

## Материал на основе хитозана для создания клеточных тканеинженерных конструкций

### Аннотация

Изготовлены водные дисперсные среды и пленки на основе хитозана (пищевой, сукцинат) с углеродными нанотрубками (ОУНТ). Методами инфракрасной спектроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния выявлены структурные изменения, связанные с появлением межмолекулярных связей между хитозаном и ОУНТ. Экспериментально и теоретически получены нелинейные оптические характеристики при воздействии импульсного лазерного излучения не-длительности на жидкие образцы. Выявлена среда на основе сукцината хитозана и ОУНТ с наибольшим нелинейным коэффициентом поглощения, равным 902 см/ГВт. Данный образец имел сниженное значение пороговой интенсивности излучения (2,7 МВт/см<sup>2</sup>), порождающего нелинейные эффекты в среде, которые приводят к трансформации жидкости в твердую фазу. Полученные результаты полезны для лазерного создания трехмерных клеточных и тканеинженерных конструкций, применяемых в сердечно-сосудистой хирургии.

### Введение

Распространенными заболеваниями сердечно-сосудистой системы являются патологические изменения соединительно-тканых структур сердца и крупных кровеносных сосудов вследствие атеросклеротического процесса, воспалительного поражения, врожденной неполноценности или механических повреждений. Данные заболевания обусловили развитие методов создания тканеинженерных конструкций, имплантируемых в область повреждения тканей сердца и кровеносных сосудов [1]. Метод подразумевает формирование трехмерного биосовместимого каркаса с последующим заполнением его живыми клетками. Одним из наиболее эффективных и современных методов создания подобных каркасов является лазерная печать.

Распространенной технологией создания каркасов для живых клеток является селективное лазерное спекание. Принцип действия данного метода заключается в том, что тонкий слой порошка спекается в точках фокуса лазерного излучения по заданному шаблону. Затем наносится и спекается следующий слой – и так вплоть до выращивания трехмерной модели. В [2] использовали порошок на основе поликапролактона со средним размером гранул 100 мкм. Спекание происходило при мощности лазерного излучения 3 Вт и частоте следования импульсов 150 Гц. Полученный каркас имел высокую пористость ~ 85 % с размерами пор 40...100 мкм при прочности на растяжение ~ 0,4 МПа. Через 11 дней после высеивания клеток миобластов было обнаружено формирование функциональных миотуб, что демонстрирует возможность использования данного каркаса для сердечной тканевой инженерии.

Для создания желатиновых каркасов полусферической структуры применяли метод динамической оптической проекционной стереолитографии при использовании жидкости в качестве материала для печати [3]. Сканирующая система зеркал в данной технологии позволяет фотополимеризовать жидкость сразу в нескольких точках с высокой скоростью печати объемных объектов. Полученные клеточные конструкции показали хорошую адгезию и пролиферацию эмбриональных фибробластов мыши и клеток пуповинной крови человека.

Трехмерные клеточные и тканеинженерные конструкции возможно получать методом электрофоретического осаждения биосовместимых материалов на титановые подложки. Твердотельным лазером Nd:YVO<sub>4</sub> с длиной волны 532 нм, длительностью импульса 12 нс, частотой излучения 200 кГц и мощностью 8 Вт производилась абляция заданных узоров на поверхности титана. Далее на поверхность производилось осаждение слоев хитозана и коллагена в соотношениях 5:1, 3:1 соответственно. При помещении на каркас неонатальных кардиомиоцитов наблюдались их пролиферация и образование межклеточной связи.

Таким образом, при создании клеточных и тканеинженерных конструкций для восстановления сердечно-сосудистой

системы используют био- и синтетические материалы [1], [4]. Однако биологические материалы обладают недостатками, связанными с возможностью передачи инфекций, а синтетические соединения не обеспечивают необходимые механические и биорезорбционные характеристики, ввиду чего возникает потребность в новых материалах для тканевой инженерии в области сердечно-сосудистой системы.

Для создания рассматриваемых конструкций предлагается использовать хитозан; в основном данный аминсахар применяется в качестве матричной среды для наполнителей в виде функциональных частиц [5], [6]. Добавление углеродных нанотрубок в природные или синтетические полимерные конструкции способствует повышению механических свойств и усилению электропроводящих и физиологических свойств конструкции для восстановления тканей сердечно-сосудистой системы [7].

В рассматриваемой работе представлено исследование образцов на основе хитозана с включениями в виде углеродных нанотрубок с целью применения состава в качестве исходного материала для приготовления клеточных и тканеинженерных конструкций, применяемых в сердечно-сосудистой хирургии.

