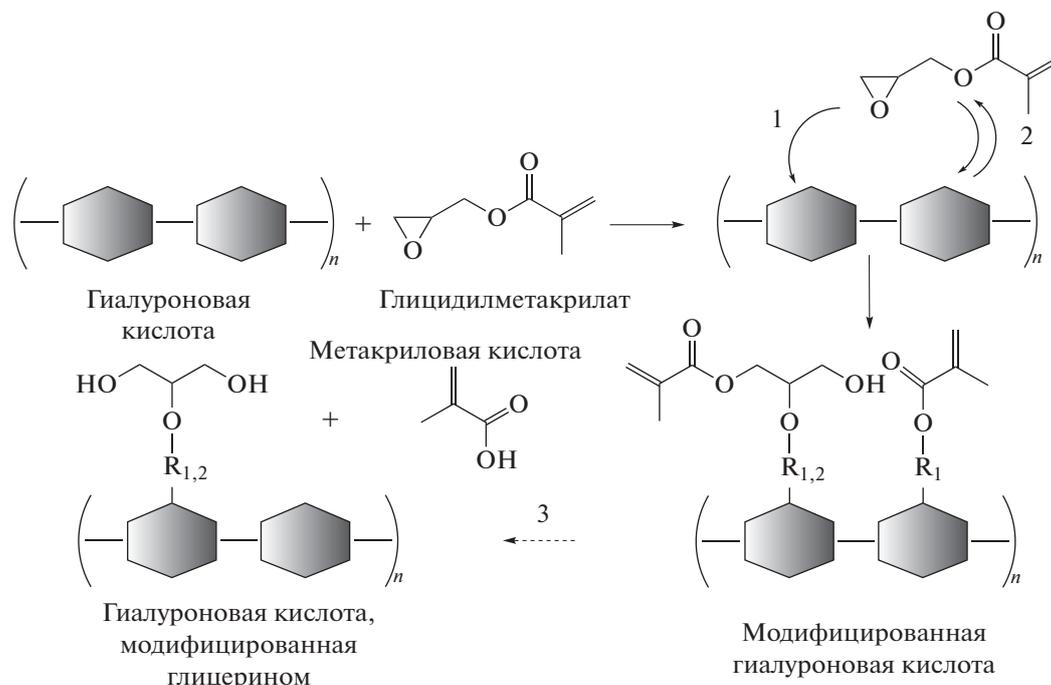


Рис. 1. Схема реакции модификации гиалуроновой кислоты с помощью глицидилметакрилата: 1 – необратимая реакция раскрытия эпоксидного кольца; 2 – обратимая реакция переэтерификации; 3 – гидролиз. $R_1 = \text{CH}_2$, $R_2 = \text{C}=\text{O}$.

ления СЗ исследовали изменение рН, времени проведения реакции, температуры и соотношения ГК/ГМА в реакционной смеси, а также роль катализатора межфазового переноса.

Влияние рН на СЗ в мГК. Влияние рН на СЗ в мГК оценивали в исходной реакционной смеси при нейтральном рН 6–7, в щелочной среде (рН 12), полученной при замене катализатора ТЭАБ на триэтиламин (ТЭА), и кислой среде (рН 4.5), полученной при добавлении HCl к исходной реакционной смеси. Показано, что в щелочной среде СЗ в образцах была в 2 раза ниже (21%), чем в кислой и нейтральной средах (~40–41%) при остальных одинаковых условиях. Согласно литературным данным [21], полимераналогичная реакция ГК с ГМА в водно-органической среде может протекать по двум основным механизмам: за счет обратимой переэтерификации остатка метакриловой кислоты ГМА и за счет необратимой реакции с раскрытием эпоксидного кольца глицидила (рис. 1). Подтверждение таких механизмов представлено в работе Reis et al. [25] на примере модельных полимеров, содержащих только гидроксильные функциональные группы (поливиниловый спирт) или только карбоксильные группы (полиакриловая кислота). Было показано, что при рН 3.5 ГМА взаимодействует как с гидроксильными, так и с карбоксильными группами через раскрытие эпоксидного кольца, а при рН 10.5 ГМА подвергается гидролизу и реагирует лишь с гидроксильными группами по обоим ме-

ханизмам, при этом предпочтительным механизмом выступает раскрытие эпоксидного цикла. Сложный механизм реакции полисахаридов с ГМА рассмотрен в работе Li et al. [26]. Авторы исследовали реакцию хондроитинсульфата с ГМА, в результате которой при щелочных (рН 8.5) и близких к нейтральным (рН 6.4) условиям образуются различные продукты благодаря одновременному протеканию нескольких процессов: сначала проходят переэтерификация и модификация через раскрытие эпоксидного кольца, затем полученные продукты могут подвергаться гидролизу с образованием немодифицированного полисахарида, полисахарида со звеньями глицерина, метакриловой кислоты и глицидила. Следует отметить, что гидролиз и переэтерификация протекают в меньшей степени при рН 6.4, чем при рН 8.5, а при рН 3.0 гидролиз сложноэфирных связей практически отсутствует, поэтому модификация преимущественно протекает через раскрытие эпокси-группы.

