

Бардакова Ксения Николаевна

**Влияние структуры и физико-механических свойств  
трехмерных биodeградируемых полимерных  
материалов на их биосовместимость и клеточную  
адгезию**

1.4.7 – высокомолекулярные соединения

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Работа выполнена в Институте фотонных технологий Российской академии наук Федерального государственного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук»

**Научный  
руководитель:**

**Тимашев Петр Сергеевич**  
доктор химических наук, доцент

**Официальные  
оппоненты:**

**Мелик-Нубаров Николай Сергеевич**  
доктор химических наук, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, ведущий научный сотрудник

**Сивцов Евгений Викторович**  
доктор химических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)", факультет химии веществ и материалов, профессор

**Ведущая  
организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук

Защита состоится « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 года в \_\_\_\_\_ на заседании диссертационного совета 24.1.243.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Федеральном исследовательском центре химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук (ФИЦ ХФ РАН) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФИЦ ХФ РАН и на сайте <http://www.chph.ras.ru>.

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета 24.1.243.01  
кандидат химических наук

Ладыгина Татьяна Александровна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Проблема повышения биосовместимости разрабатываемых биodeградируемых полимерных материалов и обеспечение направленного роста клеток, культивируемых на их поверхности, являются одними из центральных задач тканевой инженерии. При этом выбор базовых биodeградируемых материалов в настоящее время довольно ограничен: это природные полимеры, прежде всего, хитозан (полисахарид) и коллаген (белок), а также синтетический полилактид.

*Хитозан* – природный катионный полиэлектролит, демонстрирует противогрибковые и антимикробные свойства, минимальный тканевый ответ при имплантации. Аминогруппы хитозана могут быть протонированы и получившийся поликатион может образовывать ионные комплексы с белками, липидами, отрицательно заряженными синтетическими полимерами, взаимодействовать с поверхностью мембран клеток. *Коллаген* – волокнистый белок, преобладает во всех биологических тканях (коже, костях, хрящах), гидрофилен, характеризуется минимальной антигенностью, способен к ферментативной биodeградации.

Несмотря на обширные возобновляемые источники получения и уникальные свойства хитозана и коллагена, существует ограниченное число биodeградируемых материалов на их основе, которые преимущественно представлены в форме гелей, порошков, коллоидных растворов, пленок, губок и используются для закрытия плоскостных раневых дефектов кожи.

Для расширения количества доступных биodeградируемых материалов на основе хитозана и коллагена актуальна разработка полимерных композиций, из которых могут быть сформированы *трехмерные структуры* для восстановления поврежденных тканей и органов. В качестве методов изготовления подобных структур особого внимания заслуживают однофотонная и двухфотонная лазерная стереолитография, с помощью которых получают трехмерные структуры с необходимыми пористостью и шероховатостью. Для масштабирования методов лазерной стереолитографии в регенеративной медицине, как правило, требуется разработка широкой номенклатуры биосовместимых *фотополимеризующихся композиций (ФПК)*, что и явилось одной из задач этой работы.

Необходимо отметить, что природные полимеры зачастую демонстрируют низкие механические характеристики, обладают высокой скоростью деградации, тогда как использование их в смеси с *синтетическими* полимерами позволяет значительно улучшить свойства биodeградируемых материалов, добиться того, чтобы *физико-механические свойства* трехмерных структур были *сопоставимы* со свойствами замещаемой ткани. Среди синтетических биodeградируемых полимеров привлекательными для тканевой инженерии являются полиэферы, в частности, *полилактид (ПЛА)*, а также полимеры на основе *полиэтиленгликоля*. В связи с этим, в настоящей работе для преодоления указанных недостатков использовали смеси хитозана с *диакрилатом полиэтиленгликоля (ПЭГ-ДА)*, а для получения коллагеновых биodeградируемых материалов – фоточувствительный разветвленный ПЛА.

Важным этапом для улучшения биосовместимости и *контроля клеточного поведения*, а именно регулирования степени адгезии и направления клеточного роста, является пост-обработка биodeградируемых материалов различными методами. Для регенеративной медицины оптимальным способом такой пост-обработки оказалась обработка биodeградируемых материалов в *сверхкритическом диоксиде углерода (скСО<sub>2</sub>)*, что обусловлено специфическими физико-химическими свойствами этой среды: нетоксичностью, относительной инертностью в химических процессах, низкими вязкостью и поверхностным натяжением, высокими коэффициентами диффузии модифицирующих компонентов в этой среде. Обработку скСО<sub>2</sub> можно рассматривать как способ регулирования механических

свойств и шероховатости поверхности биodeградируемых материалов, а также использовать для стерилизации и экстракции низкомолекулярных компонентов из полимерных конструкций.

В свою очередь, контроль адгезии клеток к биodeградируемым материалам и создание определенного пространственного положения клеток достигается путем формирования участков с различным химическим составом, механическими свойствами, шероховатостью. Так, формирование на поверхности биodeградируемых материалов *полимерных шаблонов* с использованием фотолabileльных молекул и облучения стало одним из многообещающих методов регулирования клеточного поведения.

С учетом изложенного, была определена **цель работы**, состоящая в разработке новых фотополимеризующихся композиций на основе природных и синтетических биodeградируемых полимеров, их структурировании методами лазерной стереолитографии и комплексном исследовании свойств сформированных материалов биомедицинского назначения, в том числе после этапа их пост-обработки в среде  $\text{scCO}_2$  и лазерно-индуцированного нанесения полимерных шаблонов различной геометрии.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Подобрать соотношения компонентов ФПК на основе хитозана и ФПК на основе ПЛА; определить условия формирования полимерных материалов биомедицинского назначения методами лазерной стереолитографии и *двухфотонной полимеризации (2ФП)*; охарактеризовать механические и гидрофобно-гидрофильные свойства (набухание, смачиваемость) сформированных полимерных материалов, их внутреннюю структуру и топографию, рассчитать поверхностную энергию и ее составляющие.

2. Разработать комбинированный подход (УФ-сшивание и лазерно-индуцированное нанесение армирующих шаблонов из ПЛА) для получения упрочненных коллагеновых конструкций, способных контролировать клеточное поведение; установить взаимосвязи между геометрией армирующего шаблона, параметрами лазерной обработки и механическими характеристиками полимерных конструкций.

3. Для трехмерных конструкций на основе хитозана исследовать пост-обработку в среде  $\text{scCO}_2$ ; установить влияние статического и проточного режима пост-обработки на свойства поверхности (шероховатость, контактные и равновесные углы смачивания, энергетические свойства), биосовместимость и механические свойства трехмерных конструкций.

4. Провести исследования цитотоксичности, долгосрочной стабильности полимерных материалов на основе хитозана и ПЛА, а также способности коллагеновых конструкций с полилактидными шаблонами поддерживать направленный клеточный рост.

**Научная новизна.** Впервые из ФПК на основе хитозана получен широкий ряд биodeградируемых материалов различной конфигурации: полимерные носители, пленочные и губчатые конструкции, трехмерные микроструктуры. Продемонстрировано, что с ростом степени замещения хитозана аллильными фрагментами может быть увеличен диапазон оптимальных скоростей сканирования лазерным излучением и формируемая трехмерная конструкция становится более устойчивой в водных средах.

Показано, что стереохимический состав привитых цепей хитозана влияет на параметры лазерного структурирования и механические свойства трехмерных структур: ФПК, основанная на сополимере хитозана с олиго(L,D)-лактидом, демонстрирует более широкое окно параметров печати, при этом сформированные структуры характеризуются большим модулем упругости в сравнении с сополимером хитозана с олиго(L,L)-лактидом.

Установлено, что в отличие от стандартной процедуры отмывки в растворителях, обработка трехмерных структур в среде  $\text{scCO}_2$  позволяет экстрагировать несшитые

компоненты ФПК. Такая обработка является перспективным методом предстерилизационной подготовки полимерных гидрогелевых структур и также способом регулирования свойств поверхности биodeградируемых материалов (шероховатости, локального модуля упругости, углов смачивания, поверхностной энергии).

Предложен новый подход к получению упрочненных коллагеновых биodeградируемых материалов с помощью комбинирования фотохимического сшивания и лазерно-индуцированного нанесения армирующих шаблонов из фоточувствительного ПЛА. Продемонстрирован рост модуля упругости до 7 раз, показана адгезия коллагеновых материалов в отношении первичных мышечных фибробластов и *мезенхимальных стволовых клеток (МСК)* костного мозга человека, также направленная пролиферация клеток, при том, что для коллагеновых материалов без шаблона селективная адгезия к поверхности не наблюдалась.

**Практическая значимость.** Показано, что путем изменения количества введенных в структуру хитозана гидрофобных фрагментов, а также стереохимического состава привитых цепей возможно формировать полимерные носители требуемых размеров, в широком диапазоне регулировать механические свойства трехмерных конструкций, повышать производительность лазерного структурирования.

Продемонстрировано, что введение аллильных групп повышает основные свойства молекулы хитозана, тем самым препятствует некротическим и островоспалительным изменениям тканей при имплантации трехмерных конструкций *in vivo*. Разработанные фотополимерные композиции и подобные трехмерные конструкции на их основе могут быть перспективны для восстановления тканевых дефектов критического размера (от 1 см).

Пост-обработка полимерных биodeградируемых материалов в среде  $\text{scCO}_2$  может быть актуальна для культивирования тканеспецифичных клеток, чувствительных к нанотопографии, и помимо этого применяться для биodeградируемых материалов другого состава, когда требуется регулирование механических свойств для их соответствия со свойствами регенерируемых тканей или изменение полярности поверхности и ее гидрофобизация, например, для последующей модификации биodeградируемых материалов протеинами.

Предложенные условия лазерно-индуцированного нанесения армирующего полилактидного шаблона могут быть перспективны для замены химического сшивания коллагеновых материалов, в том числе децеллюляризованных. Кроме того, возможно регулировать механические и поверхностные свойства структур, тем самым осуществлять контроль за клеточным поведением, создавать определенное пространственное положение клеток.

Формирование на коллагеновых материалах флуоресцирующих полилактидных шаблонов в дальнейшем позволит исследовать их биodeградацию *in vivo* без необходимости разрабатывать сложные гистологические процедуры и жертвовать экспериментальными животными.

Хорошая совместимость трехмерных микроструктур на основе производных хитозана с первичной культурой гиппокампа и формирование на поверхности микроструктур морфологически полноценной нейронной сети представляет интерес с точки зрения их использования для нейротрансплантации.

Полилактидные микроструктуры с модулем упругости 4,11 ГПа заслуживают внимания с точки зрения замещения костных дефектов и инициирования спонтанной остеогенной дифференцировки.

**Положения, выносимые на защиту.** Получение широкого ряда биodeградируемых материалов различной конфигурации: полимерных носителей, пленочных и губчатых конструкций, трехмерных микроструктур.

Экспериментальные данные по полученным образцам биodeградируемых материалов: их набуханию и смачиваемости, шероховатости поверхности, деформационно-прочностным характеристикам, ИК- и масс-спектрометрии, РФА, СЭМ; полученные результаты расчета поверхностной энергии и ее составляющих для трехмерных конструкций на основе хитозана до и после УФ-облучения, после обработки в среде  $\text{scCO}_2$ , после перевода хитозана в основную форму.

Экспериментальные данные по зависимости механических свойств коллагеновых материалов (пленочных и губчатых), а также размеров полилактидного шаблона от параметров УФ-сшивания и параметров лазерно-индуцированного нанесения шаблона.

Данные СЭМ, 3D-микроскопии, флуоресцентной и ИК-спектрометрии для немодифицированных и армированных коллагеновых материалов.

**Степень достоверности и апробация работы.** Достоверность результатов диссертационной работы обеспечивается использованием прецизионного оборудования и современных методов характеризации формируемых материалов. Воспроизводимость предложенных условий структурирования и пост-обработки биodeградируемых материалов и конструкций подтверждается проведенными на больших выборках натурными экспериментами (*in vitro*, *in vivo*). Полученные экспериментальные данные верифицированы в рамках отчетов по НИР от государственных ведомств (РФФИ, Минобрнауки России) и согласуются с частично имеющимися в литературе данными других авторов.

По теме диссертации опубликовано 11 статей в журналах из списка ВАК при Минобрнауки РФ, входящих в системы цитирования Web of Science и Scopus; сделано 26 докладов на международных и российских конференциях, получено 2 патента РФ.

