

БИОЛОГИЧЕСКАЯ РЕЗОРБЦИЯ ВОЛОКОН ИЗ ХИТОЗАНА В ЭНДОМИЗИИ И ПЕРИМИЗИИ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

**© И. П. Добровольская,^{1, 2} П. В. Попрядухин,^{1, 2} В. Е. Юдин,^{1, 2} Е. М. Иванькова,^{1, 2}
Г. Ю. Юкина,³ А. Н. Юденко,² Н. В. Смирнова^{2, 4, *}**

¹ Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, 199004,

² Лаборатория «Полимерные материалы для тканевой инженерии и трансплантологии»
С.-Петербургского государственного политехнического университета, Санкт-Петербург, 195251,

³ С.-Петербургский государственный медицинский университет

им. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, 197376,

и ⁴ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

* электронный адрес: nvsmirnoff@yandex.ru

Методами сканирующей электронной микроскопии и гистологического анализа проведено сравнительное исследование *in vivo* резорбции волокон из хитозана, имплантированных в эндомизий и перимизий широчайшей спинной мышцы крысы. Показано, что механизм и скорость резорбции волокон из хитозана зависит от локализации волокон в мышечной ткани. При имплантации хитозановых волокон в эндомизий, где они находились в непосредственном контакте с волокнами мышцы, на 14-е сут наблюдалось образование поперечных трещин, фрагментацию волокон и их частичную резорбцию. Полную резорбцию волокон в эндомизии наблюдали на 30-е сут наблюдения. Волокна, которые имплантировали в перимизий, на 7-е сут эксперимента сохраняли целостность, вокруг волокон образовалась фиброзная ткань. На 45-е сут экспозиции признаки разрушения хитозановых волокон отсутствовали. Биосовместимость волокон хитозана подтверждается эффективной адгезией и пролиферацией мезенхимных стволовых клеток на их поверхности.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, тканевая инженерия, хитозановые волокна, резорбция, эндомизий, перимизий мышечной ткани.

Принятые сокращения: МСК ЖТ — мезенхимные стволовые клетки жировой ткани, ММТ — монтмориллонит, МТТ — метилтетразолиевый тест.

Разработка материалов, способных заменить утраченный орган или его части, является основной задачей тканевой инженерии. В последнее время в качестве материалов для изготовления прообразов живых тканей используют природные (Shishatskaya et al., 2004; Muzzarelli et al., 2007; Lee et al., 2012; Rahamanian-Schwarz et al., 2014) и синтетические (Seyednejad et al., 2012; Dobrovolskaya et al., 2015) полимеры. Материалы на основе таких полимеров, а также продукты их резорбции должны обладать биосовместимостью и низкой иммуногенностью. Для решения задач тканевой инженерии необходимы как резорбируемые, так и нерезорбируемые полимеры. К первым относят хитин, хитозан, полилактиды, полигликолиды и их сополимеры, поликапролактоны, а также полигидроксибутират, полигидроксиалканоат (Yang et al., 2001; Lui et al., 2003; Shoichet, 2010; Surrao et al., 2012; Croister, Jerome, 2013). Ко вторым — фторсодержащие полимеры — политетрафторэтилен и его сополимеры с гексафторметиленом, гексафторметиленом и др., а также полиэтилен, полипропилен и полиэтилентерефталат (Leszczynski et al., 2010; Wood et al., 2013). Для замещения органа живого организма или его части необходимы биорезорбируемые полимерные материалы, молекулы которых

под действием активной биологической среды, включающей в себя активные ферменты и макрофаги, разлагаются на безопасные для организма составляющие. В результате обменных процессов эти продукты разложения утилизируются и (или) выводятся из организма.

Большой интерес для тканевой инженерии и трансплантологии представляет хитозан — полисахарид, получаемый из природного полимера хитина методом деацетилирования (Ravi Kumar et al., 1999). Известно, что хитозан обладает биосовместимостью, разлагается под действием биологически активной среды.

Данные по биоразложению хитозана *in vitro* и *in vivo* получены в исследованиях, в которых пленочные образцы хитина с разной степенью деацетилирования помещали в раствор лизоцима (*in vitro*), а также вшивали подкожно в спину крыс (*in vivo*) (Tomihata et al., 1997; Freier et al., 2005). Показано, что скорость резорбции зависит от степени деацетилирования хитина. Наибольшая скорость резорбции наблюдалась для пленок хитина, а наименьшая — чистого хитозана. Аналогичные результаты получены в экспериментах *in vivo* при помещении волокон в область седалищного нерва крысы (Yang et al., 2007).

Также были проведены исследования влияния степени пористости губок из хитозана на скорость их резорбции. Данные, полученные *in vitro*, позволили сделать вывод, что губки с большей пористостью быстрее деградируют в биологической среде, содержащей лизоцим, чем аналогичные материалы с меньшей пористостью (Yang et al., 2010).