### Материалы и методы

Для приготовления образцов использовали два типа водорастворимого хитозана: пищевой и сукцинат (ООО «Биопрогресс», Россия). Пищевой хитозан (ПХ) был получен из высокомолекулярного хитозана путем химического гидролиза и представлял собой порошок бело-кремового цвета с содержанием основного вещества 88,4 %, массовой долей влаги – 3,13 % и минеральных веществ – 0,53 %. Сукцинат хитозана (СХ) был получен из хитозана краба путем взаимодействия с янтарным ангидридом. Материал представлял собой порошок перламутрово-кремового цвета с остаточной влажностью 4,79 %, рН водного раствора – 7,7.

В качестве наполнителя для создания образцов использовалась 2,7%-ная водная паста на основе одностенных углеродных нанотрубок (ОУНТ). ОУНТ были получены методом газофазного синтеза с промывкой до чистоты 99 %. Диаметр трубок составлял 1...2 нм, длина превышала 5 мкм. Особенностью наночастиц являлась высокая удельная площадь поверхности – 420 м<sup>2</sup>/г.

Были получены водные дисперсные среды (дисперсии) на основе ОУНТ с ПХ и СХ. Сначала водную пасту из ОУНТ смешивали с дистиллированной водой для получения концентрации 10<sup>-5</sup> % и перемешивали на магнитной мешалке в течение 20 мин. Затем полученные дисперсии подвергали воздействию мощного УЗ-поля с амплитудой мощности ~ 40 Вт в течение 50 мин. При этом осуществляли контроль температуры около 50 °С. Затем в гомогенную дисперсию ОУНТ постепенно добавляли порошок ПХ и СХ с концентрацией 1:49. Далее смесь перемешивалась с помощью магнитной мешалки в течение 30 мин и УЗ-бани с рабочей частотой 45 кГц в течение 40 мин.

Спектры КР в диапазоне  $100...1800\text{ см}^{-1}$  измеряли с использованием спектрометрического комплекса «LabRAM HR Evolution» («Horiba»). В качестве источника возбуждающего излучения был использован HeNe-лазер с длиной волны  $633\text{ нм}$ . Спектры поглощения образцов в ИК-диапазоне  $4000...400\text{ см}^{-1}$  ( $2,5...25\text{ мкм}$ ) были получены методом нарушенного полного внутреннего отражения с использованием Фурье-спектрометра «Nicolet iS50» («Thermo»).

Для исследования нелинейных характеристик водных дисперсий хитозана и ОУНТ была реализована экспериментальная схема на основе наносекундного Nd:YAG-лазера (1) с длительностью импульса  $\sim 16\text{ нс}$ . При длине волны основного излучения  $1064\text{ нм}$  генерация второй гармоники излучения с длиной волны  $532\text{ нм}$  достигалась при внутрирезонаторном удвоении частоты генерации лазера с помощью нелинейного кристалла. Энергия излучения варьировалась с помощью набора нейтральных светофильтров (2). Зеркала (3) и (4) разворачивали луч на  $180^\circ$ . Луч попадал на призму Глана (5), которая преобразовывала излучение с произвольной поляризации в линейно-поляризованное, параллельно регулируя энергию падающего на образец луча. Затем луч попадал через светоделительную пластину (6) и светофильтры (7) на датчик энергии «Ophir PD-10» (8). Положительные линзы (9) и (11) имели одинаковые фокусные расстояния, равные  $10\text{ см}$ , и были установлены софокусно. Образец (10) помещался на моторизованную линейку. Перемещение осуществлялось вдоль оптической оси  $z$  ( $Z$ -сканирование) и перпендикулярно ей для изменения точки облучения образца. Прошедший луч через образец попадал на датчик энергии «Ophir PE-9» (13).

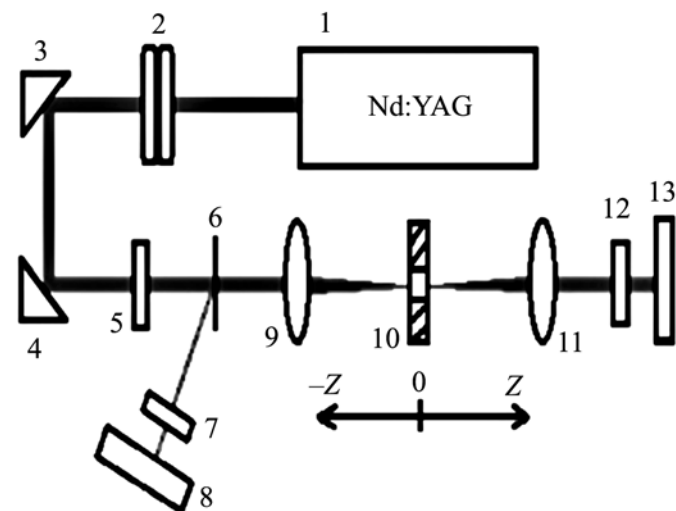


Рис. 1. Экспериментальная схема для исследования нелинейных оптических характеристик образцов