Основные результаты работы представлены на II Байкальском материаловедческом форуме (Улан-Удэ, 2015), VI Всероссийской конференции «Актуальные проблемы химии высоких энергий» (Москва, 2015), 69-й Всероссийской школе-конференции молодых ученых (Нижний Новгород, 2016), VIII школе-семинаре молодых ученых России «Проблемы устойчивого развития региона» (Улан-Удэ, 2016), VIII Всероссийском съезде трансплантологов (Москва, 2016), 2 International Scientific Conference “Science of the Future” (Казань, 2016), Первом российском кристаллографическом конгрессе (Москва, 2016), VII Всероссийской Каргинской конференции «Полимеры-2017» (Москва, 2017), Международной XLIII конференции Гагаринские чтения (Москва, 2017), Sechenov International Biomedical Summit (Москва, 2017, 2018); III, IV, VI междисциплинарном научном форуме «Новые материалы и перспективные технологии» (Москва, 2017, 2018, 2020), XX Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2017), III Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2017), VII международной конференции по фотонике и информационной оптике (Москва, 2018), Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы регенеративной медицины, инновации в репродуктологии» (Самара, 2018), II международной конференции «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» (Екатеринбург, 2018), XVII Всероссийской молодежной научной конференции «Функциональные материалы: синтез, свойства, применение» (Санкт-Петербург, 2018), 18th International Conference on Chemistry and Physical Chemistry of Oligomers (Нижний Новгород, 2019), Всероссийской научной школе-семинаре «Методы компьютерной диагностики в

биологии и медицине» (Саратов, 2019), VI Международной конференции «Аддитивные технологии: настоящее и будущее» (online, 2020), XVII Международной научно-практической конференции «Новые полимерные композиционные материалы. Микитаевские чтения» (Нальчик, 2021).

**Личный вклад автора.** Автор принимала участие в постановке задач, подготовке и проведении экспериментальных исследований, в обработке, интерпретации и обобщении полученных результатов, в написании и подготовке работ к печати. Работа выполнена в рамках проведения исследований, включенных в план ИФТ РАН, грантов РФФИ, и дважды поддержана стипендией президента РФ.

**Структура работы.** Диссертация состоит из введения, литературного обзора, методической части, описания и обсуждения результатов, заключения, списков цитируемой литературы, терминов и сокращений, приложений. Работа изложена на 177 страницах, содержит 66 рисунков, 9 таблиц, 16 приложений и 338 библиографических ссылок.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Глава 1. Литературный обзор

Рассмотрены основные требования к материалам биомедицинского назначения. Описаны свойства хитозана, коллагена, полилактида и полиэтиленоксида, приведены аргументы к выбору этих объектов для формирования трехмерных конструкций. Дано общее представление о существующих методах формирования материалов биомедицинского назначения, подробно рассмотрены лазерные методы структурирования и лежащие в их основе физические явления, описана структура и свойства фотоинициаторов (ФИ). Обсуждены методы пост-обработки биоматериалов: модификация в среде  $\text{scCO}_2$ , методы формирования шаблонов для направленного клеточного роста.

### Глава 2. Материалы, методы и приборы

#### 2.1. Материалы

Аллилзамещенные производные хитозана (АХ) и сополимеры хитозана с олиго(L,L-/D,L-лактидом) (ХЛ) синтезированы в условиях сдвиговых деформаций в двухшнековом экструдере («Verstorff ZE 40», Германия) д.х.н. Акоповой Т.А. и д.х.н. Деминой Т.С. в ИСПМ РАН. Исходный хитозан имел степень ацилирования (СА) 0,11 и молекулярную массу (ММ) 80 кДа. В зависимости от образца АХ суммарная степень замещения (на 100 звеньев полимера) (СЗ) аллильными фрагментами изменялась от 8 до 50%. Степень прививки<sup>1</sup> для сополимеров ХЛ составила 35%. В ряде ФПК использовали немодифицированный хитозан (Sonat, Россия) с ММ 350 кДа и СА 0,14. В качестве сшивающего агента использовали диакрилат полиэтиленгликоля (ПЭГ-ДА, 700 и 2000 Да), в качестве ФИ: 4,4'-бис(диэтиламино)бензофенон, Irgacure 2959, флавинмоноклеотид (ФМН).

Коллаген выделен из среднего слоя дермы крупного рогатого скота д.фарм.н. Истрановым Л.П. и к.фарм.н. Истрановой Е.В (Первый МГМУ). Для экспериментов использовали образцы размером 15×15 мм толщиной 2–4 мм в случае губок и толщиной 0,1 мм в случае пленок. Образцы относятся к коллагену I и III типов.

Разветвленный тетрафункциональный фоточувствительный поли(D,L-лактид) синтезирован к.х.н. Пискун Ю.А. (НИИ ФХП БГУ):  $M_n$  (гель-проницающая хроматография) = 4200 г/моль,  $M_w/M_n = 1,18$ .

<sup>1</sup> Степень прививки (%) рассчитывали следующим образом:  $((W_{\text{ХЛ}} - W_{\text{Х}}) / W_{\text{Х}}) \times 100$ , где  $W_{\text{ХЛ}}$  – это масса сополимера после очистки от непрореагировавшего олиголактида,  $W_{\text{Х}}$  – масса хитозана, взятого первоначально для синтеза.

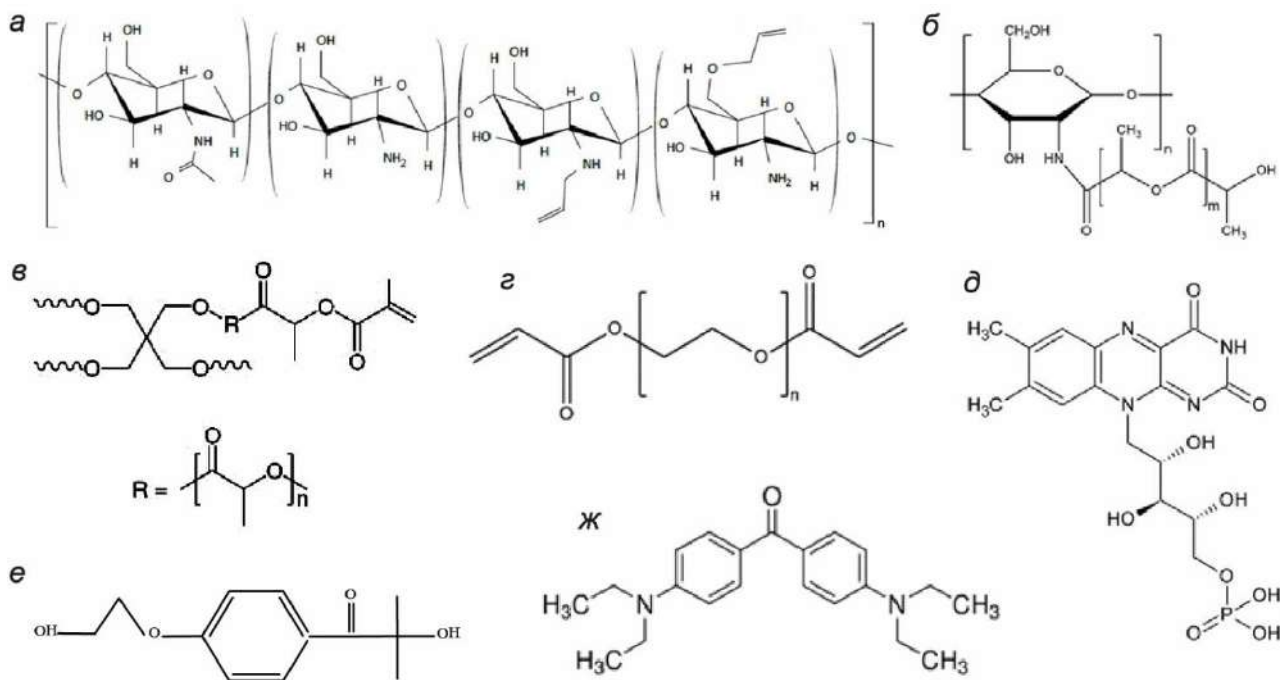


Рис. 1 – Структурные формулы основных веществ: а – аллилхитозан (АХ); б – сополимеры хитозана с олиго(L,L-/D,L-лактидом) (ХЛ); в – разветвленный полилактид; г – диакрилат полиэтиленгликоля (ПЭГ-ДА); д – флавиномононуклеотид (ФМН); е – Irgacure 2959; ж – 4,4'-бис(диэтиламино)бензофенон

## 2.2. Методы и приборы

### Формирование структур на основе хитозана и диакрилата полиэтиленгликоля

Для материалов на основе АХ сформировано три типа структур. Во-первых, пленочные образцы получали методом полива 2%-х уксуснокислых растворов на подложку с последующей сушкой в вытяжном шкафу. Часть образцов облучали ртутной лампой ДРШ-500 (30 мин; 3,1 мВт/см<sup>2</sup>). Во-вторых, гидрогелевые 3D-структуры формировали из АХ (5 мас.%) и смесей АХ/ПЭГ-ДА (5/8 для АХ20 и АХ50; 1/3 для АХ10; сокращения – см. Табл.1) с помощью методов лазерной стереолитографии. В качестве ФИ использовали Irgacure 2959 (1 мас.%). В-третьих, пористые 3D-структуры получали лиофильной сушкой. Для материалов на основе ХЛ сформированы трехмерные микроструктуры методом 2ФП.

При однофотонной стереолитографии трехмерные конструкции формировали на

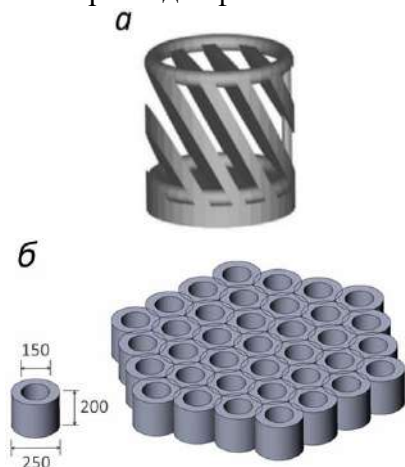


Рис. 2 – Модели трехмерных структур для лазерной стереолитографии (а) и 2ФП (б). На (б) размеры даны в микрометрах

стереолитографе ЛС120 (HeCd-лазер, 325 нм, 15 мВт) при плотности дозы 50 мДж/см<sup>2</sup>, высоте слоя 0,15 мм. В качестве 3D-моделей использовали: (а) пластину 20×20 мм толщиной 1 либо 2 мм, со сквозными овальными отверстиями 1×2 мм. Расстояние между центрами отверстий составляло 4 или 6 мм; (б) цилиндрические структуры в виде скрещенных между собой спиралей и цилиндрические структуры со сквозными прорезями под углом 45° (Рис. 2а). Готовые структуры отмывали от остатков несшитой ФПК в 2%-й уксусной кислоте 1–2 ч, в водном растворе аммиака (25 об.%) 2–4 ч, циклической промывкой дистиллированной водой. После облучали УФ-диодом (365 нм, 3,9 мВт/см<sup>2</sup>).

Для лиофилизации структуры замораживали до температуры –83°С, после уменьшали давление в камере лиофильной установки до 6 мкбар и оставляли на сутки.



Для структурирования методом 2ФП использовали установку Laser nanoFab (иттербиевый лазер, 525 нм, длительность импульса 200 фс, частота 70 МГц). 3D-структуры (Рис. 2б) отмывали от несшитого материала в воде в течение 4–5 ч.

### **Обработка структур в сверхкритическом диоксиде углерода**

Трехмерные структуры обрабатывали на установке SCF Applied Separations (Рис. 3) в двух режимах: статическом и проточном. Обработку в статическом режиме проводили при 40°C и 12 МПа, в проточном – при 12 МПа, скорости потока 5–7 мл/мин, температуре реактора 40°C и температуре вентиля тонкой регулировки 50°C. Время обработки 1,5 ч; после давление понижали до атмосферного в течение 1 ч.

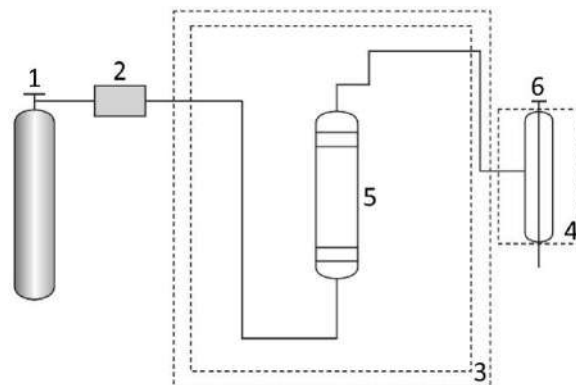


Рис. 3 – Схема скCO<sub>2</sub>-установки: 1 – баллон с CO<sub>2</sub>, 2 – насос высокого давления с элементами Пельтье, 3 и 4 – термостаты реактора высокого давления (5) и вентиля тонкой регулировки (6)

### **Характеризация пленочных образцов и 3D-структур на основе хитозана**

Измерения методом динамического светорассеяния для определения размеров агрегатов, образующихся при растворении АХ (0,02 мас.%) в 2%-й уксусной кислоте, проводили на Zetatrac (США).

Механические испытания пленочных образцов проводили на разрывной машине Shimadzu (Japan) при скорости 1 мм/мин. Перед испытаниями пленки в течение недели выдерживали над насыщенным раствором (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> при влажности 81%.