С помощью методов математического моделирования стохастического, катализитического и автокатализитического процессов разрушения цепи макромолекулы получены данные о влиянии молекулярной массы полимера на кинетику и механизм его разложения (Gleadall et al., 2014).

Результаты исследования *in vivo* биоразложения хитозановых имплантатов показали, что имплантация хитозановых пластин в спинномозговой канал приводит к инкапсулированию имплантата, отсутствию признаков его разложения в течение 6 мес наблюдения (Kim et al., 2011).

Получены данные, подтверждающие зависимость скорости резорбции композиционных материалов на основе хитозана от содержания желатина, а также наночастиц монтмориллонита (ММТ) (Zhuang et al., 2007). Введение желатина в хитозан, имеющий степень деацетилирования 95 %, повышает скорость резорбции композита в биологической среде, содержащей лизоцим. В то же время содержание ММТ в композите снижает скорость его разложения.

Химическая модификация хитозановой пленки, приводящая к повышенному содержанию —NH—CO—CH₃-групп на поверхности, повышает скорость деструкции пленочного материала (Xu et al., 1996).

Таким образом, анализ литературы позволяет заключить, что на скорость резорбции материалов из хитозана влияют степень деацетилирования, пористость, молекулярная масса, включение в их состав других полимеров или наночастиц. Большинство данных по кинетике резорбции получено в исследованиях *in vitro*, в биологических средах, содержащих лизоцим, или *in vivo* при подкожном имплантировании образцов из исследуемого хитозанового материала. Объектами исследования являлись пленочные образцы или пластины небольшого размера. Практически отсутствуют исследования *in vivo* механизма резорбции хитозановых волокон. В то же время показана перспективность использования хитозановых волокон в качестве одномерных матриц для тканевой инженерии — прообразов нервной ткани, мышечных волокон, пучков волокон связок и сухожилий.

Известно, что надмолекулярная структура, степень ориентации макромолекул хитозана существенно влияет на прочность волокон, значение которой в несколько раз превышает аналогичные значения для пленочных и блочных материалов (Yudin et al., 2014). Поэтому информация о кинетике резорбции *in vivo* волокон из хитозана представляет особенный интерес.

Можно предположить, что интенсивность обменных процессов в области имплантации образца, наличие ферментов, необходимых для деструкции макромолекул полисахарида, и деятельность макрофагов будут оказывать существенное влияние на скорость резорбции. Кроме того, на скорость резорбции должны влиять динамические механические нагрузки, возникающие при мышечной деятельности. Поэтому исследование влияния положения исследуемого образца по отношению к тканям или органам живого организма на процесс резорбции матери-

ала очень важно для тканевой инженерии. Для эффективного процесса тканезамещения необходимо оптимальное соотношение скоростей пролиферации различных типов клеток и резорбции матрицы в конкретной биологической среде; скорость резорбции полимерной матрицы не должна превышать скорость тканевой интеграции имплантата.

В одной из работ (Tomihata et al., 1997) показано, что степень деацетилирования хитозана влияет на скорость резорбции: для хитина скорость резорбции максимальна, с увеличением содержания групп —NH₂ способность к биоразложению уменьшается. Данные о механизме и скорости резорбции композиционных волокон на основе хитозана, содержащих нанофибрillы хитина, отсутствуют.

Важной характеристикой полимерных матриц для тканевой инженерии является их биосовместимость. При получении полимерных материалов используют катализаторы и ингибиторы химических реакций, растворители, осадители и другие вещества, необходимые для получения пленок, волокон или блочных образцов. Даже небольшое количество веществ, которые применялись при получении материала, может вызывать цитотоксичность матрицы и, как следствие, оказывать негативное влияние на взаимодействие живой ткани с имплантатом. Поэтому представляет интерес исследование адгезии, движения и пролиферации мезенхимных стволовых клеток на поверхности хитозановых волокон для оценки биосовместимости материала. Также целью данной работы являлось сравнение механизма и скорости резорбции волокон из хитозана, имплантированных в эндомизий при максимальном контакте волокон с мышечной тканью и в перимизий в непосредственной близости от мышечной ткани, но при отсутствии прямого контакта с мышцей.

Материал и методика

Объектами исследования являлись волокна из хитозана. Для получения волокон использовали хитозан (Fluka Chemie, BioChemika line), ММ 255 кДа, степень деацетилирования 80 %, зольность 0.5 %. Способ получения волокон из хитозана и композиционных волокон описан ранее (Yudin et al., 2014).