С учетом описанных механизмов можно сделать вывод, что при щелочном рН наряду с реакцией присоединения винильных групп протекает гидролиз, что снижает СЗ в конечном продукте. Кроме того, практически одинаковые значения СЗ, полученные в нейтральных и кислых условиях (~40–41%), свидетельствуют о незначительном гидролизе при нейтральном рН. Таким образом, оптимальный процесс реализуется при проведении реакции модификации ГК в нейтральной

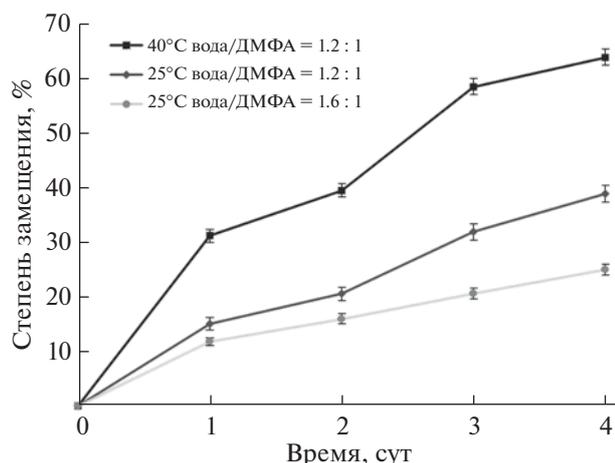


Рис. 2. Зависимость степени замещения в мГК от времени проведения реакции с глицидилметакрилатом (18 мл на 1 г ГК) при 25 и 40°C, а также при соотношении вода/ДМФА = 1.6 : 1 (с ТЭАБ) и вода/ДМФА = 1.2 : 1 (без ТЭАБ). Приведены усредненные значения трех независимых измерений.

среде, в которой возможно контролируемо управлять СЗ благодаря минимизации вклада побочных реакций. В случае данного процесса наиболее подходящий катализатор — ТЭАБ, не повышающий рН среды и служащий катализатором фазового переноса, позволяющим проводить процесс как в водной, так и органической среде.

Влияние времени и температуры на СЗ в мГК.

Реакцию модификации ГК проводили в течение 4 сут, в отличие от описанных в литературе процессов, время проведения которых составляло 5–10 сут при рН 12 [21]. Такой протокол был выбран, исходя из результатов измерения СЗ в продукте каждые сутки в течение 6 сут реакции, которые опубликованы нами ранее [24]. Выявлено, что после 4 сут СЗ значительно не изменялась при дальнейшем протекании реакции. Результаты имели хорошую воспроизводимость по СЗ и обеспечивали требуемую сшивку при фотоиндуцированном формировании гидрогелей. Проведение реакции при нейтральном рН значительно снижает гидролиз, а значит, повышает СЗ, поэтому время проведения реакции в течение 4 сут — оптимально при температуре 25°C.

Повышение температуры проведения процесса с 25 до 40°C позволило уменьшить время реакции и повысить СЗ (рис. 2). Так, для получения 40% СЗ в ГК при 25°C требуется проведение реакции в течение 4 сут, а при 40°C — в течение 2 сут. Это может быть связано с тем, что при более высокой температуре соблюдается принцип Вант-Гоффа, и происходит увеличение скорости необратимой реакции раскрытия эпоксидного кольца, кроме того, может увеличиваться растворимость ГМА в реакционной смеси. Дальнейшее увеличение температуры реакции может приводить к тер-

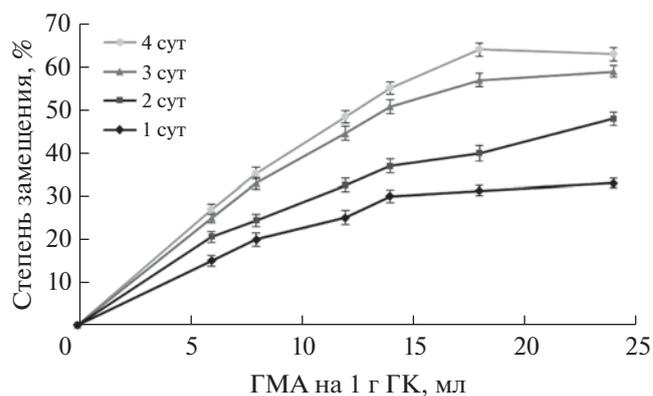


Рис. 3. Зависимость степени замещения от количества глицидилметакрилата в реакционной смеси и времени проведения реакции (все реакции проводились при 40°C и соотношении вода/ДМФА = 1.2 : 1). Приведены усредненные значения трех независимых измерений.

