

Волкова М.В.<sup>1,2</sup> ✉, Ковалевский Я.Б.<sup>2</sup>, Еремин П.С.<sup>1</sup>, Марков П.А.<sup>1</sup>

## Влияние модификации хитозана аскорбиновой, гликолиевой и молочной кислотами на цитосовместимость с клетками человека

<sup>1</sup> ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр реабилитологии и курортологии Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup> Химическая компания «Орион», Санкт-Петербург, Россия

✉ biotech.volkova@list.ru

**Аннотация.** С целью разработки новых высокоэффективных повязок для лечения ран были изготовлены губки на основе водорастворимых производных хитозана. Установлено, что изделия из лактата или гликолата хитозана стимулируют пролиферативную активность мезенхимальных стволовых клеток человека.

**Ключевые слова:** аскорбат хитозана; гликолат хитозана; лактат хитозана; цитотоксичность; мезенхимальные стволовые клетки человека.

Volkova M.V.<sup>1,2</sup>, Kovalevsky Ya.B.<sup>2</sup>, Eremin P.S.<sup>1</sup>, Markov P.A.<sup>1</sup>

## Effect of chitosan modification with ascorbic, glycolic and lactic acids on cytocompatibility with human cells

<sup>1</sup> National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Chemical company "Orion", Saint Petersburg, Russia

**Abstract.** In order to develop new highly effective dressings for wound treatment, sponges based on water-soluble chitosan derivatives were manufactured. It was found that products made from chitosan lactate or glycolate stimulate the proliferative activity of human mesenchymal stem cells.

**Keywords:** chitosan ascorbate; chitosan glycolate; chitosan lactate; cytotoxicity; human mesenchymal stem cells.

Несмотря на многочисленное количество разработанных и зарегистрированных раневых покрытий, до сих пор существует острая необходимость в создании и производстве высокоэффективных медицинских изделий. В первую очередь, это касается лечения незаживающих (хронических) ран, таких как пролежни, диабетические язвы стопы и хронические венозные язвы ног. Основная опасность данных заболеваний заключается в том, что они имеют высокие риски ампутации конечностей или пальцев, а их поздние стадии характеризуются высоким уровнем смертности пациентов. В целом, хронические раны приводят к снижению качества жизни и увеличению нагрузки на систему здравоохранения, так как пациенты с такими заболеваниями длительно пребывают в медицинских учреждениях [1].

Перспективным и используемым полимером для изготовления раневых повязок и биологически активных покрытий является хитозан, участвующий во всех стадиях заживления ран [2]. Путем химического синтеза получают различные производные хитозана, например его водорастворимые соли. Это позволяет модулировать физико-химические, механические и биологические свойства раневого покрытия, в том числе адгезию, пролиферативную и функциональную активность клеток, вовлеченных в процессы регенерации поврежденной ткани.

В исследовании оценивали биосовместимость губок из аскорбата хитозана, гликолата хитозана и лактата хитозана, в отношении мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) человека. Губки были получены методом лиофильного высушивания. Плотность губок варьируется в пределах от 0,16 до 0,29 г/см<sup>3</sup>;

pH водной вытяжки от 4,2 до 5,0; сорбционная емкость по воде от 4,0 до 11,8 г/г. Перед началом цитологических исследований все изделия прошли радиационную стерилизацию. Губки были предоставлены ООО Химическая компания «Орион».

Исследования проводили на клеточной культуре ММСК человека. Образцы губок нарезали на фрагменты размером 1×1 см и предварительно инкубировали в питательной среде DMEM/F12 (Biowest, Франция) с 10% FBS (Biowest, Франция) в течение 24 часов при 37°C. ММСК высаживали в 6-луночные и 96-луночные планшеты для оценки морфологических характеристик клеток и проведения МТТ-теста. Через сутки питательную среду от исследуемых образцов отбирали для оценки цитотоксичности, а фрагменты губок переносили в лунки 6-луночного планшета. Для изучения влияния образцов на морфологию клеток ММСК культивировали с образцами в течение двух суток, затем проводили окрашивание клеток родамином. Размеры и количество клеток оценивали с использованием световой и люминесцентной микроскопии и встроенного программного обеспечения Image Analysis (Leica Microsystems). Для определения цитотоксичности продуктов биodeградации использовали кондиционированную питательную среду, полученную после инкубации образцов. Для этого инкубационную среду разводили в концентрациях от 0,5 до 10 мг сухой массы губки на 1 мл свежей питательной среды. ММСК с исследуемыми средами инкубировали в течение 24 часов. Определение с помощью МТТ проводили по стандартному протоколу, растворение кристаллов формазана осуществляли в ДМСО (Sigma Aldrich, США).

Установлено, что при совместной инкубации губок из лактата и гликолата хитозана с ММСК человека они не оказывают влияния на морфологию клеток, размеры и форма клеток сопоставимы с контрольными значениями. Губки из аскорбата хитозана вызывают гибель клеток. Оценка влияния продуктов биodeградации хитозановых губок на метаболическую активность клеток показала, что среда, полученная из лактата хитозана, в среднем на 20–30% стимулирует метаболическую активность клеток во всем диапазоне исследованных концентраций. Кондиционированная среда, полученная из гликолата хитозана в концентрации 10 мг/мл, ингибирует метаболическую активность ММСК. Уменьшение концентрации кондиционированной питательной среды до 5 мг/мл демонстрирует стимулирующее действие: метаболическая активность клеток увеличивается на 30–50% по сравнению с контролем.

Таким образом, полученные результаты указывают, что губки из лактата хитозана могут быть использованы как самостоятельные медицинские изделия для закрытия ран, так и в качестве каркасов для тканевой инженерии. Для повышения биологической активности губок из гликолата хитозана, вероятно, целесообразно снизить концентрацию гликолевой кислоты в составе хитозана. Модификация хитозана аскорбиновой кислотой не целесообразна при изготовлении биоматериалов медицинского назначения.

## Список литературы

1. Barrientos S., Brem H., Stojadinovic O., Tomic-Canic M. Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing // *Wound Repair Regen.* 2014. Vol. 22, N 5. P. 569–578. doi: 10.1111/wrr.12205
2. Xu X., Zeng Y., Chen Z., et al. Chitosan-based multifunctional hydrogel for sequential wound inflammation elimination, infection inhibition, and wound healing // *Int J Biol Macromol.* 2023. Vol. 235. ID 123847. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123847