Для исследования адгезии мезенхимных стволовых клеток на поверхности волокон пучок волокон длиной 20 мм фиксировали на пленочной хитозановой подложке с помощью раствора хитозана, затем полученный материал обрабатывали 5%-ным раствором NaOH и промывали дистilledированной водой. Стерилизацию материала осуществляли методом автоклавирования при 120 °C в водной среде. В течение 48 ч материал преинкубировали в питательной среде MEM Alpha Modification с добавлением 12 % эмбриональной сыворотки телят и антибиотиков (100 ед. пенициллина и 100 мкг стрептомицина на 1 мл) (все реагенты Gibco, США).

Культуру мезенхимных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ) крысы получали с использованием стандартной процедуры выделения клеток, их пассирования и определения характерных маркеров клеточной поверхности (Trempl et al., 2011).

МСК ЖТ крысы высевали на исследуемый материал. Образец помещали в CO₂-инкубатор при 37 °C, в атмосфере 5 % CO₂ и повышенной влажности. По истечении 4 сут образцы промывали 0.1 М PBS, pH 7.4, после чего фиксировали в течение 20 мин 0.25%-ным раствором глу-

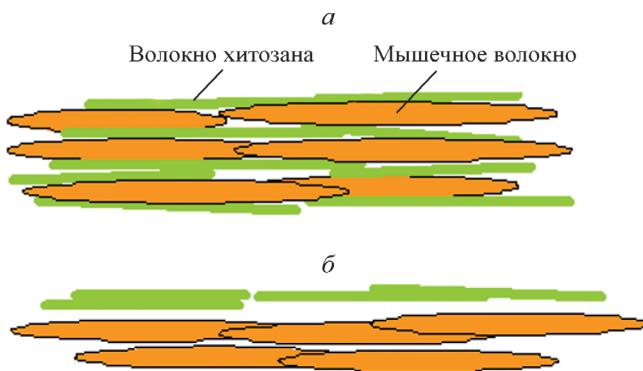


Рис. 1. Схема имплантации волокон хитозана в эндомизий (а) и в перимизий (б) пучка мышечных волокон.

тарового альдегида (Sigma, США) в PBS. После удаления фиксирующего раствора образцы промывали PBS, затем высушивали на воздухе.

Имплантация волокон. Эксперимент был выполнен на 20 самках белых крыс породы Вистар в соответствии с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных, принципами Европейской конвенции (г. Страсбург, 1986 г.) и Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными 1996 г. Масса подопытных животных составляла 180—200 г, возраст — 6 мес.

Для изучения резорбции *in vivo* пучок хитозановых волокон длиной 20 мм, содержащий 10 мононитей диаметром 80 мкм, стерилизовали в 70%-ном этиловом спирте в течение 1 ч. Животных оперировали под ингаляционной анестезией (1.5%-ный изофлуран, вводный наркоз — 3%-ный изофлуран). Волокна помещали в широчайшую мышцу спины (*m. latissimus dorsi*), затем послойно ушивали рану атравматичными иглами с нитью Prolen 4-0.

Хитозановые волокна имплантировали между волокнами широчайшей мышцы спины (в эндомизий) и в перимизий (слой соединительной ткани, окружающий мышцу или отдельный мышечный пучок). Схема расположения волокон при имплантации представлена на рис. 1.

Имплантацию хитозановых волокон в эндомизий проводили на 10 животных. Мышечные волокна с помощью пинцета раздвигали на ширину около 2 мм, в образовавшуюся полость длиной 20—25 мм вводили не более двух исследуемых хитозановых волокон (рис. 1, а).

В другой группе животных в количестве 10 особей пучок волокон хитозана накладывали поверх пучка мышечных волокон спинной мышцы крысы, т. е. в перимизий (рис. 1, б).

После наложения наружного шва крыс содержали в индивидуальных клетках. Животные получали свободный доступ к воде и стандартную диету, которая включала в себя комбиорм. После операции все животные были активны; негативного влияния имплантации волокон на животных не было выявлено, о чем свидетельствовало отсутствие воспалительных процессов в зоне имплантации. Волокна извлекали из тела животных с интервалом в 7 сут.

Гистологический анализ. Для морфологического исследования через 1 и 6 нед после операции брали мышечную ткань с хитозановыми волокнами и прилегающей соединительной тканью. Материал фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине на фосфатном буфере

(pH 7.4) в течение 1 сут, обезвоживали в серии этанола возрастающей концентрации и заливали в парафиновые блоки по стандартной гистологической методике. Получали парафиновые срезы толщиной 5 мкм, поперечные мышечные и хитозановые волокна. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином (Bio-Optica, Италия) и по методу Маллори. Микроскопический анализ проводили с использованием светового микроскопа Leica DM750 (Германия) с использованием объективов 10× и 40×. Регистрацию изображений выполняли, используя микроскоп Leica DM750 и фотокамеру Leica ICC50 (Германия).