могидролизу ГК и снижать молекулярную массу продуктов [27].

Влияние соотношения компонентов и времени на СЗ в мГК. Один из эффективных инструментов управления СЗ при проведении реакции полимераналогичных превращений ГК — изменение концентрации компонентов в исходной смеси. Показано, что увеличение концентрации органической фазы от соотношения вода/ДМФА = 1.6 : 1 до 1.2 : 1 позволяет получать мГК практически с тем же содержанием винильных групп на 4-е сут при 25°C (~40%) без добавления ТЭАБ (рис. 2). Такой эффект может быть связан с увеличением содержания ДМФА, который повышает растворимость ГМА и, соответственно, приводит к получению более гомогенной системы, в которой не требуется участие катализатора фазового переноса ТЭАБ.

Изменение концентрации ГМА в реакционной смеси при прочих равных условиях позволяет эффективно управлять СЗ. Как видно на рис. 3, повышение концентрации ГМА в системе приводит к увеличению СЗ, которая может достигать 64%. Эксперимент проводили при 40°C и соотношении фаз вода/ДМФА = 1.2 : 1.

При этом важно отметить, что повышение концентрации ГМА > 18 мл на 1 г ГК не приводит к значительному росту СЗ в данном временном интервале, что делает неэффективным дальнейшее увеличение количества ГМА в реакционной смеси. Также стоит отметить, что увеличение концентрации ГК с 0.36 до 0.56 мас. % при неизменности всех остальных параметров значительно не влияет на конечную СЗ, однако позволяет снизить расход всех остальных реагентов в реакционной смеси.

Таким образом, для получения мГК с максимальной СЗ необходимо проводить реакцию в

нейтральной среде при повышенной температуре (40°C) с содержанием ГМА ≥ 18 мл на 1 г ГК не менее 4 сут.

Влияние СЗ на вязкость растворов модифицированной ГК. Важная характеристика мГК – вязкость ее растворов, оказывающая сильное влияние на подвижность радикалов при проведении реакции фотоиндуцируемой сшивки. Была измерена кинематическая вязкость разбавленных растворов мГК (0.5 мас. %) в зависимости от СЗ (рис. 4) с использованием метода капиллярной вискозиметрии. Снижение вязкости при повышении СЗ может быть связано с увеличением количества гидрофобных звеньев ГМА. В результате происходит снижение числа водородных связей, что, соответственно, приводит к уменьшению гидратных оболочек молекул ГК и снижению межмолекулярного трения. Несмотря на то что измерение проводили для разбавленных растворов мГК, данная тенденция, связанная со снижением вязкости при повышении СЗ, сохраняется и для фотоотверждаемых композиций (ФОК) с высоким содержанием мГК (20 мас. %), что оказывает большое влияние на параметры 3D-печати.

Скаффолды на основе мГК. Определено, что для экструзионной 3D-печати оптимальный диапазон СЗ мГК – 30–55%, что соответствует вязкости, необходимой для получения скаффолдов с требуемыми свойствами. При СЗ < 30% высокая вязкость образцов затрудняет экструзию и не позволяет получать скаффолды требуемой степени сшивки. При СЗ > 55% невозможно получить образцы, сохраняющие форму при экструзии. В качестве оптимального варианта СЗ для экструзии была выбрана мГК с содержанием винильных групп 40%; на ее основе были получены ФОК для 3D-печати, как описано в работе Savelyev et al. [15]. В качестве фотоинициатора для данных ФОК использовали флавиномононуклеотид (также известный как витамин В2), который, как и ГК, – эндогенный биосовместимый компонент в композиции. В ФОК также добавляли диакрилат полиэтиленгликоля (ПЭГДА) как инструмент для тонкой настройки свойств скаффолдов – для уменьшения набухания и деформации формы готовых скаффолдов после контакта с водными растворами, в частности с клеточной средой [17]. Следует отметить, что при использовании ГК с СЗ > 60% коэффициент набухания значительно снижается, и в этом случае скаффолды могут быть получены без участия ПЭГДА. Были напечатаны 7-слойные скаффолды в виде решетки с периодом 1.9 мм (рис. 5).

Полученные решетчатые скаффолды были проинкубированы с культурой фибробластов человека Vj-5та в течение 14 сут. На 7-е и 14-е сут с некоторыми образцами был проведен МТТ-тест. Он показал не только отсутствие цитотоксичности, но и значительный прирост количества клеток во времени (рис. 6).