Рентгенофазовый анализ (**РФА**) проведен к.х.н. Фарионом И.А. (БИП СО РАН) на дифрактометре Bruker (Германия) (CuKα-излучение) с шагом сканирования 0,021°. Образцы закрепляли на подложке из монокристалла кремния.

Для изучения набухания структуры помещали на 2 ч в этанол (ректификат) или аммиак (25 об.%), после – на 9 дней в дистиллированную воду или фосфатно-солевой буфер (**ФСБ**), которые меняли каждые 48 ч. Степень набухания (**SWR**) определяли весовым методом:

$$SWR(\%) = \frac{W_s - W_0}{W_0} \times 100, \quad (1)$$

где  $W_s$  – масса набухшей структуры;  $W_0$  – масса структуры после лиофильной сушки.

Измерение углов смачивания проводили методом лежащей капли. Для расчета свободной энергии поверхности использовали метод Оунса, Вендта, Рабеля и Кьельбле (**метод ОВРК**), согласно которому:

$$\frac{\sigma_l(1 + \cos \theta)}{2\sqrt{\sigma_l^d}} = \sqrt{\sigma_s^d} + \sqrt{\sigma_s^p} \sqrt{\frac{\sigma_l^p}{\sigma_l^d}}, \quad (2)$$

где  $\sigma^d$  и  $\sigma^p$  – дисперсионная и полярная компоненты поверхностной энергии, характеризующие твердое тело  $S$  и жидкость  $L$ .

Для визуализации поверхности и внутренней структуры трехмерных конструкций использовали сканирующий электронный микроскоп Phenom ProX (Нидерланды). Для количественной оценки поверхности, занимаемой порами, использовали ImageJ software.

Шероховатость поверхности исследовали в полуконтактном режиме на атомно-силовом микроскопе «Bruker MultiMode 8», использовали кантилевер с коэффициентом жесткости 6 Н/м, резонансной частотой 150 кГц, радиусом закругления иглы 8 нм.

Измерение локального модуля упругости структур проводили в воде при 37°C на наноиндентере Piima (Нидерланды). Для исходных структур применяли кантилеверы прочностью 0,029 Н/м и радиусом скругления наконечника 17 мкм; для структур, обработанных  $\text{scCO}_2$ : 2,94 Н/м и 45 мкм, соответственно.

ИК-спектры записывали на ИК-Фурье спектрометре PerkinElmer (Великобритания) с разрешением  $4 \text{ см}^{-1}$  и усредняли по 8 сканам. В качестве внутреннего стандарта использовали полосу смешанных по частоте деформационных колебаний C–H и  $\text{CH}_3$ -групп при  $1250 \text{ см}^{-1}$ .

Масс-спектры снимали на спектрометре Thermo Scientific XSeriesII (США) (получены Фениным А.А. (РХТУ им. Д.И. Менделеева)).

#### **Формирование гибридных материалов на основе коллагена и полилактида**

Для формирования коллагеновых материалов с армирующим полилактидным шаблоном (*гибридных материалов*) на первом этапе проводили фотосшивание коллагена с помощью УФ-диода (365 нм,  $3,9 \text{ мВт/см}^2$ , 5–30 мин) в присутствии 5 мМ ФМН. После на коллаген наносили ФПК из фоточувствительного ПЛА (5–9 мас.% в дихлорметане) и 4,4'-бис(диэтиламино)бензофенона (1 мас.%). Формирование армирующих шаблонов производили на лазерном стереолитографе (405 нм, 70 мВт) (собран к.ф.-м.н. Минаевым Н.В. (ИФТ РАН)) и после использовали трехступенчатую схему отмывки: дихлорметан (2–3 сут), этанол (95 об.%), деионизированная вода (4–7 сут).

Для получения микроструктур на основе ПЛА его навеску растворяли в двойном объеме хлористого метилена, добавляли 1 мас.% 4,4'-бис(диэтиламино)бензофенона.

#### **Характеризация гибридных материалов на основе коллагена и полилактида**

Для оценки ширины сформированных линий использовали флуоресцентный микроскоп Kozo XJF900 (Китай) и 3D-микроскоп Nuvitz (Южная Корея). ИК-микроскопию проводили на микроскопе PerkinElmer (Великобритания) с МСТ-детектором (теллурид ртути и кадмия). Изображения перестраивали по длине волны  $1547 \text{ см}^{-1}$ . ИК-спектры коллагена откалиброваны по интенсивности C–H колебания ( $2932 \text{ см}^{-1}$ ).

Локальные механические характеристики измеряли наноиндентером в воде при 37°C с кантилевером прочностью 0,45 Н/м и радиусом скругления наконечника 26,5 мкм для губчатых материалов; 0,052 Н/м и 9 мкм для пленочных материалов. Испытания на растяжение проводили при комнатной температуре со скоростью 5 мм/мин в направлении, параллельном линиям армирования.

#### **Исследования *in vitro* и *in vivo***

Биосовместимость образцов изучена МТТ-тестом с использованием фибробластов линий NCTC L929 и NIH 3T3, адгезионные характеристики – с использованием МСК. Для *пленочных гибридных материалов (ПГМ)* проанализирована контактная цитотоксичность, основанная на измерении высвобождения лактатдегидрогеназы из фибробластов NIH 3T3. Для изучения адгезивности и роста клеток на *губчатом гибридном материале (ГГМ)* использовали МСК костного мозга человека четвертого пассажа. Для полилактидных микроструктур использовали *МСК, полученные из жировой ткани человека (МСК-Ж)*.

Образцы на основе АХ имплантированы белым крысам линии Vistar под кожу межлопаточной области на 30, 60 и 90 суток. Эксперименты *in vivo* для микроструктур на основе ПЛА проводились на 4-недельных мышах C57/Bl6. Имплантацию микроструктур производили с и без МСК-Ж (контроль) на 5 и 10 недель.

Исследования *in vitro*, *in vivo* выполнены в сотрудничестве с ИТЭБ РАН, Первым МГМУ, НИИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова, ПИМУ. Морфологический анализ образцов после имплантации проведен к.м.н. Курковым А.В. (Первый МГМУ).

## Глава 3. Биополимерные материалы на основе хитозана

### 3.1. Гидродинамический диаметр агрегатов в водных растворах

Установлено, что в разбавленных растворах образцов АХ возникают межмолекулярные взаимодействия липофильного характера. Когда СЗ достигает значительных величин (17–20 и 47–50 мол.%), эти взаимодействия приводят к образованию агрегатов существенно большего размера в сравнении с исходным хитозаном (Рис. 4). О схожих размерах агрегатов хитозана сообщают [1, 2], наблюдая более выраженную агрегацию с увеличением количества гидрофобных заместителей, с ростом СА.

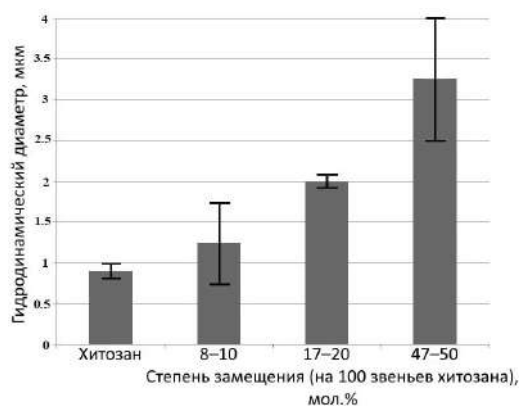


Рис. 4 – Гидродинамический диаметр агрегатов хитозана и АХ (0,02 мас.% в 2%-й уксусной кислоте)

Таким образом, изменяя количество гидрофобных фрагментов, введенных в структуру хитозана, возможно получать полимерные носители необходимого размера.

### 3.2. Механические свойства и РФА плёночных образцов

УФ-облучение и липофильные взаимодействия за счет аллильных фрагментов не вносят весомого вклада в разрывную прочность (Табл.1). Для необлученных пленок АХ относительное удлинение выше на 5–8% по сравнению с исходными хитозановыми пленками. УФ-облучение приводит к снижению относительного удлинения пленок АХ, наиболее выраженному для образцов с высокими СЗ, что вероятно определяется уменьшением подвижности полимерных цепей после фотосшивания. Кроме того, повышение гидрофобности пленки вызывает снижение содержания в ней воды, которая действует как пластификатор.

Табл. 1 – Деформационно-прочностные характеристики хитозановых пленок

	СЗ, мол.%	До УФ-облучения		После УФ-облучения	
		$\sigma$ , МПа	$\epsilon$ , %	$\sigma$ , МПа	$\epsilon$ , %
Хитозан	0	$37 \pm 1$	$18 \pm 2$	$39 \pm 1$	$18 \pm 3$
АХ10*	8–10	$37 \pm 2$	$26 \pm 5$	$41 \pm 1$	$21 \pm 4$
АХ20	17–20	$38 \pm 2$	$25 \pm 3$	$38 \pm 3$	$19 \pm 2$
АХ50	47–50	$33 \pm 3$	$23 \pm 3$	$33 \pm 3$	$17 \pm 2$

\*здесь и далее цифрой перед «АХ» указана степень замещения (мол.%)

По данным РФА (Рис. 5) фотосшивание не приводит к изменению положения пиков. Широкий интенсивный максимум при  $2\theta$  около  $20^\circ$  ( $d_1 = 4,434 \text{ \AA}$ ) согласуется с [3, 4] и определяется наличием в полимере наряду с аморфными также и «псевдокристаллических» областей – кристаллитов, которые представляют собой упорядоченные области полимерных цепей, ориентированных параллельно друг другу. Другой широкий интенсивный максимум при  $2\theta$  около  $10^\circ$  ( $d_2 = 8,835 \text{ \AA}$ ) относится к гидратированной кристаллической структуре хитозана [3].

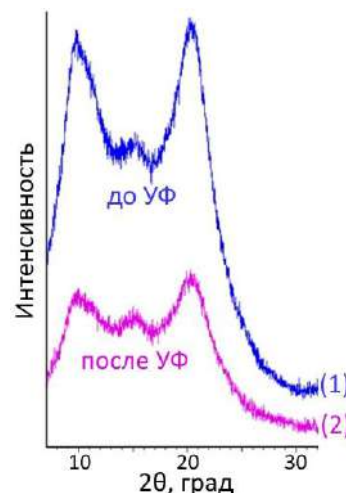


Рис. 5 – РФА пленки АХ10 до (1) и после УФ-облучения (2)

Значения межплоскостного расстояния  $d_2$  и  $d_1$  соотносятся приблизительно как 2:1, что может соответствовать двум периодам отражения между двумя

плоскостями кристаллитов. Т.е. минимальное расстояние между этими плоскостями равняется 4,434 Å. Максимум малой интенсивности при  $2\theta$  около  $15^\circ$  ( $d_3 = 5,899$  Å) может быть обусловлен присутствием кристаллических областей в структуре исходного хитозана [4].

### 3.3. Трехмерные конструкции, сформированные однофотонной лазерной стереолитографией

Установлено, что формирование стабильных при отмывке полимерных конструкций возможно без применения дополнительных сшивающих агентов для производного хитозана с СЗ 47–50% (АХ50). При СЗ 8–10 и 17–20% конструкции сформированы лишь при низких (2–4 мм/с) скоростях сканирования лазерным излучением (скоростях ЛИ), однако, при отмывке они растворялись в течение 1 сут. Показано, что чем меньше скорость ЛИ, тем более четкий контур имеют тестовые структуры (Рис. 6). Добавление ПЭГ-ДА позволило сформировать для каждого производного хитозана стабильные при отмывке структуры. Таким образом, чем выше СЗ и больше количество реакционноспособных групп (С=С связей), тем шире диапазон оптимальных скоростей ЛИ и более устойчива в водных средах формируемая трехмерная конструкция.