Электронно-микроскопические исследования. После фиксации клеток на хитозановой матрице образцы закрепляли на предметные столики и напыляли тонкий слой золота. Изучение объектов проводили с помощью сканирующего электронного микроскопа Supra 55VP (Carl Zeiss, Германия) в режиме регистрации вторичных электронов.

Результаты и обсуждение

Исследование биосовместимости волокон. Ранее показано, что пленочные матрицы на основе хитозана способны поддерживать адгезию и пролиферацию на своей поверхности дермальных фибробластов человека (Popryadukhin et al., 2012). Было показано, что дермальные фибробlastы человека прикреплялись и распластывались на поверхности матрицы, имели типичные для данного типа клеток морфологию и траекторию роста на поверхности материала. При проведении МТТ-теста и исследовании генотоксического хроматинового маркера с помощью культуры мезенхимных стволовых клеток живой ткани человека было показано, что материалы на основе хитозана не вызывают цитотоксического и генотоксического действия.

Отсутствие цитотоксичности волокон хитозана подтверждается эффективной адгезией мезенхимных стволовых клеток на их поверхности. На рис. 2, а приведена микрофотография поверхности волокон, на которой можно наблюдать агрегации мезенхимных стволовых клеток. МСК имеют типичную для этих клеток морфологию и структуру роста. Данная микрофотография демонстрирует не только адгезию, но и пролиферацию клеток на поверхности волокна, так как регистрируется момент митотического деления клетки (рис. 2, а, стрелка).

При большем увеличении (рис. 2, б) можно наблюдать на отдельных участках поверхности продольные каналы, фибрillизацию волокон. МСК, прикрепившиеся к поверхности волокон на этих участках, имеют вытянутую форму и ориентируются вдоль продольных каналов на волокне. Полученные результаты согласуются с данными, полученными ранее (Barbucci et al., 2003; Lim, Donahue, 2007).

Резорбция волокон в эндомизии. На рис. 3 приведены микрофотографии поверхности волокна из хитозана (рис. 3, а) и его скола в жидким азоте (рис. 3, б). Волокно обладает гладкой поверхностью, на которой практически отсутствуют дефекты. Поперечное сечение волокна также характеризуется плотной структурой, отсутствием крупных пор или трещин. После инкубации волокон в мышце крысы, в эндомизии, в течение 7—14 сут на поверхности волокон образуются поперечные трещины, ширина которых увеличивается с увеличением времени экспозиции. На рис. 3, в, г приведены мик-

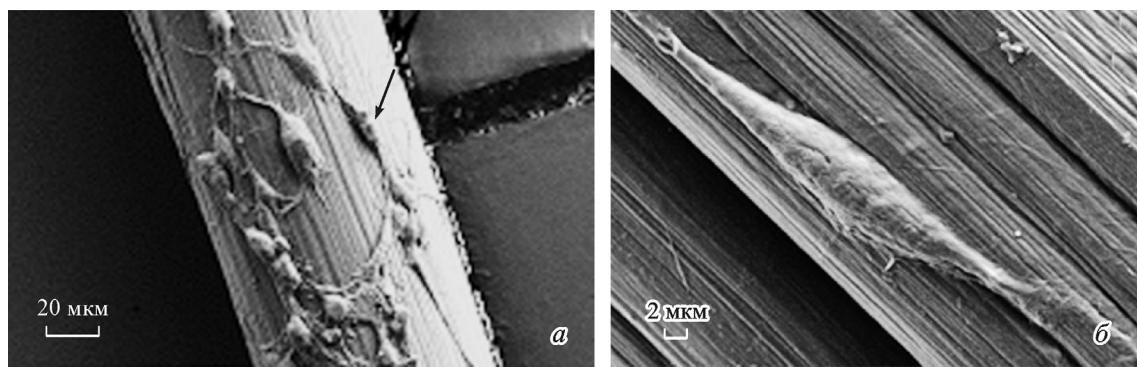


Рис. 2. Микрофотографии МСК ЖТ (*а, б*) на поверхности хитозанового волокна, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа.

Стрелкой отмечена клетка в процессе митотического деления.