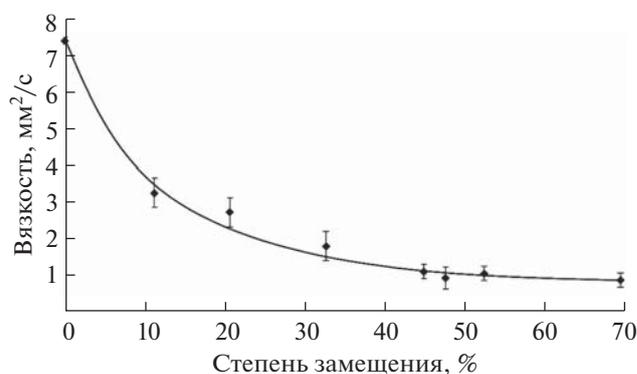


Рис. 4. Кинематическая вязкость водных растворов мГК (0.5 мг/мл) в зависимости от степени замещения. Приведены усредненные значения трех независимых измерений.

Как видно из микрофотографий, приведенных на рис. 7, прикрепление клеток к скаффолдам происходит неравномерно, как правило – в виде клеточных агрегатов в узлах решетки, что согласуется с данными о слабой адгезии клеток к немодифицированной ГК [28, 29]. Однако за 14 сут клетки способны колонизировать поверхность скаффолдов не только на узлах, но и на балках решетки.

Данные микроскопии и МТТ-теста показывают отсутствие цитотоксичности, умеренную адгезию клеток к поверхности скаффолдов и рост клеток в течение 14 сут инкубирования. Адгезия клеток к поверхности скаффолдов может быть повышена за счет ее покрытия другими биосовместимыми веществами, формирующими полиэлектролитный комплекс с ГК, например, коллагеном, хитозаном или поли-L-лизинном [30].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. Натриевую соль гиалуроновой кислоты (ГК, ~100 кДа), глицидилметакрилат (ГМА), триэтиламин (ТЭА), тетраэтиламмоний бромид (ТЭАБ), перманганат калия (KMnO₄) и полиэтиленгликоль диакрилат (ПЭГДА, ~575 Да) (Merck, Германия), а также ацетон, диметилформамид (ДМФА), диметилсульфоксид, концентрированную соляную кислоту (Химмед, Россия) применяли без дополнительной очистки. Использовали коммерческие препараты флавиномононуклеотид (Фармстандарт, Россия) и Амфотерицин В (ОАО «Синтез», Россия). Пенициллин-стрептомицин, фосфатно-солевой буфер (рН 7.4), среда DMEM с 10% фетальной бычьей сыворотки и 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (краситель МТТ) были получены из ПанЭко (Россия).

Получение мГК. Для проведения реакции ГК растворяли в дистиллированной воде в концентрации 0.50 или 0.77 мас. %. После полного рас-

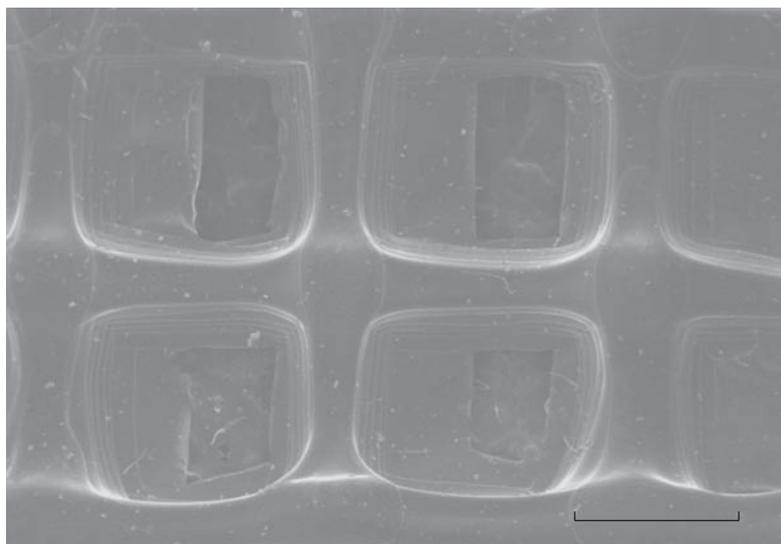


Рис. 5. Изображение скаффолда из мГК, полученное методом сканирующей электронной микроскопии. Масштабный отрезок – 1 мм.

творения ГК добавляли ДМФА в объемном соотношении вода/ДМФА = 1.6 : 1 (или 1.2 : 1) для получения водно-органической среды для растворения ГМА. Для предотвращения роста микроорганизмов в реакционную смесь также добавляли на 100 мл воды 500 мкл пенициллин-стрептомицина (5000 ед./мл пенициллина G и 5000 мкг/мл стрептомицина) и 128 мкл амфотерицина В (5 мг/мл). Для изучения влияния катализаторов межфазного переноса в реакционную смесь добавляли ТЭА или ТЭАБ в массовом соотношении ГК/катализатор = 1 : 4.2 или 1 : 0.64 соответственно. После тщательного перемешивания всех компонентов вводили ГМА в различном соотношении ГК/ГМА (г/мл): 1 : 6, 1 : 8, 1 : 12, 1 : 14, 1 : 18 и 1 : 24. После растворения ГМА реакционную смесь оставляли при

постоянном перемешивании при 25 или 40°C на 1, 2, 3 или 4 сут. Для остановки реакции и выделения мГК продукт осаждали в 7-кратном избытке ацетона и отделяли осадок центрифугированием. Для очистки продукта осадок растворяли в дистиллированной воде и диализовали против 10-кратного избытка дистиллированной воды в течение 3 сут с ежедневной сменой воды. После очистки продукт замораживали и лиофильно высушивали в течение 2 сут до полного удаления воды.