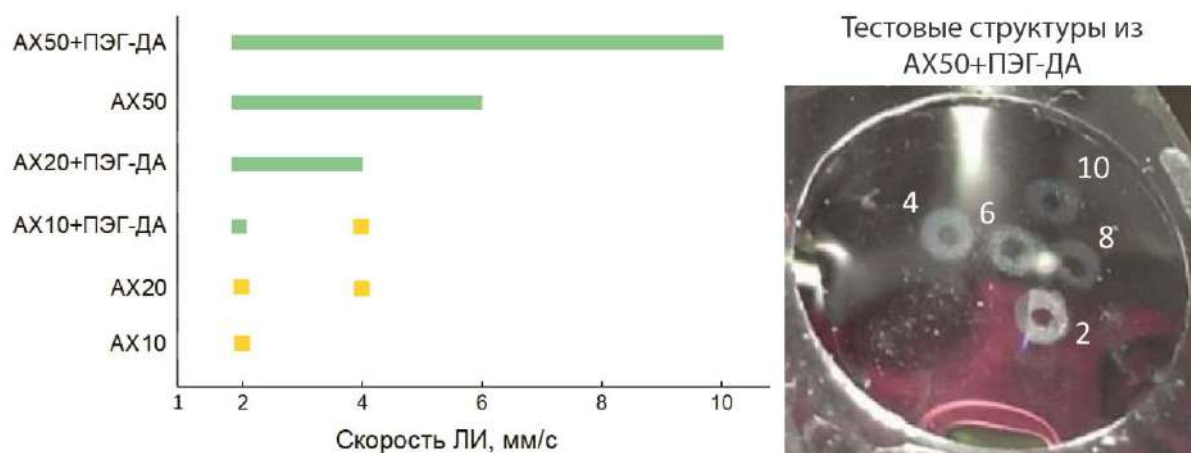


Рис. 6 – Подбор скорости ЛИ для ФПК из АХ. Зеленым обозначены скорости ЛИ, при которых получены стабильные при отмывке структуры; желтым – структуры растворялись в течение 1 сут. ФПК расположены в порядке от «лучшей» (широкий диапазон скоростей ЛИ) к «худшей». На фотографии тестовых структур (справа) числами указаны скорости ЛИ, при которых они получены

Конструкции из смеси АХ с ПЭГ-ДА имеют желтый цвет, после захвата и сжатия хирургическим пинцетом, скручивания в трубку восстанавливают исходную форму (Рис. 7). Разработанные полимерные композиции и подобранные параметры стереолитографии позволяют сформировать трехмерные конструкции для восстановления тканевых дефектов критического размера (от 1 см).



Рис. 7 – Трехмерные конструкции из ФПК на основе АХ10 (а), АХ20 (б), АХ50 (в)

После лиофильного осушения (Рис. 8а) у трехмерных структур сохраняется заданная архитектура, их можно заново регидрировать. Оценка характерной поры из микрофотографий СЭМ (Рис. 8б) показала, что поверхность, занимаемая порами, составляет порядка 30% от общей площади поверхности трехмерной структуры, причем 66% пор имеют

размер 3–6 мкм. Вероятно, на поверхностную пористость повлияло УФ-облучение готовых конструкций, когда происходит сшивание непрореагировавших фоточувствительных фрагментов полимера. При оценке среза трехмерной конструкции (Рис. 8в) установлено, что характерный размер пор составляет 20–60 мкм. Более толстые параллельные друг другу стенки, вероятно, соответствуют местам перекрытия соседних слоев, где при лазерном воздействии формируется более плотно сшитый в сравнении с остальной структурой материал.

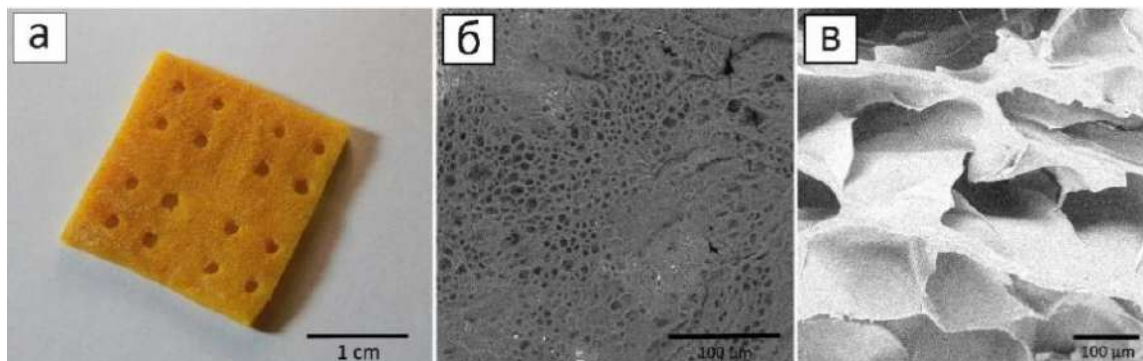


Рис. 8 – Структура на основе AX50 после лиофильного осушения (а), микрофотографии СЭМ ее поверхности (б) и среза (в)

### 3.4. Степень набухания и смачиваемость трехмерных конструкций

Трехмерные конструкции характеризуются *степенью набухания* (swelling ratio, **SWR**) в интервале 490–650%. Максимальные значения SWR получены для образцов, помещенных в ФСБ и воду, также в ФСБ после выдерживания в этаноле (Рис. 9). Для снижения SWR в ФСБ структуры обрабатывали аммиаком для перевода хитозана в основную форму. Отметим, что SWR в воде для трехмерных структур, где хитозан находится в основной форме (Рис. 9, бар «NH<sub>4</sub>OH+H<sub>2</sub>O») оказалась такой же высокой как для хитозана в солевой форме. Вероятно, определяющим в этом случае является ионная сила и pH растворителя.

Перевод хитозана в основную форму приводит к увеличению контактного угла смачивания с 66° до 94°, изменение угла смачивания происходит медленнее примерно в 1,6 раза (Рис. 10). Худшее смачивание поверхности для трехмерной конструкции из хитозана в основной форме можно объяснить отсутствием полярной карбоксильной группы, которая обеспечивает сродство поверхности к воде, а также затрудненным проникновением воды в поры конструкции.

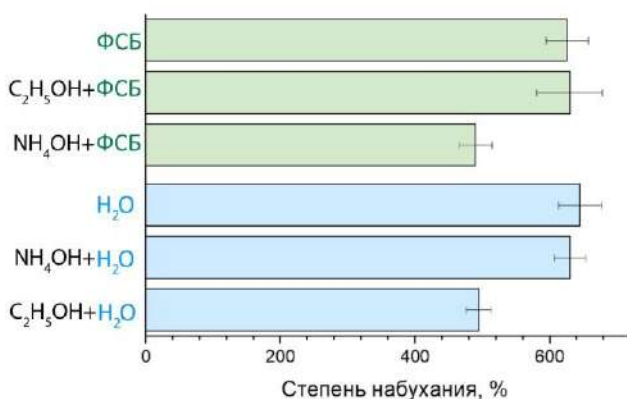


Рис. 9 – Степень набухания структур в фосфатно-солевом буфере (ФСБ, зеленые бары) и воде (голубые бары) без и после предварительной обработки этанолом или аммиаком

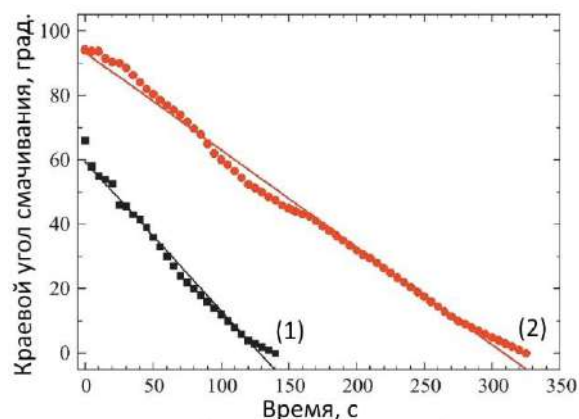


Рис. 10 – Кинетические кривые смачивания конструкций из AX в солевой (1) и основной форме (2)

### 3.5. Конструкции после обработки сверхкритическим диоксидом углерода.

#### Локальный модуль упругости

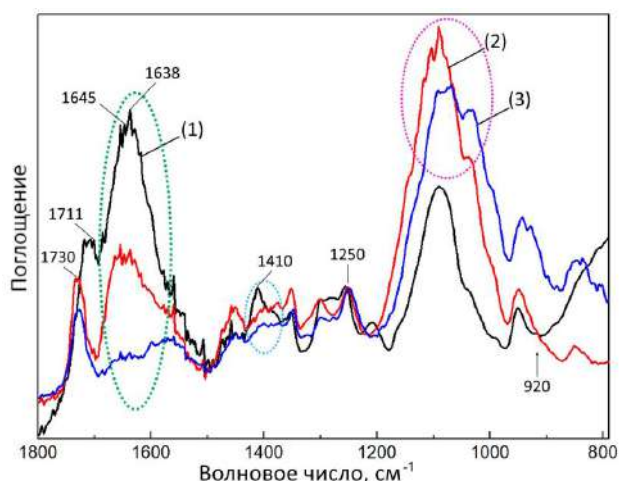


Рис. 11 – ИК-спектры: (1) – ФПК, (2) – необработанная трехмерная структура, (3) – трехмерная структура после  $\text{scCO}_2$

Для трехмерной конструкции после стереолитографии (Рис. 11, спектр (2)) снижается интенсивность полосы с пиками при 1638 и 1645  $\text{cm}^{-1}$  (валентные колебания двойных  $\text{C}=\text{C}$  связей в ПЭГ-ДА и АХ). Вклад в интенсивность полосы вносит также поглощение воды, остаточных ацетамидных групп хитина (1660  $\text{cm}^{-1}$ ), деформационные колебания первичных аминогрупп хитозана (1580–1600  $\text{cm}^{-1}$ ). Помимо этого, уменьшается интенсивность полосы при 1410  $\text{cm}^{-1}$  (колебания  $\text{C}=\text{C}$  связей в ПЭГ-ДА) и наблюдается широкая интенсивная полоса около 1140–1045  $\text{cm}^{-1}$ : область чувствительна к структурным изменениям и,

вероятно, соответствует полосе  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  растяжения для алкилзамещенных эфиров. Увеличение интенсивности и появление острых пиков в этой области демонстрирует усложнение полимерной структуры.

Эти факты указывают, *во-первых*, на конверсию двойных  $\text{C}=\text{C}$  связей в процессе фотосшивания, что подтверждает смещение полосы поглощения карбонильной группы, сопряженной с винилом: полоса с максимумом при 1711  $\text{cm}^{-1}$  в спектре (1) смещается к 1730  $\text{cm}^{-1}$ . Об этом также свидетельствует отсутствие для сшитых конструкций острых пиков в районе 920  $\text{cm}^{-1}$  (внеплоскостные деформационные колебания алкеновых связей). Однако, *во-вторых*, после лазерного воздействия в материале еще сохраняются непрореагировавшие  $\text{C}=\text{C}$  связи.

Обработка в среде  $\text{scCO}_2$  приводит к очистке конструкции от непрореагировавших компонентов, что отображает изменения в спектре (3) (выделенная пунктиром область около 1640  $\text{cm}^{-1}$ , Рис. 11). Проанализировав масс-спектры воды, через которую пропускали  $\text{scCO}_2$  после обработки трехмерных структур, установлено, что из структуры десорбируется ПЭГ-ДА, при этом в промывочных жидкостях для необработанных  $\text{scCO}_2$  структур ПЭГ-ДА не был найден. Таким образом, обработку в среде  $\text{scCO}_2$  можно рассматривать как метод предстерилизационной очистки полимерных материалов от несшитых компонентов, тогда как стандартная процедура отмывки в растворителях не позволяет очистить от них материал.

Локальный модуль упругости трехмерных конструкций увеличивается на 1–2 порядка в зависимости от режима  $\text{scCO}_2$  обработки (Табл. 2). Различие в механических свойствах между боковой стороной и основанием конструкции, скорее всего, связано с ограничением метода лазерной стереолитографии: более плотно сшитая полимерная сеть формируется в направлении лазерного воздействия, чем в плоскости, перпендикулярной оси лазерного луча. Примечательно, что для конструкции, обработанной в проточном режиме, модуль упругости оказался выше, чем для лиофилизированной конструкции ( $252,1 \pm 33,8$  кПа). В итоге, используя  $\text{scCO}_2$  обработку, можно в широких пределах варьировать механические свойства трехмерных структур, состоящих из одного и того же фоточувствительного полимера, причем сохранять гелевую структуру материала, что в дальнейшем может обеспечить благоприятные условия для роста и размножения клеток.

Табл. 2 – Локальный модуль упругости конструкций до и после обработки  $\text{скСО}_2$ 

Поверхность конструкции*	Локальный модуль упругости, кПа		
	Исходная конструкция	Конструкция после $\text{скСО}_2$	
		Статический режим	Проточный режим
Боковая	$3,3 \pm 0,6$	$30,2 \pm 5,7$	$397,2 \pm 79,4$
Основание		$54,9 \pm 10,9$	$604,0 \pm 108,1$

\*компьютерная модель трехмерной конструкции приведена на Рис. 2а

### 3.6. Шероховатость, энергетические свойства поверхности трехмерных конструкций после обработки сверхкритическим диоксидом углерода

После обработки  $\text{скСО}_2$  шероховатость конструкций уменьшается с  $81 \pm 42$  нм до  $20,7 \pm 3,0$  нм. Поверхность полимерного материала остается гидрофильной, однако, контактный угол смачивания становится выше, смачивание происходит с большей скоростью и равновесное значение угла смачивания достигается в среднем за 300 с (против 180 с для необработанной структуры) (Рис. 12).