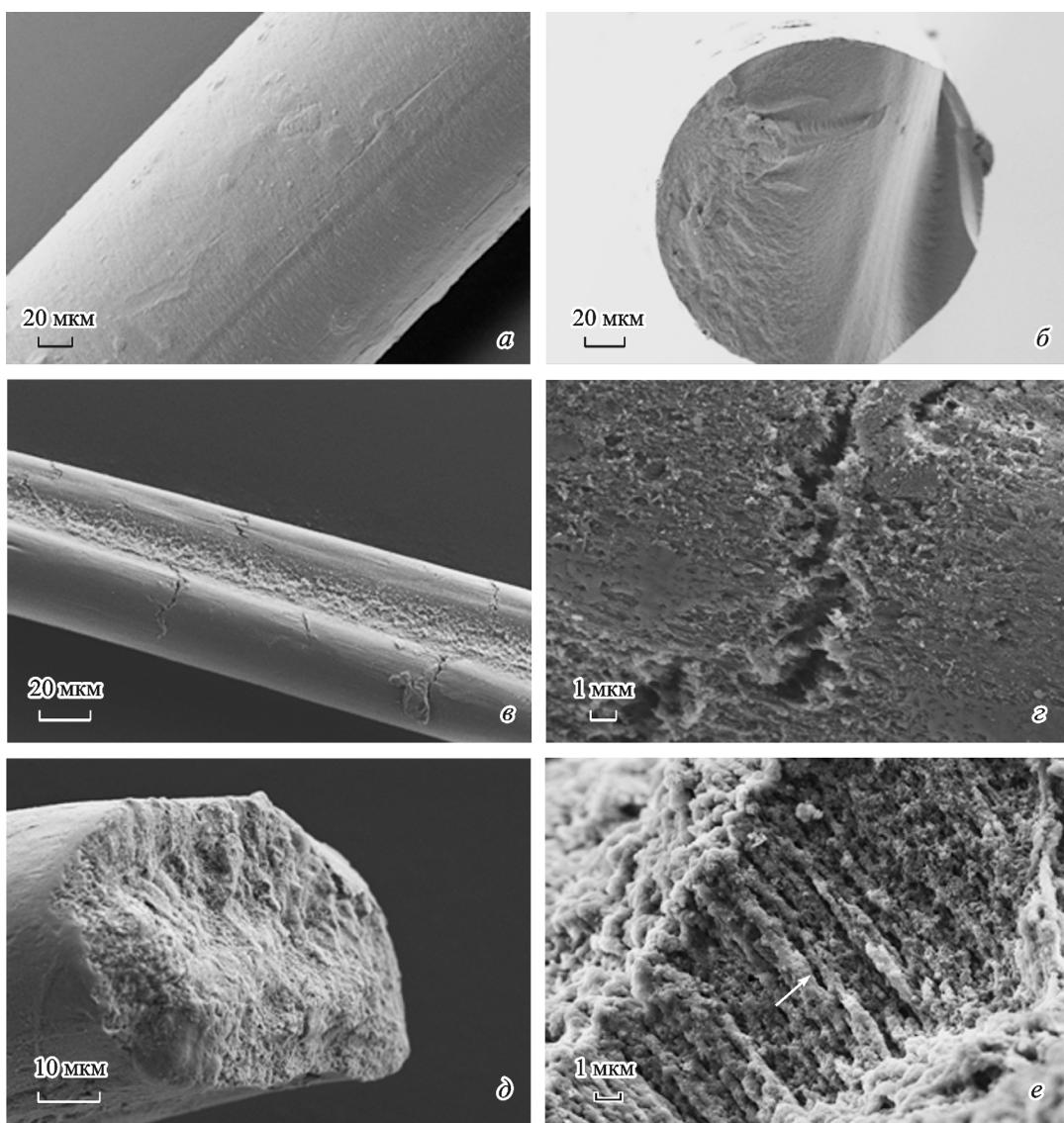


Рис. 3. Микрофотографии боковой поверхности (*а*) и поперечного сечения (*б*) исходного волокна и волокон через 14 (*в, г*) и 21 (*д, е*) сут после имплантации в эндомизий пучка мышечных волокон мышцы крысы.

Стрелкой отмечены поры в межфибрillярном пространстве волокна.



Рис. 4. Схема резорбции волокон из хитозана в эндомизии пучка мышечных волокон спинной мышцы крысы.

а — исходные волокна; б, в — волокна после их экспозиции в эндомизии пучка мышечных волокон мышцы крысы в течение 14 (б) и 21 (в) сут.

рофотографии волокон после их экспозиции в течение 14 сут в эндомизии. Можно предположить, что образование поперечных трещин на волокнах обусловлено механическими динамическими нагрузками, действию которых подвергались хитозановые волокна, находившиеся в непосредственном контакте с мышцами. В процессе эксперимента все животные были активны, их мышцы совершили многократные разнонаправленные циклы растяжения—сжатия, что способствовало разрушению хитозановых волокон, непосредственно контактирующих с волокнами мышечной ткани.