Определение степени замещения мГК реакцией Вагнера. Для количественного определения привитых винильных групп использовали реакцию KMnO_4 с двойными связями мГК, контролируруемую по изменению цвета. Для этого 1 мл 0.025%-ного водного раствора KMnO_4 (стандарт) титровали 0.5%-ным водным раствором мГК до полного изменения окраски (от фиолетовой к желтой). Окончание реакции подтверждали спектрофотометрически по исчезновению пиков поглощения KMnO_4 в области 450–600 нм. Все спектры поглощения регистрировали на УФ-ВИД-спектрофотометре Evolution 201 (Thermo Fisher Scientific, США).

Степень замещения (СЗ) ГК винильными группами определяли как отношение количества привитых звеньев с двойной связью к суммарному количеству дисахаридных звеньев в исследуемых образцах. Количество двойных связей, которое необходимо для полного восстановления стандартного раствора KMnO_4 , определяли титрованием этого стандарта водным раствором свободного ГМА, как описано в работе Sochilina et al. [24]. Количество дисахаридных звеньев определяли по тому количеству аналита мГК, которое

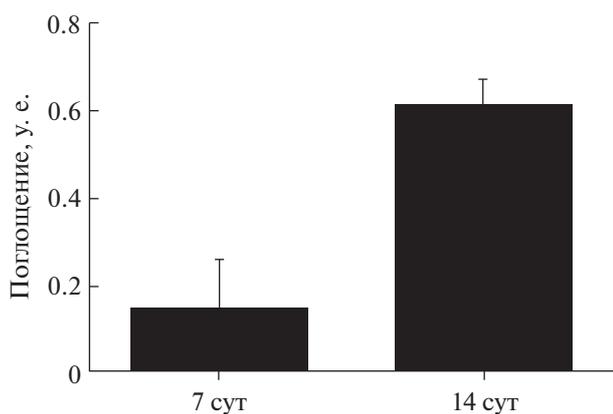


Рис. 6. Рост иммортализованных фибробластов человека Vj-5ta на поверхности скаффолдов. Представлены результаты МТТ-теста. Приведены усредненные значения пяти независимых измерений.