## Результаты

Для исследования степени связывания компонентов водной дисперсии хитозана с ОУНТ были проанализированы характерные амидные полосы на ИК- и КР-спектрах. Для измерения ИК-спектров из дисперсий были изготовлены пленочные образцы путем испарения жидкости на предметном стекле при температуре  $40^\circ\text{C}$ . Для сопоставления спектров были приготовлены контрольные образцы из чистого ПХ, СХ и ОУНТ по отдельности (рис. 2а-в).

Пики на спектре чистого хитозана оказались смещены относительно пиков композитных пленок на основе хитозана и ОУНТ, а также резко изменились их интенсивности, что свидетельствует о соединении молекул веществ между собой. Из спектра ПХ можно увидеть, что интенсивный пик вблизи  $3350\text{ см}^{-1}$  обусловлен валентными колебаниями О–Н и Н–Н (растяжение связей); полоса около  $2868\text{ см}^{-1}$  связана с валентными колебаниями связей С–Н. Группа полос от  $500$  до  $1660\text{ см}^{-1}$  характерна для амидной группы (полосы Амид I – Амид VI). Амид I (около  $1550\text{ см}^{-1}$ ) характеризует колебательную способность амидной группы, в которой происходит периодичес-

кое удлинение связывания С=О, по которому можно судить о степени ацетилирования. Сравнивая с аналогичным пиком на рис. 2б, можно сделать вывод, что у СХ степень ацетилирования выше.

Полоса поглощения около  $3450\text{ см}^{-1}$  может быть чувствительной к адсорбированной воде, причем увеличение содержания воды приводит к увеличению полосы поглощения около  $1640\text{ см}^{-1}$ , что наблюдается на спектре ПХ с ОУНТ. Разность в интенсивности пиков  $3350$  и  $1550\text{ см}^{-1}$  на спектре СХ связана со степенью ацетилирования. Также, возможно, вклад ОУНТ сильнее проявился на спектре при соединении с ПХ. Более широкая полоса СХ около  $3350\text{ см}^{-1}$  по сравнению с ПХ может быть связана с растяжением связи О–Н, которая перекрывает Н–Н растяжение в той же области. Следует отметить, что интенсивные пики для СХ с ОУНТ около  $1040$  и  $1200\text{ см}^{-1}$  связаны с валентными колебаниями С–С и С–О, что подтверждает связывание компонентов дисперсии между собой. Аналогичен рост интенсивности и для ПХ с ОУНТ в этой же области относительно спектра чистого хитозана, однако амплитуды пиков ниже, чем в спектре СХ. Предполагается, что проникновение ОУНТ в более вязкую гелеобразную структуру ПХ с концентрацией  $2\%$  произошло слабее, чем в более жидком образце СХ.

Как видно на рис. 2г и д, спектр хитозана с ОУНТ смещен относительно спектра исходного хитозана, что свидетельствует об изменениях в структуре аминоксахара и трубок. Данные сдвиги отвечают за соединение компонентов дисперсии между собой. Полосы около  $1603\text{ см}^{-1}$  соответствуют деформационным симметричным колебаниям аминокгруппы. Форма пиков на спектре ПХ с ОУНТ аналогична форме на спектре СХ с ОУНТ, что в основном связано с более сильным проявлением вклада нанотрубок на спектре КР по сравнению со спектрами органических веществ. Пики с частотами около  $1200$  и  $1120\text{ см}^{-1}$  отвечают за валентные колебания С–О и С–N, которые проявились на спектрах ПХ и СХ. Данные пики сместились относительно исходного положения при соединении хитозана с трубками, а их интенсивность резко возросла, что можно объяснить сильно проявляющейся в этой области D-модой ОУНТ. Также следует отметить, что ОУНТ проявляют полупроводниковые свойства и не имеют каких-либо структурных повреждений, что видно из рис. 2в: соотношение интенсивности RVM-моды (около  $500\text{ см}^{-1}$ ), D- и 2D-моды (около  $1200$  и  $2800\text{ см}^{-1}$ ) с интенсивностью G-моды (около  $1594\text{ см}^{-1}$ ).