Кроме того, в результате  $\text{скСО}_2$  обработки уменьшается поверхностная энергия, происходит изменение доминирующей составляющей: преобладает дисперсионная компонента, полярность структуры уменьшается  $\sim$  в 2 раза (Табл. 3). Уменьшение полярности и различие в смачиваемости в результате  $\text{скСО}_2$  обработки могут быть связаны с изменением топографии поверхности и большим количеством полярных групп в случае необработанной конструкции, что должно обеспечивать, согласно уравнению Дюпре-Юнга, более сильное межмолекулярное взаимодействие полимерных молекул с молекулами воды, а в последующем и с культурой клеток.

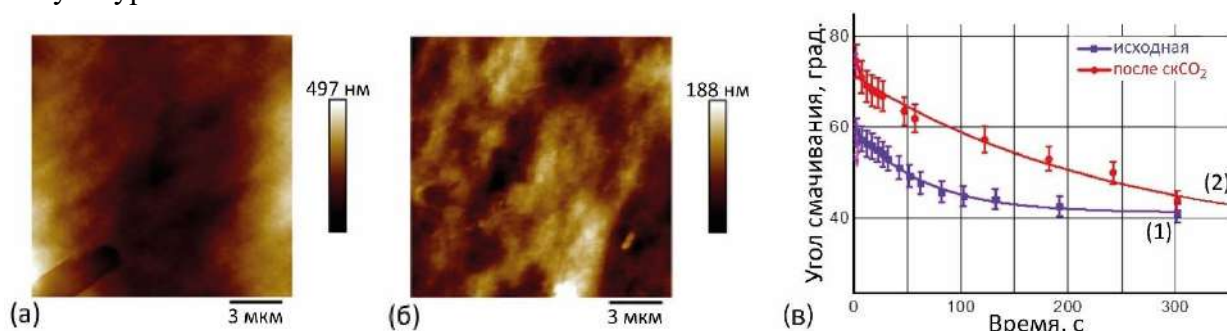


Рис. 12 – Атомно-силовая микроскопия поверхности исходной конструкции (а) и конструкции после обработки  $\text{скСО}_2$  (б); в – Кинетика смачивания водой исходной конструкции (1) и конструкции после обработки  $\text{скСО}_2$  (2)

Табл. 3 – Углы смачивания. Поверхностные энергетические характеристики конструкций

	Угол смачивания, $\theta$ , град. (вода/этиленгликоль)	Поверхностная энергия и ее составляющие, мДж/м <sup>2</sup>			Полярность, $\sigma_s^p / \sigma_s$
		Полярная, $\sigma_s^p$	Дисперсионная, $\sigma_s^d$	Поверхностная энергия, $\sigma_s = \sigma_s^p + \sigma_s^d$	
Исходная структура	$(60 \pm 5)/(48 \pm 6)$	$35 \pm 3$	$7 \pm 1$	$42 \pm 3$	0,8
$\text{скСО}_2$ статич. режим	$(77 \pm 3)/(53 \pm 5)$	$11 \pm 1$	$20 \pm 2$	$32 \pm 3$	0,3
$\text{скСО}_2$ проточ. режим	$(79 \pm 4)/(53 \pm 5)$	$9 \pm 1$	$22 \pm 2$	$24 \pm 2$	0,4

### 3.7. Биосовместимость, имплантация и гистология хитозановых конструкций

Показано отсутствие водорастворимых токсических компонентов в конструкциях, в том числе после  $\text{scCO}_2$  обработки. Оптимальная адгезия МСК человека наблюдалась к образцам из AX10 и AX20, образцы из немодифицированного хитозана клеточную адгезию не поддерживали. При имплантации отсутствовали некротические и островоспалительные изменения тканей; резорбция конструкций начиналась с 60 суток имплантации.

## Глава 4. Губчатые гибридные материалы

### 4.1. Параметры лазерного воздействия. Формирование полилактидных шаблонов

Для получения полилактидных шаблонов на поверхности коллагеновой губки (*губчатого гибридного материала (ГГМ)*) подбирали скорость ЛИ, исходя из формы, размера фотосшитых линий полилактида, их стабильности при отмывке; и расстояние между линиями, регулируя плотность заливки губки линиями (количество линий на миллиметр (лин./мм)).

В случае скорости ЛИ 3 мм/с толщина полученных линий составила  $150 \pm 30$  мкм. В зависимости от плотности заливки расстояние между линиями менялось от 40 до 70 мкм. Для скорости ЛИ 5 мм/с толщина линий равнялась  $100 \pm 21$  мкм, расстояние между соседними линиями: от 70 до 100 мкм (Рис. 13а, б). При плотности заливки 6 лин./мм линии прерывисты, со слабой флуоресценцией, что вероятно обусловлено высокой плотностью мощности излучения, когда возможна деструкция уже фотосшитой линии.

При оценке способности ГГМ регулировать клеточное поведение показано заметное сродство клеток НИН 3Т3 к фотосшитым линиям, сформированным при скорости ЛИ 5 мм/с (Рис. 13в). Для скорости ЛИ 3 мм/с направленное распределение клеток не наблюдалось. В итоге для формирования ГГМ (Рис. 13г) использовали параметры: скорость ЛИ 5 мм/с, плотность заливки 5 лин./мм.

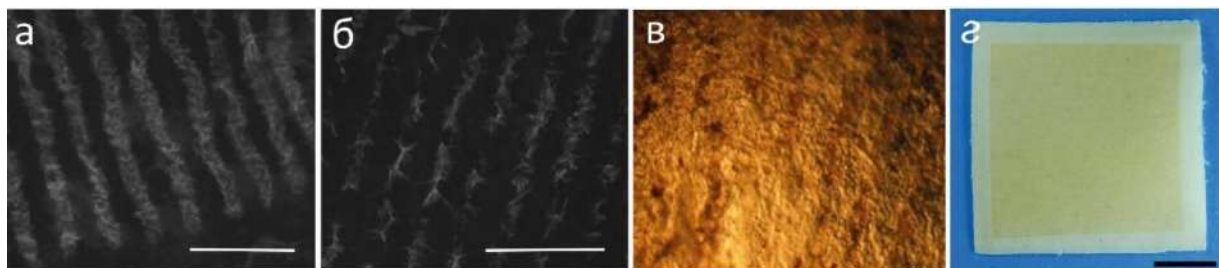


Рис. 13 – Фотосшитые линии (светлые области), полученные при скорости ЛИ 5 мм/с и плотности заливки 5 лин./мм (а), 6 лин./мм (б); бар 500 мкм. в – ГГМ (скорость ЛИ 5 мм/с) через 48 ч культивирования фибробластов НИН 3Т3. г – Макрофотография ГГМ; бар 5 мм

### 4.2. СЭМ и ИК-спектроскопия

В результате нанесения армирующего полилактидного шаблона поверхность, занимаемая порами, сократилась в 2 раза: с 43% до 22% (Рис. 14). При этом после нахождения в течение 2 недель в ФСБ сформированная конструкция сохраняла свою форму и возможность манипуляций, в отличие от исходной коллагеновой губки, которая за это время набухала и распадалась на отдельные волокна. Бóльшая стабильность ГГМ может быть вызвана, во-первых, добавлением фотосшитого полилактидного шаблона, что приводит к образованию композитного материала, проявляющего синергетические механические свойства. Во-вторых, следует учесть способ нанесения ФПК на материал, когда для удаления излишков фотополимера губка прессуется между двумя стеклами. Последнее приводит к образованию более плотной коллагеновой основы конструкции, уменьшение пористости замедляет набухание образца, что, например, используют для получения коллагеновых пластин методом пластического сжатия.



На ИК-спектрах проявляются характерные для коллагена частоты колебаний гидроксильных групп ( $3200\text{--}3700\text{ см}^{-1}$ ) и пептидных связей Амид I, II и III ( $1200\text{--}1700\text{ см}^{-1}$ ) (Рис. 15). Неизменность частоты колебаний Амид I и III, которые наиболее чувствительны к раскручиванию тройной спирали, может указывать на отсутствие трансформаций коллагенового волокна при лазерном нагреве. Сдвиг полосы Амид II в низкочастотную область (с  $1546$  к  $1538\text{ см}^{-1}$ ) вероятно свидетельствует об увеличении доли водородных связей между соседними пептидными цепями после отмывки трехмерной конструкции от несшитой ФПК.

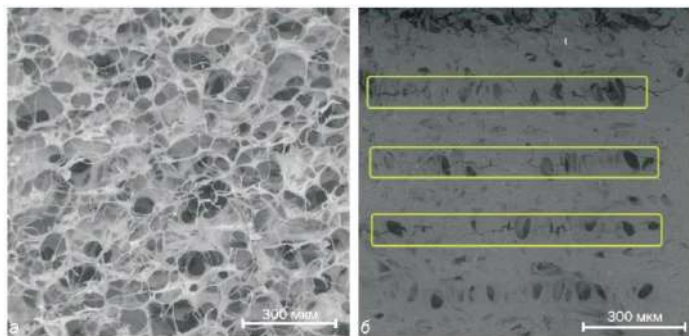


Рис. 14 – СЭМ исходной коллагеновой губки (а) и ГГМ после лазерного структурирования (б). Дополнительно выделены линии полилактидного шаблона

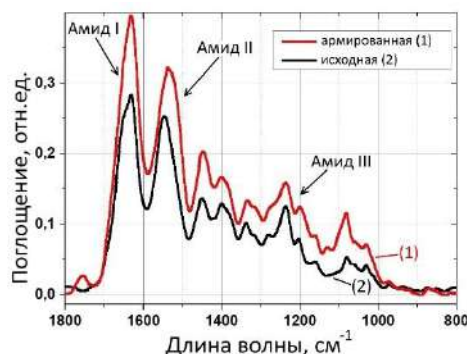


Рис. 15 – ИК-спектры армированной (1) и исходной (2) коллагеновой конструкции

### 4.3. Механические свойства коллагеновых материалов

Испытания на растяжение исходной коллагеновой губки и образцов после УФ-облучения показали рост модуля упругости примерно в 2 раза (Табл. 4). Увеличение времени облучения не привело к резкому росту модуля упругости: вероятно, поперечно-сшитая сеть, сформированная на поверхности материала, уменьшает глубину проникновения УФ-излучения. Как и ожидалось, после облучения образцы демонстрировали меньшее относительное удлинение в сравнении с исходной коллагеновой губкой.

Табл. 4 – Механические свойства коллагеновых губок до и после облучения

	$\sigma$ , МПа	$\varepsilon$ , %
Исходная губка	$3,2 \pm 0,2$	$6 \pm 1$
Коллагеновая губка после 15 мин облучения	$5,7 \pm 0,3$	$5 \pm 2$
Коллагеновая губка после 30 мин облучения	$6,1 \pm 0,3$	$3 \pm 1$

В результате лазерного воздействия среднее значение локального модуля упругости для коллагенового материала возросло примерно в 7 раз в сравнении с необработанными образцами (Рис. 16): с  $77,6 \pm 55,3$  кПа до  $520,8 \pm 201,2$  кПа (модуль упругости полилактидной линии).

Периодичность появления высоких (относительно необработанного коллагена) значений локального модуля упругости сопоставима с размерами нанесенного шаблона, при этом отчетливо наблюдается лишь одна из полилактидных линий, тогда как остальные линии не прослеживаются столь же явно (Рис. 16б). Это может быть обусловлено особенностями фотосшивания коллагенового образца: в областях губки, не совпадающих с плоскостью перетяжки лазерного пучка, фотосшивание не происходит, либо формируются линии из редкосшитого полилактида, которые могут вымываться во время отмывки и стерилизации ГГМ.

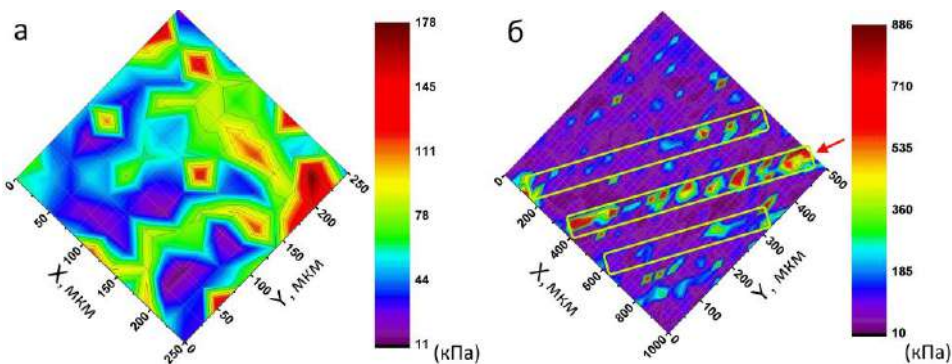


Рис. 16 – Поверхностное распределение локального модуля упругости для исходной (а) и армированной (б) коллагеновой губки. На (б) дополнительно выделены линии полилактидного шаблона

#### 4.4. Биосовместимость губчатых гибридных материалов, направленная клеточная пролиферация

Установлено, что добавление полилактидного армирующего шаблона не увеличивает цитотоксичность коллагеновых губок. ГМ обеспечивает адгезию и направленную пролиферацию МСК костного мозга человека.