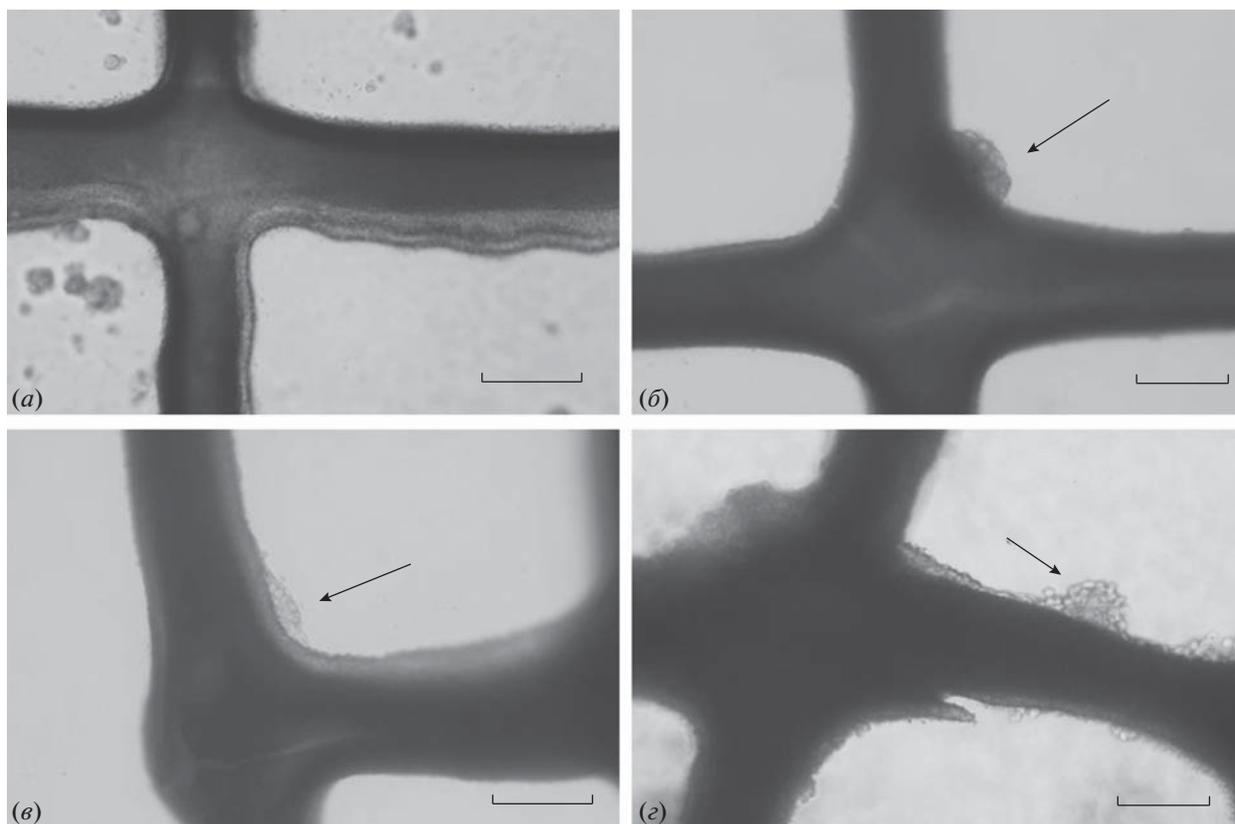


Рис. 7. Оптическая микроскопия скаффолдов с культурой фибробластов человека Vj-5ta в течение 1 сут (а), 6 сут (б), 9 сут (в) и 14 сут (г) инкубации. Стрелки указывают на клеточные агрегаты. Масштабный отрезок – 300 мкм.

требовалось для полного восстановления стандартного раствора KMnO_4 .

Вискозиметрия растворов мГК. Для измерения кинематической вязкости разбавленных растворов мГК (0.5%) использовали вискозиметры ВПЖ-2 0.34 и ВПЖ-2 0.56 (ЭКРОСХИМ, Россия). Для подсчета вязкости высчитывали время истечения жидкости из камеры вискозиметра при 37°C , затем использовали следующую формулу:

$$V = \frac{g}{9.807} \times K \times T,$$

где V – кинематическая вязкость жидкости, $\text{мм}^2/\text{с}^2$; g – ускорение свободного падения в месте измерений, $\text{м}/\text{с}^2$; K – постоянная вискозиметра, $\text{мм}^2/\text{с}^2$; T – время истечения жидкости, с. Константы вискозиметров составляли $0.003410 \text{ мм}^2/\text{с}^2$ для ВПЖ-2 0.34 и $0.008745 \text{ мм}^2/\text{с}^2$ для ВПЖ-2 0.56. Ввиду широкого разброса вязкостей образцов мГК для $\text{СЗ} > 45\%$ использовали вискозиметр ВПЖ-2 0.34, а для $\text{СЗ} < 45\%$ и немодифицированной ГК – ВПЖ-2 0.56.

Получение фотоотверждаемых композиций (ФОК) и скаффолдов на основе мГК. Для приготовления композиций, способных к фотоотверждению, мГК, ПЭГДА и флавиномононуклеотид

смешивали вместе в фосфатно-солевом буфере и обрабатывали в ультразвуковой ванне в течение 1 ч. Затем смесь оставляли на 24 ч в темноте и снова обрабатывали в ультразвуковой ванне 1 ч до приготовления гомогенной ФОК. Манипуляции при необходимости повторяли, если композиции не сразу получались гомогенными. Конечные соотношения компонентов составляли: 20 мас. % мГК, 5 мас. % ПЭГДА и 0.01 мас. % флавиномононуклеотида, аналогично работе Savelyev et al. [15]. Все манипуляции с ФОК проводили при желтом свете, чтобы избежать преждевременного фотоотверждения. Скаффолды печатали на 3D-принтере в виде решетчатых структур. Сначала ФОК загружали в шприц с фильерой в виде капилляра длиной 5 мм и диаметром 250 мкм. Экструзию ФОК запускали поршнем шприца. Скорость движения поршня, как и позицию шприца X-Y-Z, контролировали G-кодом в программе Repetier. Фотоотверждение экструдированной ФОК проводили лазерным облучением синим светом при 450 нм (интенсивность облучения составляла $70 \text{ мВ}/\text{см}^2$). После изготовления скаффолды дополнительно оставляли в герметичной емкости под лазерным облучением 450 нм интенсивностью $5 \text{ мВт}/\text{см}^2$ на 3 ч для обеспечения полного протекания кросс-сшивки.

Испытания мГК скаффолдов с клетками *in vitro*. Скаффолды мГК помещали на неадгезивную (агарозную) поверхность 24-луночного планшета и вносили в каждую лунку по 10^5 клеток иммортализованных фибробластов человека Vj-5ta (клетки были получены из Банка опухолевых штаммов ФГБУ “НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина” Минздрава России) в 1 мл среды DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки. Клетки инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 14 сут, каждые 3 сут проводили полную замену среды. Прикрепление и рост клеток контролировали с использованием инвертированного микроскопа Olympus CKX53 (Olympus, Япония).