По результатам Z-сканирования были построены зависимости нормированного пропускания от положения образца относительно фокуса линзы (9) (рис. 3, кривые 1, 2, 5, 6). Образцы хитозана начинают проявлять нелинейные свойства непосредственно вблизи фокуса линзы, ослабление лазерного излучения является несущественным. Добавление ОУНТ приводит к резкому увеличению поглощения излучения. Вдали от фокуса (при низких интенсивностях) нормированное пропускание образцов приближается к единице, что говорит об отсутствии нелинейных эффектов.

Зависимости нормированного пропускания от энергии падающего луча с фиксированным положением образца в фокусе линзы показаны на рис. 3 (кривые 3, 4, 7, 8). По результатам экспериментов были произведены расчеты нелинейных коэффициентов. Выяснено, что добавление ОУНТ в водную суспензию хитозана приводит к резкому увеличению нелинейного поглощения. Для суспензий ПХ и СХ коэффициент нелинейного поглощения составил  $16$  и  $16,84\text{ см}^2/\text{ГВт}$  соответственно. Для дисперсий ПХ и СХ с ОУНТ коэффициенты увеличились до  $561$  и  $902\text{ см}^2/\text{ГВт}$  соответственно. Также были рассчитаны значения пороговой интенсивности излучения, при которой начинают проявляться нелинейные эффекты (поглощение/рассеяние) в образцах, что приводит к трансформации жидкой фазы среды в твердую. При добавлении ОУНТ в образцы с хитозаном значение пороговой интенсивности ниже ( $5,5\text{ МВт}/\text{см}^2$  – ПХ + ОУНТ и  $2,7\text{ МВт}/\text{см}^2$  – СХ + ОУНТ), чем для суспензий из чистых ПХ и СХ ( $7,5$  и  $39\text{ МВт}/\text{см}^2$ ).

Добавление ОУНТ в водную дисперсию хитозана приводит к незначительному росту линейного коэффициента погло-

шения, который характеризует прохождение лазерного излучения при его низкой мощности. Однако при увеличении энергии происходит резкое уменьшение прошедшей энергии одиночного импульса из-за проявления вблизи ОУНТ нелинейных эффектов.

### Заключение

Изготовлены водные суспензии хитозана и дисперсии хитозана с углеродными нанотрубками, получены пленочные образцы из жидкостей при нанесении на стеклянную подложку и испарении жидкой составляющей при температуре не более 40 °С. По результатам исследования методами ИК-спектроскопии и КР-спектроскопии было установлено, что в структуре образца на основе хитозана и ОУНТ произошли изменения, связанные с появлением межмолекулярных связей. Выяснено, что более высокая степень ацетилирования СХ приводит к его более однородному растворению, тогда как ПХ склонен к гелеобразованию. Экспериментально измерены и рассчитаны нелинейные оптические характеристики при воз-

действии импульсного лазерного излучения не-длительности на жидкие образцы. Получено превышение нелинейного коэффициента поглощения более чем в 50 раз для образцов хитозана с ОУНТ над чистым хитозаном. Данные образцы имели сниженное значение пороговой интенсивности излучения, порождающего нелинейные эффекты в материале, приводящие к образованию вокселей в твердой фазе. Таким образом, проведенные исследования полезны для изготовления трехмерных клеточных и тканеинженерных конструкций, применяемых для восстановления дефектов сердечно-сосудистой системы.

*Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение 14.578.21.0234 RFMEFI57817X0234).*

### Список литературы:

1. Kankala R.K. et al. Fabrication of arbitrary 3D components in cardiac surgery: From macro-, micro- to nanoscale // Biofabrication. 2017. Vol. 9. PP. 1-16.