### Глава 5. Пленочные гибридные материалы

#### 5.1. Фотохимическое сшивание коллагена

УФ-облучение в присутствии ФМН увеличило локальный модуль упругости коллагена примерно в 2,6 раза: за 20 минут облучения модуль упругости возрос с  $64,5 \pm 14,1$  кПа (необлученный коллаген) до  $156,8 \pm 40,4$  кПа (Рис. 17а). За это время образцы получают дозу около  $4,7$  Дж/см<sup>2</sup>, что для подобранной концентрации ФМН (0,26 мМ) достаточно для получения фотосшитых гидрогелей [5]. Обнаружено, что распределение значений локального модуля упругости по поверхности фотосшитых коллагеновых пленок является однородным (Рис. 17б). В последующих экспериментах облучение образцов производили в течение 30 мин.

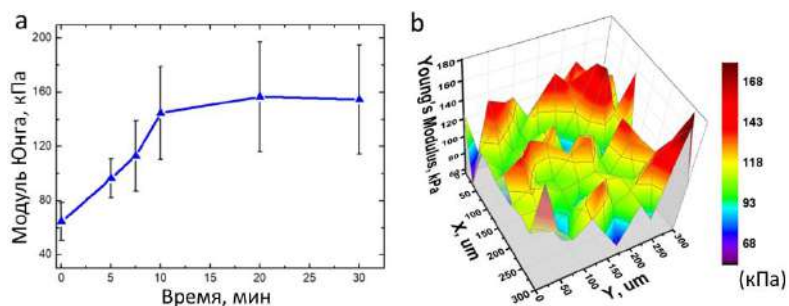


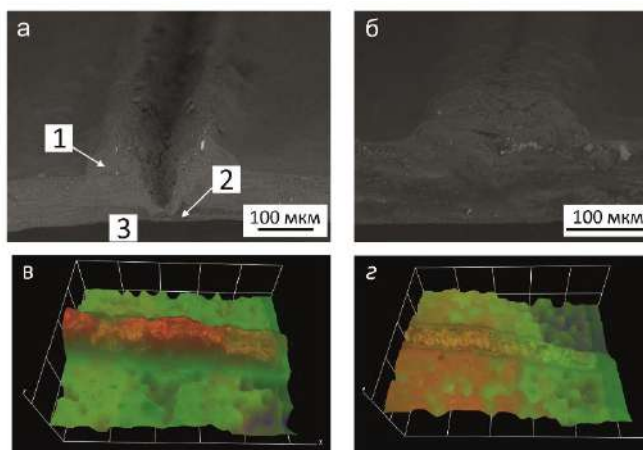
Рис. 17 – а) Изменение локального модуля упругости коллагеновых пленок в зависимости от времени УФ-облучения; б) Пример распределения локального модуля упругости по поверхности пленки, облученной в течение 7,5 мин

#### 5.2. Параметры лазерного воздействия. Формирование армирующих шаблонов

На Рис. 18а для минимальной скорости ЛИ 1 мм/с различимо углубление и трещина в структурированной линии ПЛА. Углубление наблюдается также для 2 мм/с (Рис. 18б), при скорости ЛИ более 3 мм/с исчезает (Рис. 18в, г). Появление трещин и деструкция линий ПЛА вероятно связаны с длительностью лазерного воздействия, когда возможна абляция сшитого полимера. Среди других причин усадки и образования микротрещин в полимерных образцах: накопление термомеханических напряжений и изменение конформации макромолекул, образование газообразных продуктов при разрыве углеродных и кислородных связей.

С увеличением скорости ЛИ до 10–20 мм/с фотоотвержденная линия становится менее равномерной по высоте. Менее интенсивное лазерное воздействие приводит к образованию

Рис. 18 – СЭМ полилактидных линий при скорости ЛИ 1 мм/с (а) и 2 мм/с (б). На (а) обозначены: 1 – линия отвержденного ПЛА; 2 – коллагеновая пленка; 3 – подложка. Внешний вид полилактидных линий при скорости ЛИ 4 мм/с (в) и 10 мм/с (г). Масштаб клетки по ХУ 150 мкм, по Z 50 мкм



более рыхлых редкосшитых полимерных сеток. Их образование будет происходить в основном за счет «быстрой» стадии полимеризации, когда преобладает диффузия и рост «малых» подвижных радикалов. При отмывке сформированных структур молекулы растворителя могут разрушать редкосшитые участки полилактидных линий (Рис. 19): ширина сформированных линий после отмывки от несшитой ФПК уменьшается примерно в 2 раза для скоростей ЛИ 10–20 мм/с. Минимальное вымывание фотосшитых линий наблюдается для скоростей ЛИ 1–5 мм/с.

В дальнейших экспериментах использовали скорости ЛИ 15 мм/с и 3 мм/с. На материале после лазерного структурирования (Рис. 20а) различимы фотосшитые линии из ПЛА: области, подвергшиеся воздействию лазера, непрозрачны. После фотоотверждения образец теряет пластичность, свойственную исходной коллагеновой пленке, при этом после отмывки манипуляционные свойства ПГМ близки к свойствам исходного материала (Рис. 20б).

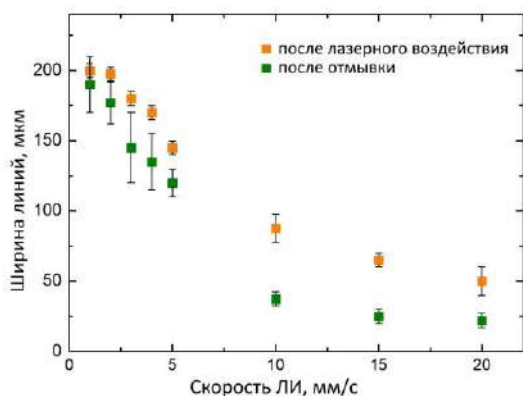


Рис. 19 – Ширина полилактидных линий после лазерного воздействия и после отмывки от несшитой ФПК в зависимости от скорости ЛИ

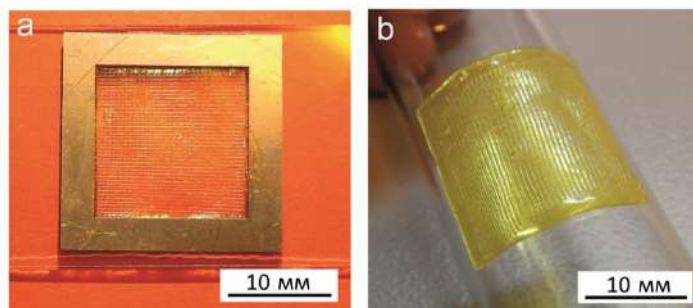


Рис. 20 – Макрофотографии ПГМ, полученных при скорости ЛИ 3 мм/с: а – шаблон в виде сетки после лазерного структурирования; б – шаблон в виде полосок после отмывки

Светлые области на ИК-картах ПГМ (Рис. 21) показывают, где присутствует коллагеновый материал, следовательно, темные – где коллаген покрыт фотосшитым ПЛА. Для полосатого шаблона наблюдается хорошая отмывка от фоточувствительного материала, для сетчатых шаблонов, напротив, показано, что отмывка не позволяет полностью удалить несшитую ФПК.

### 5.3. ИК-спектроскопия

ИК-спектр (1) фотосшитого ПЛА (Рис. 22) имеет типичные для цепей лактида полосы поглощения:  $1746\text{ см}^{-1}$  – валентные колебания карбонильной группы  $\text{C}=\text{O}$ ,  $1456$  и  $1385\text{ см}^{-1}$  – деформационные колебания  $\text{CH}_3$ -групп,  $1185\text{ см}^{-1}$  – полоса асимметричного растяжения

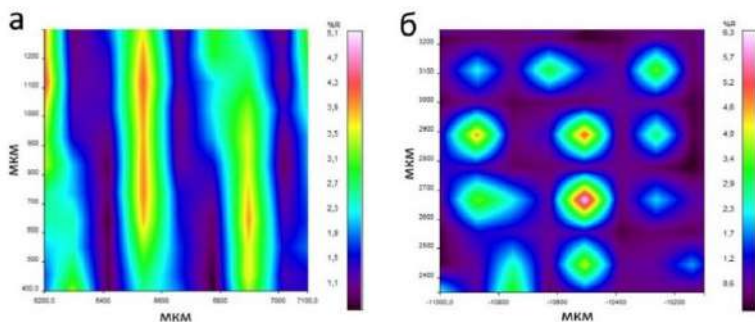


Рис. 21 – ИК-карты ПГМ (скорость ЛИ 3 мм/с), перестроенные по длине волны  $1547\text{ см}^{-1}$  (Амид II). Шаблон в виде полосок (а) и в виде сетки (б)

$\text{C-O-C}$ ,  $1083\text{ см}^{-1}$  – симметричное растяжение  $\text{CH}_3$ ,  $1045\text{ см}^{-1}$  – растяжение  $\text{C-CH}_3$ . Спектры (2), (3), (4) получены с характерными для коллагена полосами пептидных связей: Амид I при  $1630\text{ см}^{-1}$ , Амид II при  $1547\text{ см}^{-1}$  и триплета из более слабых полос Амид III с максимумом при  $1236\text{ см}^{-1}$ .

В спектрах (3) и (4) частота колебаний Амид I увеличивается до  $1633\text{ см}^{-1}$ . Это могло бы указывать на денатурацию коллагена после облучения и лазерного воздействия, однако не происходит изменение интенсивности полосы Амид I и остаются неизменными частоты Амид III, которые также чувствительны к денатурации и конформационным переходам молекул коллагена. Следовательно, сдвиг полосы Амид I, скорее всего, происходит в результате

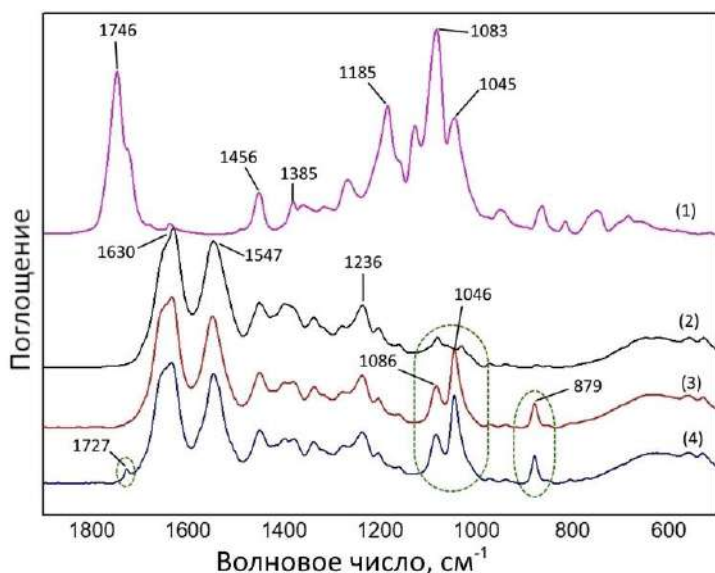


Рис. 22 – ИК-спектры: 1– фотосшитый ПЛА; 2 – исходная коллагеновая пленка; 3 – фотосшитая коллагеновая пленка; 4 – армирующий шаблон на коллагене

увеличения количества водородных связей при гидратации макромолекул коллагена. В спектрах (3) и (4) присутствуют пики при  $1086$ ,  $1046$  и  $879\text{ см}^{-1}$ , которые не наблюдаются в исходной коллагеновой пленке. Отметим также, что у шаблона на коллагене пик при частоте  $1046\text{ см}^{-1}$  обладает большей интенсивностью в сравнении с облученной пленкой, что может быть связано с добавлением в систему ПЛА. С ним также связываем появление пика при  $1727\text{ см}^{-1}$  от карбонильных групп. Изменения при  $1086$  и  $879\text{ см}^{-1}$ , наблюдаемые после облучения коллагена (спектры (3), (4)), вероятно относятся к колебаниям эфирной и эпоксигрупп.

#### 5.4. Топография и свойства поверхности пленочного гибридного материала

На микрофотографиях (Рис. 23а, с) более яркие области наблюдаются в местах, где произошло фотосшивание ПЛА: шаблоны обладают интенсивной флуоресценцией с максимумом при  $520\text{ нм}$  при длине возбуждения  $410\text{ нм}$  (Рис. 24). Коллагеновые образцы после УФ-облучения флуоресценцией не обладали. Неоднородность и зернистость сформированных полилактидных шаблонов сохраняются после отмывки ПГМ (Рис. 23b, d), что может быть обусловлено не только образованием пузырей при высокой интенсивности лазерного воздействия, но и также разрушением редкосшитых участков шаблона при его отмывке.