МТТ-тест. Количественную оценку роста клеток на поверхности скаффолдов, а также исследование динамики колонизации матриц проводили с помощью МТТ-теста. Для этого в лунки 24-луночного планшета, содержащие скаффолды с прикрепленными к ним клетками, добавляли краситель МТТ до финальной концентрации 0.5 мг/мл и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 3 ч. Затем скаффолды с окрашенными клетками переносили в чистые лунки, промывали в фосфатно-солевом буфере для удаления неприкрепившихся клеток и элюировали образовавшийся формазан с использованием диметилсульфоксида (400 мкл на лунку, 20 мин при комнатной температуре). Концентрацию формазана определяли спектрофотометрически (Multiskan FC, США) при длине волны 570 нм. Скаффолды, не заселенные клетками, использовали в качестве контроля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе предложен подход для эффективного управления степенью замещения гиалуроновой кислоты, модифицированной глицидилметакрилатом, путем изменения различных параметров реакции (рН, время, температура, тип катализатора, соотношение ГК/ГМА). Такой подход позволяет точно контролировать свойства получаемых производных гиалуроновой кислоты в зависимости от конечных целей использования. В результате проведенного исследования были получены фотоотверждаемые композиции, оптимизированные под 3D-печать, и изготовлены скаффолды, способные обеспечивать адгезию, рост и пролиферацию клеток на своей поверхности.

Проведенное исследование — базовая платформа для дальнейшего развития технологии получения скаффолдов на основе гиалуроновой кислоты, в том числе создаваемых *in situ* в живом организме. Кроме того, разработанный подход позволяет получать скаффолды уникальной архитектуры, например, в виде полых цилиндров для замещения поврежденных сосудов, что открыва-

ет новые возможности их использования в регенеративной медицине.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность Д.А. Хоченкову за предоставление иммортализованных фибробластов человека Vj-5ta.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-33-90285-аспиранты — модификация гиалуроновой кислоты и изучение ее свойств) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках выполнения работ по госзаданию Федерального научно-исследовательского центра “Кристаллография и фотоника” РАН (фотоотверждение полимерных композиций).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Langer R., Vacanti J. // Science. 1993. V. 260. P. 920–926.
<https://doi.org/10.1126/science.8493529>
2. Howard D., Buttery L.D., Shakesheff K.M., Roberts S.J. // J. Anat. 2008. V. 213. P. 66–72.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00878.x>
3. Almouemen N., Kelly H.M., O’Leary C. // Comput. Struct. Biotechnol. J. 2019. V. 17. P. 591–598.
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.04.008>
4. Collins M.N., Birkinshaw C. // Carbohydr. Polym. 2013. V. 92. P. 1262–1279.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.028>
5. Nikolova M.P., Chavali M.S. // Bioact. Mater. 2019. V. 4. P. 271–292.
<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2019.10.005>
6. Qu H., Fu H., Han Z., Sun Y. // RSC Adv. 2019. V. 9. P. 26252–26262.
<https://doi.org/10.1039/C9RA05214C>
7. Хвостов М.В., Толстикова Т.Г., Борисов С.А., Душкин А.В. // Биоорг. химия. 2019. Т. 46. С. 563–575. [Khvostov M.V., Tolstikova T.G., Borisov S.A., Dushkin A.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 438–450.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162019060219>
8. Kim H., Jeong H., Han S., Beack S., Hwang B.W., Shin M., Oh S.S., Hahn S.K. // Biomaterials. 2017. V. 123. P. 155–171.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.01.029>