Исследование области имплантации показало, что через 14 сут наблюдаются образование фрагментов волокон длиной 3—5 мм и их частичная резорбция. Следует отметить, что процесс резорбции происходит практически без изменения диаметра волокон, их биоразложение начинается с «торцов». Об этом свидетельствуют результаты исследования структуры поперечного сечения волокон после их нахождения в организме животного в эндомизии. На рис. 3, е, д видно наличие большого количества пор в межфибрillлярном пространстве (рис. 3, е, стрелка), которые отсутствовали в исходном волокне. Можно предположить, что активная биологическая среда, содержащая ферменты и макрофаги, за счет капиллярных сил проникает с торцов в межфибрillлярные области фрагментированных волокон и приводит к их интенсивному разложению.

Наблюдение за зоной имплантации показало, что на 21-е сут можно обнаружить небольшое число фрагментов волокон. Остальные волокна разложились, продукты их деструкции выведены из зоны имплантации вследствие обменных процессов. На 30-е сут в зоне имплантации не наблюдали ни волокон, ни их фрагментов, все волокна полностью резорбировались. Процесс резорбции можно представить схемой, приведенной на рис. 4. Важно отме-

тить, что за все время эксперимента в течение 30 сут в эндомизии не наблюдали образования соединительной ткани вокруг волокон или их фрагментов, инкапсулирование отсутствовало.

Аналогичную схему резорбции наблюдали и для композиционных волокон, содержащих различное количество нанофибрил хитина. Существенных различий между кинетикой биоразложения имплантированных в эндомизий композиционных волокон и волокон, не содержащих хитина, не выявлено.

Резорбция волокон в перимизии. Иную картину наблюдали при имплантации волокон в перимизий (рис. 5). Исследование места имплантации показало, что на 7-е сут эксперимента волокна сохранили целостность, признаков их разрушения не наблюдали. Вокруг волокон образовалась фиброзная ткань, что подтверждают результаты гистологического исследования волокон хитозана после их экспозиции в организме крысы (рис. 5, б).

После длительного срока наблюдения (6 нед) качественных изменений в имплантированных волокнах не наблюдали. Вокруг каждого хитозанового волокна сформирована отчетливая фиброзная капсула. Клеточный инфильтрат фиброзной ткани включает в себя единичные многоядерные клетки инородных тел и незначительное количество макрофагов, моноцитов, лимфоцитов, что свидетельствует об асептическом хроническом воспалении.

Существенные различия в состоянии хитозановых волокон, имплантированных в эндомизий и перимизий мышечной ткани, можно объяснить механическими напряжениями, которые возникают в спинной мышце крысы в процессе нормальной жизнедеятельности и влияют на имплантированные в эндомизий волокна. Действуя на хитозановые волокна, эти разнонаправленные динамические нагрузки способствуют их разрушению. Важным

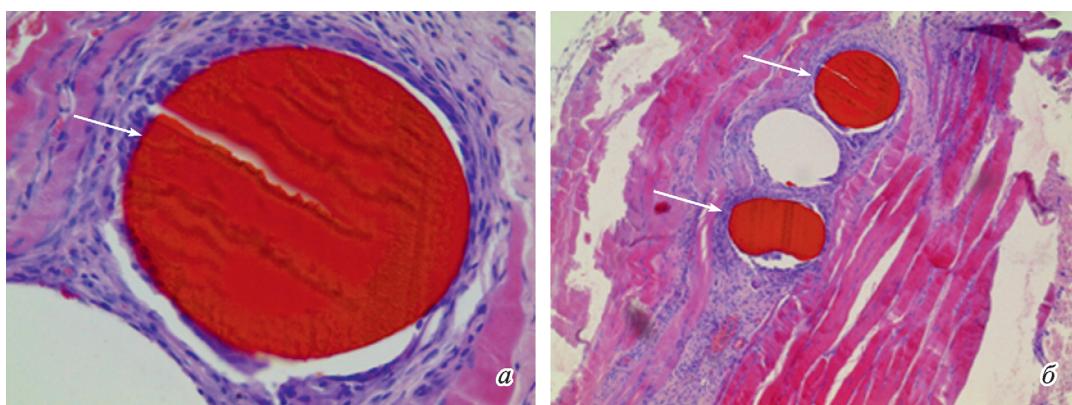


Рис. 5. Гистологические срезы мышечной ткани с хитозановыми волокнами (стрелки) и прилегающей соединительной тканью через 6 нед после имплантации волокон в перимизий.

Увел.: а — об. 40×, б — об. 10×.

фактором, влияющим на ускоренную резорбцию волокон, являются интенсивные обменные процессы, протекающие в мышечной ткани. Кроме того, можно предположить, что постоянные сдвиговые напряжения, действующие на имплантированные волокна, их трение между собой и волокнами мышцы за счет растяжения—сжатия мышц препятствуют образованию соединительной ткани вокруг хитозановых волокон.