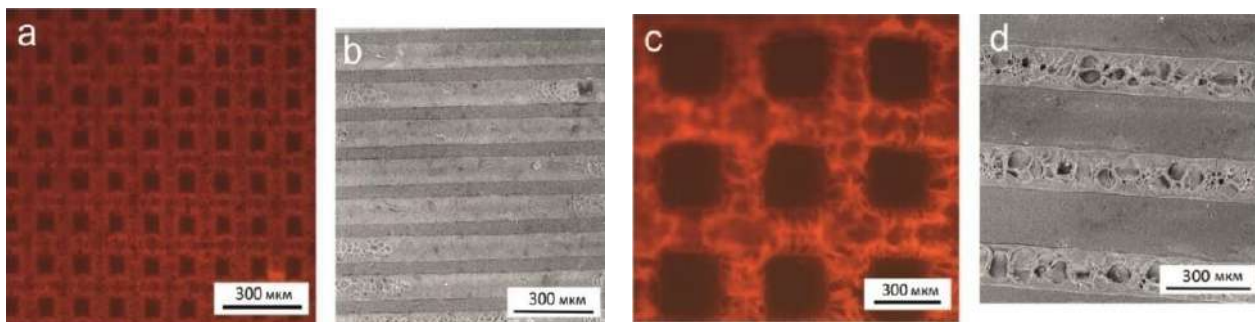


Рис. 23 – Микрофотографии и СЭМ полилактидных шаблонов, сформированных при скорости ЛИ 15 мм/с (а, b) и 3 мм/с (с, d)

Размеры шаблонов приведены в Табл. 5. Ширина фотоотвержденных линий зависит от плотности энергии лазерного излучения, распределение интенсивности которого хорошо аппроксимируется функцией Гаусса. При малых скоростях ЛИ сечение фотоотверждаемой области больше, так как сказывается более интенсивное лазерное воздействие, вызывающее сшивание ФПК.

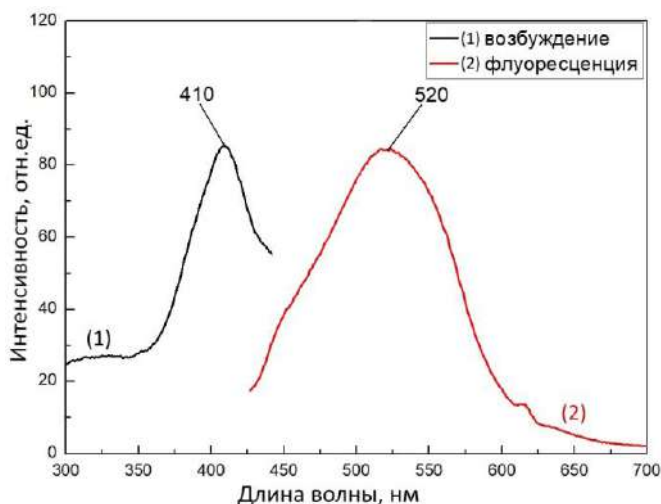


Рис. 24 – Спектры возбуждения (1) и флуоресценции (2) полилактидных шаблонов

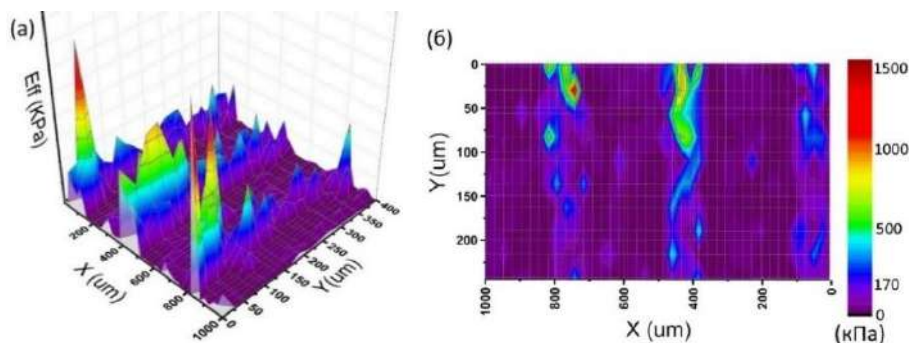
Табл. 5 – Размеры армирующих шаблонов, исходя из данных 3D-микроскопа

Скорость ЛИ, мм/с	Ширина линии, мкм	Расстояние между линиями, мкм
3	$97 \pm 23$	$175 \pm 23$
15	$23 \pm 12$	$70 \pm 12$

### 5.5. Механические свойства пленочного гибридного материала

Средний локальный модуль упругости для армирующего шаблона равен  $580,2 \pm 142,1$  кПа (Рис. 25): области с фотоотвержденным ПЛА по механическим характеристикам практически в 4 раза превосходят неармированный коллагеновый образец. Схожее значение модуля упругости получено для шаблона на коллагеновой губке ( $520,8 \pm 201,2$  кПа), следовательно, механические свойства армирующих линий главным образом определяются составом ФПК, а не материалом подложки.

Рис. 25 – Распределение значений локального модуля упругости для ПГМ: 3D-график (а); фрагмент вида сверху (б)



Модуль упругости для ПГМ на 1–2 порядка превосходит фотосшитый коллагеновый образец (Табл. 6). Для скорости ЛИ 15 мм/с модуль упругости ПГМ не зависит от

геометрической конфигурации шаблона. Для скорости ЛИ 3 мм/с, напротив, модуль упругости увеличивается в 6 раз при сравнении «сетчатых» и «полосатых» образцов, что, вероятнее всего, определяется влиянием термомеханических напряжений, образующихся в фотосшитом полимере при длительном воздействии лазера. Чем больше площадь материала, подвергшаяся воздействию лазера, тем больше должно быть микротрещин в структуре образца. Из результатов расчета (использовали данные Табл. 5) следует, что при этой скорости ЛИ для «сетчатой» конфигурации шаблона примерно 63% площади поверхности материала занимает фотосшитый ПЛА, для «полосатой» конфигурации – около 39% площади поверхности.

Удлинение при разрыве материалов также зависит от параметров лазерного воздействия, для скорости ЛИ 3 мм/с зависит и от конфигурации шаблона (Табл. 6), что, вероятно, объясняется участием в процессе полимеризации больших недиффузионных радикалов, когда образуется больше связей с участием длинных полимерных цепочек. ПЛА в ПГМ выполняет роль своеобразного пластификатора, когда увеличение длины углеродной цепи пластификатора приводит к значительному росту относительного удлинения.

Табл. 6 – Результаты механических испытаний коллагеновых материалов

	Конфигурация шаблона	$\sigma$ , МПа	$\varepsilon$ , %
Фотосшитая коллагеновая пленка	нет	$0,15 \pm 0,02$	$23 \pm 3$
ПГМ, скорость ЛИ 15 мм/с	«сетка»	$49,5 \pm 6,4$	$17 \pm 2$
	«полоска»	$51,2 \pm 5,6$	$16 \pm 2$
ПГМ, скорость ЛИ 3 мм/с	«сетка»	$2,1 \pm 0,2$	$55 \pm 6$
	«полоска»	$13,5 \pm 1,5$	$33 \pm 4$

### 5.6. Биосовместимость пленочного гибридного материала, адгезия и направленная пролиферация фибробластов

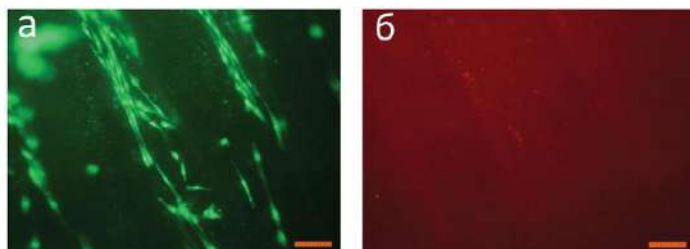


Рис. 26 – Оценка цитотоксичности ПГМ: визуализация живых (а) и мертвых (б) фибробластов НИИ ЗТЗ. Масштаб 100 мкм

Показана высокая адгезия ПГМ в отношении первичных мышечных фибробластов и их направленная пролиферация (Рис. 26). Для коллагеновых образцов без армирующего шаблона селективная адгезия к поверхности не наблюдалась.

### Глава 6. Микроструктурирование фоточувствительных материалов

Для каждой ФПК на основе производных хитозана с помощью массива элементов (Рис. 27а, 28) подобраны параметры формирования трехмерных микроструктур методом двухфотонной полимеризации (**2ФП**). Изменение параметров структурирования **Z-slice** и **XU-hatch**, т.е. расстояния, на которое смещается лазерный луч в вертикальной Z-плоскости и в горизонтальной XU-плоскости, соответственно, позволило контролировать такие свойства трехмерных структур (Рис. 27б, 29) как плотность сшивки (следовательно, набухание), топографию поверхности и производительность их формирования.

Отметим, что в отличие от **Хитозан\_350** (ММ 350 кДа, СА 0,14), ФПК на основе немодифицированного хитозана с более низкими значениями ММ 80 кДа и СА 0,11 не могла обеспечить достаточную реакционную способность при лазерном воздействии, даже для получения непрерывной фотосшитой линии.

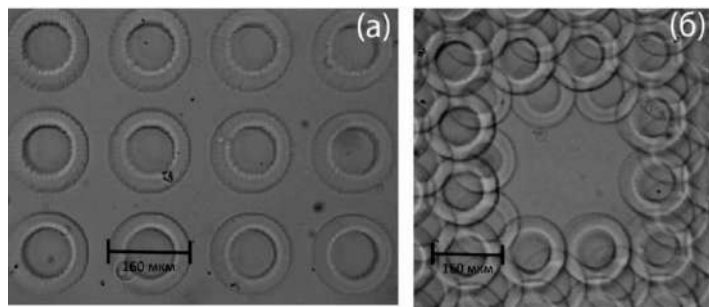


Рис. 27 – Массив структурных элементов для подбора параметров (а) и трехмерная структура после двухфотонной полимеризации ФПК на основе АХ (б). На (а) по оси абсцисс изменяется параметр Z-slice (от 9 до 4 мкм слева направо), по оси ординат – параметр XY-hatch (от 4 до 9 мкм снизу вверх). Бары 160 мкм

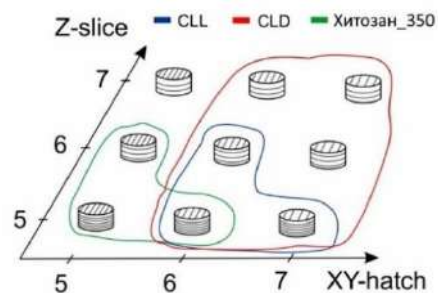


Рис. 28 – Оптимальные параметры двухфотонной полимеризации для ФПК на основе сополимеров ХЛ: CLL – сополимер хитозана с олиго(L,L-лактидом), CLD – сополимер хитозана с олиго(L,D-лактидом). Хитозан\_350 – хитозан с ММ 350 кДа

Использование сополимера хитозана с олиго(L,L-лактидом) (CLL) позволило сформировать структуры (Рис. 29а), которые, однако, показали довольно низкую воспроизводимости компьютерной модели (не пропечатывались поры) и плохие механические свойства при отмывке от несшитой ФПК (структуры растворялась в течение 2-х суток). Наиболее удачной с точки зрения подбора параметров структурирования и стабильности микроструктур после отмывки оказалась ФПК на основе сополимера хитозана с олиго(L,D-лактидом) (CLD), что позволило сформировать трехмерные структуры при XY-hatch 6–7 мкм во всем диапазоне Z-slice (Рис. 28, 29в).



Рис. 29 – (а): Микроструктура на основе CLL (Z-Slice 5, XY-hatch 7); бар 120 мкм. Пример компьютерной модели (б) и микроструктуры (в) из ФПК на основе CLD

Механизм сшивки хитозана и его сополимеров с олиго/полилактидами при методе 2ФП может протекать через различные каналы реакции. Предполагается, что ПЭГ-ДА главным образом выполняет роль подвижных проставок между цепями хитозана, поскольку его концентрация в ФПК является недостаточной для достижения монолитной структуры [6].

Самый высокий модуль упругости получен для трехмерных структур на основе CLD ( $978 \pm 176$  Па), что может быть вызвано более высокой плотностью сшивания из-за наилучшего ответа на лазерное воздействие. Модуль упругости для структур на основе CLL и Хитозан\_350 был ниже ( $411 \pm 74$  Па и  $518 \pm 93$  Па, соответственно), а распределение модуля упругости по поверхности структур оказалось более узким.

Тесты *in vitro* показали хорошую совместимость трехмерных структур на основе производных хитозана с первичной культурой гиппокампа и формирование на их поверхности морфологически полноценной нейронной сети, следовательно, подобные трехмерные микроструктуры могут быть использованы при нейротрансплантации.