9. Mohammadi F., Samani S.M., Tanideh N., Ahmadi F. // *Adv. Pharm. Bull.* 2018. V. 8. P. 11–19. <https://doi.org/10.15171/apb.2018.002>
10. Guan Y., You H., Cai J., Zhang Q., Yan S., You R. // *Carbohydr. Polym.* 2020. V. 239. P. 116232. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116232>
11. Fujita S., Hara S., Hosono A., Sugihara S., Uematsu H., Suye S. // *Adv. Polym. Technol.* 2020. V. 2020. P. 1–7. <https://doi.org/10.1155/2020/1470819>
12. Fahmy A., Kamoun E.A., El-Eisawy R., El-Fakharany E.M., Taha T.H., El-Damhougy B.K., Abdelhai F. // *J. Braz. Chem. Soc.* 2015. V. 26. P. 1466–1474. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150115>
13. Khunmanee S., Jeong Y., Park H. // *J. Tissue Eng.* 2017. V. 8. P. 204173141772646. <https://doi.org/10.1177/2041731417726464>
14. Poldervaart M.T., Goversen B., de Ruijter M., Abbadessa A., Melchels F.P.W., Öner F.C., Dhert W.J.A., Vermonden T., Alblas J. // *PLoS One.* 2017. V. 12. P. e0177628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177628>
15. Savelyev A.G., Sochilina A.V., Akasov R.A., Mironov A.V., Semchishen V.A., Generalova A.N., Khaydukov E.V., Popov V.K. // *Sovrem. Tehnol. Med.* 2018. V. 10. P. 88. <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.1.11>
16. Lam T., Dehne T., Krüger J.P., Hondke S., Endres M., Thomas A. // *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 2019. V. 107. P. 2649–2657. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34354>
17. Savelyev A.G., Bardakova K.N., Khaydukov E.V., Generalova A.N., Popov V.K., Chichkov B.N., Semchishen V.A. // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 2017. V. 341. P. 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2017.03.026>
18. Guo C., Qu X., Rangaswamy N., Leehy B., Xiang C., Rice D. // *PLoS One.* 2018. V. 13. P. e0196529. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196529>
19. Baier L.J., Bivens K.A., Patrick C.W., Jr., Schmidt C.E. // *Biotechnol. Bioeng.* 2003. V. 82. P. 578–589. <https://doi.org/10.1002/bit.10605>
20. Oudshoorn M.H.M., Rissmann R., Bouwstra J.A., Hennink W.E. // *Polymer.* 2007. V. 48. P. 1915–1920. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2007.01.068>
21. Bencherif S.A., Srinivasan A., Horkay F., Hollinger J.O., Matyjaszewski K., Washburn N.R. // *Biomaterials.* 2008. V. 29. P. 1739–1749. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.11.047>
22. Tsanaktidou E., Kammona O., Kiparissides C. // *Eur. Polym. J.* 2019. V. 114. P. 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.02.024>
23. Yousefi F., Kandel S., Pleshko N. // *Appl. Spectrosc.* 2018. V. 72. P. 1455–1466. <https://doi.org/10.1177/0003702818785353>
24. Sochilina A.V., Savelyev A.G., Demina P.A., Sizova S.V., Zubov V.P., Khaydukov E.V., Generalova A.N. // *Meas. Sci. Technol.* 2019. V. 30. P. 075102. <https://doi.org/10.1088/1361-6501/ab0fb4>
25. Reis A.V., Fajardo A.R., Schuquel I.T.A., Guilherme M.R., Vidotti G.J., Rubira A.F., Muniz E.C. // *J. Org. Chem.* 2009. V. 74. P. 3750–3757. <https://doi.org/10.1021/jo900033c>
26. Li Q., Wang D., Elisseeff J.H. // *Macromolecules.* 2003. V. 36. P. 2556–2562. <https://doi.org/10.1021/ma021190w>
27. Lowry K.M., Beavers E.M. // *J. Biomed. Mater. Res.* 1994. V. 28. P. 1239–1244. <https://doi.org/10.1002/jbm.820281014>
28. Pavesio A., Renier D., Cassinelli C., Morra M. // *Med. Device Technol.* 1997. V. 8. No 7. P. 20–21, 24–27.
29. Morra M., Cassinelli C. // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1999. V. 10. P. 1107–1124. <https://doi.org/10.1163/156856299X00711>
30. Yamanlar S., Sant S., Boudou T., Picart C., Khademhosseini A. // *Biomaterials.* 2011. V. 32. P. 5590–5599. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.04.030>

Preparation of Modified Hyaluronic Acid with Controlled Content of Vinyl Groups for Scaffold Production by Photoinduced Cross-Linking Method

A. V. Sochilina^{*, **, #}, A. G. Savelyev^{**, ***}, R. A. Akasov^{*, **, ***}, V. P. Zubov^{*},
E. V. Khaydukov^{*, **, ***}, and A. N. Generalova^{*}

[#]E-mail: ddraig@yandex.ru

^{*}Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^{**}Federal Scientific Research Centre “Crystallography and Photonics” RAS, Leninskiy prosp. 59, Moscow, 119333 Russia

^{***}Sechenov First Moscow State Medical University, ul. Trubetskaya 8/2, Moscow, 119991 Russia

Materials based on hyaluronic acid (HA) are actively used as scaffolds for tissue engineering tasks. One of the methods for their preparation is the reaction of photoinduced crosslinking, which requires modification of HA with vinyl groups capable of radical reactions under light irradiation. An important characteristic of modified HA (mHA) is the amount of grafted vinyl groups represented as the degree of substitution (DS), which is responsible for mechanical, chemical, and biological properties of scaffolds. In this work the possibility of controlled DS regulation via reaction parameters change (composition and concentration of chemical agents, reaction conditions) is shown, as well as the effect of DS on the viscosity of mHA solutions. An example of photoinduced reaction of mHA in the presence of flavin mononucleotide as initiator for noncytotoxic scaffold production by 3D printing is demonstrated. Aspects of fibroblast growth on scaffold surface were studied.

Keywords: hyaluronic acid, glycidyl methacrylate, scaffolds, polymer analogous reactions