Волокна из хитозана, имплантированные в перимизий, были подвержены существенно меньшим механическим нагрузкам, обменные процессы в этих областях менее интенсивны. Это приводило к инкапсулированию имплантированных волокон и образованию фиброзной капсулы. Скорость резорбции таких волокон существенно ниже.

Исследование резорбции имплантированных в спинную мышцу крысы волокон из хитозана позволило сделать вывод о существенном влиянии локализации волокон в мышечной ткани на механизм их резорбции. Волокна, которые находились в эндомизии, в непосредственном контакте с мышечной тканью, испытывали знакопеременные нагрузки. Это приводило к образованию поперечных трещин и фрагментации волокон к 14-м сут после имплантации. Диффузия активной биологической среды, содержащей ферменты и макрофаги, в межфибрillлярные области фрагментов волокон способствовала их полной резорбции к 30-м сут.

Волокна, имплантированные в перимизий, где механические нагрузки и обменные процессы снижены по сравнению с межволоконным мышечным пространством, в течение первых 7 сут инкапсулировались. Наблюдали существенное замедление процесса их резорбции. Отсутствие цитотоксичности хитозановых волокон и их высокая биосовместимость подтверждаются хорошей адгезией и пролиферацией мезенхимных стволовых клеток на поверхности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-03-00003).

Список литературы

- Barbucci R., Pasqui D., Wirsén A., Afrossman S. 2003. Micro- and nano-structured surfaces. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 14 : 721—725.
- Croister F., Jerome C. 2013. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *Eur. Polym. J.* 49 : 780—792.
- Dobrovolskaya I. P., Popryadukhin P. V., Yudin V. E., Ivan'kova E. M., Elokhovskiy V. Yu., Weishauptova Z., Balik K. 2015. Structure and properties of porous films based on aliphatic copolyamide developed for cellular technologies. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 26 : 46.
- Freier T., Koh H. Sh., Kazazian K., Shoichet M. S. 2005. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation. *Biomaterials.* 26 : 5872—5878.
- Gleadall A., Pan J., Kruft M.-A., Kellomaki M. 2014. Degradation mechanisms of bioresorbable polyesters. Part 2. Effects of initial molecular weight and residual monomer. *Acta Biomaterialia.* 10 : 2233—2240.
- Kim H., Tator Ch. H., Shoichet M. S. 2011. Chitosan implants in the rat spinal cord: biocompatibility and biodegradation. *J. Biomed. Mat. Res.* 97 : 395—404.
- Lee O. J., Lee J. M., Kim J. H., Kim J., Kweon H. Y., Jo Y. Y., Park Ch. H. 2012. Biodegradation behavior of silk fibroin membranes in repairing tympanic membrane perforations. *J. Biomed. Mater. Res.* 100 : 2018—2026.
- Leszczynski R., Stodolak E., Wieczorek J., Orlowska-Heitzman J., Gumula T., Blazewicz S. 2010. In vivo biocompatibility assessment of (PTFE-PVDF-PP) terpolymer-based membrane with potential application for glaucoma treatment. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 21 : 2843—2851.
- Lim J. Y., Donahue H. 2007. Cell sensing and response to micro- and nanostructured surfaces produced by chemical and topographic patterning. *J. Tissue Engineering.* 13 : 1879—1891.
- Luu Y. K., Kim K., Hsiao B. S., Chu B., Hadjiaargyrou M. 2003. Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via electrospinning of PLGA and PLA-PEG block copolymers. *J. Contr. Release.* 89 : 341—353.
- Mazzarelli R. A. A., Morganti P., Morganti G., Palombo P., Palombo M., Biagini G., Mattioli Belmonte M., Giantomassic F., Orlandif F., Mazzarellia C. 2007. Chitin nanofibrils/chitosan glycolate composites as wound medicaments. *Carbohydrate Polymers.* 70 : 274—284.
- Popryadukhin P. V., Dobrovolskaya I. P., Yudin V. E., Ivan'kova E. M., Smolyaninov A. B., Smirnova N. V. 2012. Composite materials based on chitosan and montmorillonite: prospects for use as a matrix for cultivation of stem and regenerative cells. *Cell Tissue Biol.* 6 : 82—88.
- Rahmanian-Schwarz A., Held M., Knoeller T., Stachon S., Schmidt T., Schaller H.-E., Just L. 2014. In vivo biocompatibility and biodegradation of a novel thin and mechanically stable collagen scaffold. *J. Biomed. Mater. Res.* 102 : 1173—1179.
- Ravi Kumar M. N. V. 1999. Chitin and chitosan: a review. *Bull. Mater. Sci.* 22 : 905—915.
- Seyednejad H., Gawlitza D., Kuiper R. V., de Bruin A., van Nostrum C. F., Vermonden T., Dhert W. J. A., Hennink W. E. 2012. In vivo biocompatibility and biodegradation of 3D-printed porous scaffolds based on a hydroxyl-functionalized poly(ϵ -caprolactone). *Biomaterials.* 33 : 4309—4318.
- Shishatskaya E. I., Volova T. G., Efremov S. N. 2004. Tissue response to the implantation of biodegradation polyhydroxyalcanoate sutures. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 15 : 719—728.
- Shoichet M. S. 2010. Polymer scaffold for biomaterials applications. *Macromolecules.* 43 : 581—591.
- Surrao D. C., Waldman S. D., Amsden B. G. 2012. Biomimetic poly(lactide) based fibrous scaffolds for ligament tissue engineering. *Acta Biomaterialia.* 8 : 3997—4006.
- Tomihata K., Ikada Y. 1997. In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials.* 18 : 567—575.
- Tremp M., Salemi S., Gobet R., Sulser T., Eberli D. 2011. Regenerative medicine and tissue engineering — cells and biomaterials. *InTech.* 179 p.
- Wood A. J., Cozad M. J., Grant D. A., Ostendorf A. M., Bachman S. L., Grant S. A. 2013. Materials characterization and histological analysis of explanted polypropylene, PTFE, and PET hernia meshes from an individual patient. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 24 : 1113—1122.
- Xu J., McCarthy S. P., Gross R. A., Kaplan D. L. 1996. Chitosan film acylation and effects on biodegradability. *Macromolecules.* 29 : 3436—3440.
- Yang A., Wu R. 2001. Mechanical properties and interfacial interaction of a novel bioabsorbable chitin fiber reinforced poly(ϵ -caprolactone) composite. *J. Mater. Sci. Lett.* 20 : 977—979.
- Yang B., Li X. Y., Shi Sh., Kong X. Y., Guo G., Huang M. J., Luo F., Wei Y. Q., Zhao X., Qian Zh. Y. 2010. Preparation and characterization of a novel chitosan scaffold. *Carbohydrate Polymers.* 80 : 860—865.
- Yang Y. M., Hu W., Gu X. S. 2007. The controlling biodegradation of chitosan fibers by N-acetylation in vitro and in vivo. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 18 : 2117—2121.
- Yudin V. E., Dobrovolskaya I. P., Neelov I. M., Dresvyanina E. N., Popryadukhin P. V., Ivan'kova E. M., Elokhovskii V. Yu., Kasatkin I. A., Okruglin B. M., Morganti P. 2014. Wet spinning of fibers made of chitosan and chitin nanofibrils. *Carbohydrate Polymers.* 108 : 176—182.
- Zhuang H., Zheng J. P., Gao H., Yao K. D. 2007. In vitro biodegradation and biocompatibility of gelatin/montmorillonite-chitosan intercalated nanocomposite. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 18 : 951—957.