Для ФПК на основе разветвленного ПЛА также сформированы трехмерные микроструктуры (Рис. 30). Установлено, что локальный модуль упругости и микротвердость

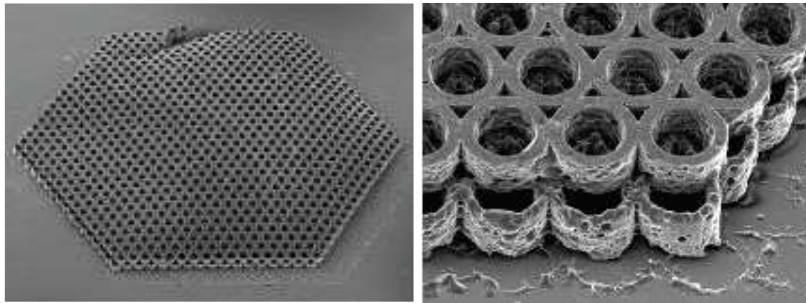


Рис. 30 – СЭМ трехмерной микроструктуры на основе разветвленного полилактида

микроструктур составляют 4,11 ГПа (среднеквадратичное отклонение 14%) и 0,36 ГПа (среднеквадратичное отклонение 9%), соответственно.

Трехмерные микроструктуры на основе разветвленного ПЛА поддерживали остеогенную дифференцировку *in vitro* для МСК-Ж и образование кости *in vivo* при имплантации в искусственно созданные дефекты черепа мышей. Использование подобных микроструктур интересно с точки зрения замещения костных дефектов и инициирования спонтанной остеогенной дифференцировки (если используются стволовые клетки), где требуется структура с высокой прочностью на разрыв, близкой к нижнему пределу модуля упругости кортикальной кости.

### ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Показано, что рост СЗ хитозана аллильными фрагментами приводит к увеличению размера формирующихся агрегатов и к уменьшению относительного удлинения фотосшитых пленочных образцов, что связано с усилением гидрофобных взаимодействий и образованием поперечных сшивок. Таким образом, изменяя количество введенных в структуру хитозана гидрофобных фрагментов, возможно формировать полимерные носители требуемых размеров, а, применяя УФ-облучение – хитозановые конструкции с необходимыми механическими свойствами.
2. Установлено, что чем выше СЗ хитозана, тем шире диапазон оптимальных скоростей ЛИ и более устойчива в водной среде формируемая полимерная структура. Методом лазерной стереолитографии сформированы трехмерные конструкции без применения дополнительных сшивающих агентов для производных хитозана с СЗ 47–50%; в остальных случаях в ФПК необходимо вводить ПЭГ-ДА. МСК человека прикреплялись, распластывались и пролиферировали на поверхности полимерных конструкций, причем образцы из немодифицированного хитозана клеточную адгезию не поддерживали. Некротические или островоспалительные изменения тканей при имплантации полимерных конструкций не обнаружены, вероятно, благодаря введению аллильных групп в структуру хитозана, что привело к повышению основных свойств его молекулы.
3. Установлено, что, в отличие от отмывки в химических растворителях, при обработке трехмерных конструкций в среде  $\text{scCO}_2$  происходит десорбция несвязанной воды и несшитых компонентов ФПК (ПЭГ-ДА). В зависимости от режима пост-обработки возможно до 2-х порядков увеличить локальный модуль упругости полимерных конструкций, что выше, чем при лиофильном осушении. После обработки в среде  $\text{scCO}_2$  уменьшается средняя шероховатость, растет контактный угол смачивания, снижаются поверхностная энергия и полярность конструкций, отсутствует цитотоксическое действие на фибробласты НИИ ЗТЗ.
4. Определены условия фотохимического сшивания коллагена и параметры лазерного структурирования фоточувствительного ПЛА, при которых формируются губчатые и пленочные гибридные материалы (ГГМ и ПГМ, соответственно), способные регулировать клеточное поведение. Гибридные материалы обладали интенсивной флуоресценцией (максимум при 520 нм), что в дальнейшем позволит исследовать их биodeградацию *in vivo* без



необходимости разрабатывать сложные гистологические процедуры и жертвовать экспериментальными животными.

5. Установлено отсутствие трансформаций коллагенового волокна при лазерном нагреве и показано, что локальный модуль упругости для армирующего шаблона на ПГМ в 4 раза выше, чем для неармированного коллагена. Для скорости ЛИ 15 мм/с механические свойства ПГМ не зависят от геометрической конфигурации шаблона. Для скорости ЛИ 3 мм/с, напротив, установлено, что модуль упругости увеличивается в 6 раз для «полосатых» шаблонов в сравнении с «сетчатыми», что, вероятно, обусловлено влиянием термомеханических напряжений, которые образуются с фотосшитом полимера при длительном воздействии лазера.

6. Для сополимеров хитозана с олиго(L,L-/D,L-лактидом) показано, что стереохимический состав привитых цепей влияет на оптимальные параметры структурирования методом 2ФП и механические свойства трехмерных микроструктур: ФПК, основанная на сополимере с олиго(L,D-лактидом) демонстрировала более широкое окно параметров, микроструктуры характеризовались большим модулем упругости в сравнении с сополимером с олиго(L,L-лактидом)). Показана хорошая совместимость микроструктур на основе производных хитозана с первичной культурой гиппокампа, что делает перспективным их использование для нейротрансплантации. Сформированы полилактидные микроструктуры с модулем упругости 4,11 ГПа, которые способствовали остеогенной дифференцировке мезенхимальных стволовых клеток, поддерживали образование кости *in vivo* при имплантации в дефекты черепа мышей.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schatz C. Static light scattering studies on chitosan solutions: from macromolecular chains to colloidal dispersions / Schatz C., Pichot C., Delair T., Viton C., Domard A. // *Langmuir* – 2003. – Т. 19 – № 23 – С.9896–9903.
2. Popa-Nita S. Continuum of structural organization from chitosan solutions to derived physical forms / Popa-Nita S., Alcouffe P., Rochas C., David L., Domard A. // *Biomacromolecules* – 2010. – Т. 11 – № 1 – С.6–12.
3. Souza B.W.S. Influence of electric fields on the structure of chitosan edible coatings / Souza B.W.S., Cerqueira M.A., Martins J.T., Casariego A., Teixeira J.A., Vicente A.A. // *Food Hydrocolloids* – 2010. – Т. 24 – № 4 – С.330–335.
4. Rotta J. Determination of structural and mechanical properties, diffractometry, and thermal analysis of chitosan and hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol / Rotta J., Minatti E., Barreto P.L.M. // *Ciência e Tecnologia de Alimentos* – 2011. – Т. 31 – № 2 – С.450–455.
5. Tirella A. Riboflavin and collagen: New crosslinking methods to tailor the stiffness of hydrogels / Tirella A., Liberto T., Ahluwalia A. // *Materials Letters* – 2012. – Т. 74 – С.58–61.
6. Savelyev A.G. Flavin mononucleotide photoinitiated cross-linking of hydrogels: Polymer concentration threshold of strengthening / Savelyev A.G., Bardakova K.N., Khaydukov E. V., Generalova A.N., Popov V.K., Chichkov B.N., Semchishen V.A. // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* – 2017. – Т. 341 – С.108–114.

#### СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Bardakova K.N.** Tailoring the collagen film structural properties via direct laser crosslinking of star-shaped polylactide for robust scaffold formation / Bardakova K.N., Grebenik E.A., Minaev N. V, Churbanov S.N., Moldagazyeva Z., Krupinov G.E., Kostjuk S. V, Timashev P.S. // *Materials Science and Engineering: C* – 2020. – Т. 107 – С.110300.
2. **Bardakova K.N.** From aggregates to porous three-dimensional scaffolds through a mechanochemical approach to design photosensitive chitosan derivatives / Bardakova K.N., Akopova T.A., Kurkov A. V., Goncharuk G.P., Butnaru D. V., Burdukovskii V.F., Antoshin A.A., Farion I.A., Zharikova T.M., Shekhter A.B., Yusupov V.I., Timashev P.S., Rochev Y.A. // *Marine Drugs* – 2019.

– Т. 17 – № 48 – С.1–18.

3. Akopova T.A. Solvent-free synthesis and characterization of allyl chitosan derivatives / Akopova T.A., Demina T.S., Cherkaev G. V., Khavpachev M.A., **Bardakova K.N.**, Grachev A. V., Vladimirov L. V., Zelenetskii A.N., Timashev P.S. // RSC Advances – 2019. – Т. 9 – № 36 – С.20968–20975.

4. **Bardakova K.N.** Reinforced Hybrid Collagen Sponges for Tissue Engineering / Bardakova K.N., Grebenik E.A., Istranova E.V., Istranov L.P., Gerasimov Y.V., Grosheva A.G., Zharikova T.M., Minaev N.V., Shavkuta B.S., Dudova D.S., Kostyuk S.V., Vorob'eva N.N., Bagratashvili V.N., Timashev P.S., Chailakhyan R.K. // Bulletin of Experimental Biology and Medicine – 2018. – Т. 165 – № 1 – С.142–147.

5. Lazhko A.E. Supercritical Fluid Treatment of Three-Dimensional Hydrogel Matrices Obtained from Allylchitosan by Laser Stereolithography / Lazhko A.E., **Bardakova K.N.**, Shavkuta B.S., Churbanov S.N., Markov M.A., Akopova T.A., Parenago O.O., Grigoryev A.M., Timashev P.S., Lunin V. V., Bagratashvili V.N. // Russian Journal of Physical Chemistry B – 2018. – Т. 12 – № 7 – С.1144–1151.

6. Demina T.S. Two-photon-induced microstereolithography of chitosan-g-oligolactides as a function of their stereochemical composition / Demina T.S., **Bardakova K.N.**, Minaev N.V., Svidchenko E.A., Istomin A.V., Goncharuk G.P., Vladimirov L.V., Grachev A.V., Zelenetskii A.N., Timashev P.S., Akopova T.A. // Polymers – 2017. – Т. 9 – № 7 – С.302.

7. Timashev P.S. Supercritical fluid treatment of three-dimensional hydrogel matrices, composed of chitosan derivatives / Timashev P.S., **Bardakova K.N.**, Churbanov S.N., Krotova L.I., Grigoriev A.M., Novikov M.M., Lakeev S.G., Sevastianov V.I., Bagratashvili V.N. // Vestnik Transplantologii i Iskusstvennykh Organov – 2016. – Т. 18 – № 3 – С.85–93.

8. Timashev P. Novel biodegradable star-shaped polylactide scaffolds for bone regeneration fabricated by two-photon polymerization / Timashev P., Kuznetsova D., Koroleva A., Prodanets N., Deiwick A., Piskun Y., **Bardakova K.**, Dzhoiyashvili N., Kostjuk S., Zagaynova E., Rochev Y., Chichkov B., Bagratashvili V. // Nanomedicine – 2016. – Т. 11 – № 9 – С.1041–1053.

9. Timashev P.S. Fabrication of microstructured materials based on chitosan and its derivatives using two-photon polymerization / Timashev P.S., Demina T.S., Minaev N. V, **Bardakova K.N.**, Koroleva A. V, Kufelt O.A., Chichkov B.N., Panchenko V.Y., Akopova T.A., Bagratashvili V.N. // High energy chemistry – 2015. – Т. 49 – № 4 – С.300–303.

10. Timashev P.S. Novel biocompatible material based on solid-state modified chitosan for laser stereolithography / Timashev P.S., **Bardakova K.N.**, Demina T.S., Pudovkina G.I., Novikov M.M., Markov M.A., Asyutin D.S., Pimenova L.F., Svidchenko E.A., Ermakov A.M. // Современные технологии в медицине – 2015. – Т. 7 – № 3 (eng) – С.20–29.

11. Akopova T.A. Solid-state synthesis of unsaturated chitosan derivatives to design 3D structures through two-photon-induced polymerization / Akopova T.A., Timashev P.S., Demina T.S., **Bardakova K.N.**, Minaev N. V, Burdukovskii V.F., Cherkaev G. V, Vladimirov L. V, Istomin A. V, Svidchenko E.A. // Mendeleev Communications – 2015. – Т. 4 – № 25 – С.280–282.

12. Пат. 2660588 Российская Федерация, МПК А61L 15/10 (2006.01). Способ упрочнения гидрогелей / Лажко А.Э., **Бардакова К.Н.**, Шавкута Б.С., Паренаго О.О., Тимашев П.С., Свистушкин М.В., Юсупов В.И., Баграташвили В.Н.; заявитель и патентообладатель ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН. – № 2017125524, заявл. 18.07.17; опубл. 06.07.2018, Бюл. № 19. – 6 с.

13. Пат. 2648514 Российская Федерация, МПК А61К 9/00 (2006.01). Способ получения структурированных гидрогелей / Тимашев П.С., **Бардакова К.Н.**, Акованцева А.А., Юсупов В.И., Баграташвили В.Н.; заявитель и патентообладатель ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН. – № 2016110444, заявл. 22.03.2016; опубл. 27.09.2017, Бюл. № 27. – 7 с.