BIORESORBABLE PROPERTIES OF CHITOSAN FIBERS IN ENDOMYSIUM
AND PERIMYSIUM MUSCLE TISSUE

*I. P. Dobrovolskaya,^{1,2} P. V. Popryaduhin,^{1,2} V. E. Yudin,^{1,2} E. M. Ivankova,^{1,2}
G. Yu. Yukina,³ A. N. Yudenko,² N. V. Smirnova^{2,4,*}*

¹ Institute of Macromolecular Compounds RAS, S.-Petersburg, 194064,

² Laboratory «Polymeric Materials for Tissue Engineering and Transplantology»,
St. Petersburg State Polytechnic University, St. Petersburg, 195251,

³ St. Peterburg State I. P. Pavlov Medical University, St. Petersburg, 197376,
and ⁴ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

* e-mail: nvsmirnoff@yandex.ru

Scanning electron microscopy and histologic analysis were used in the comparative *in vivo* study of resorption of chitosan fibers implanted into endomysium and perimysium of a rat latissimus dorsi muscle. It was demonstrated that the mechanism and rate of chitosan fiber resorption depend on the position of fibers in muscular tissue. After implantation of chitosan fibers into endomysium (when chitosan was in direct contact with muscle fibers), the formation of cross-sectional cracks, fragmentation of implanted fibers and its partial resorption were observed in 14 days. Complete chitosan resorption in endomysium occurred after 30 days only. Chitosan fibers implanted into perimysium preserved integrity for 7 days, and fibrous tissue was formed around implants. After 45 days of exposure, no signs of chitosan fiber destruction were registered in this case. Biocompatibility of chitosan fibers proved by effective adhesion and proliferation of mesenchymal stem cells on their surface.

К e y w o r d s: mesenchymal stem cells, tissue engineering, chitosan fibers, resorption, endomysium, perimysium.