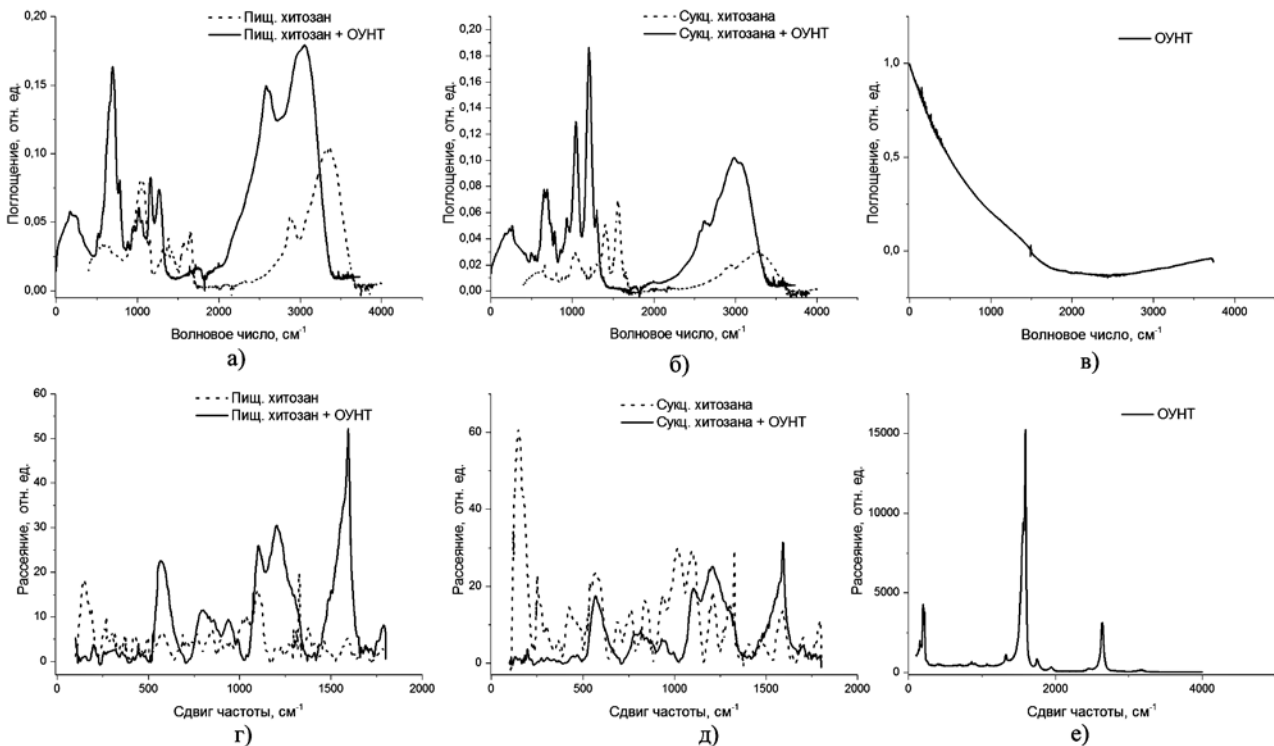


Рис. 2. ИК- (а-в) и КР- (г-е) спектры водных дисперсий на основе ПХ и СХ с ОУНТ

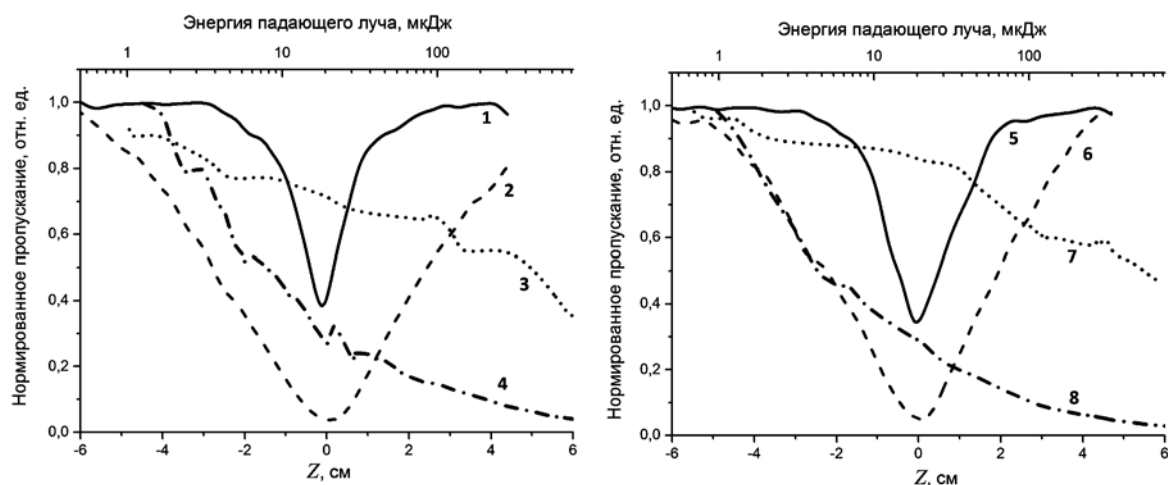


Рис. 3. Зависимость нормированного пропускания: от положения образцов на основе ПХ (1), ПХ + ОУНТ (2), СХ (5), СХ + ОУНТ (6) относительно линзы; от энергии падающего луча образцов на основе ПХ (3), ПХ + ОУНТ (4), СХ (7), СХ + ОУНТ (8)

2. *Yeong W. Y. et al.* Porous polycaprolactone scaffold for cardiac tissue engineering fabricated by selective laser sintering // *Acta Biomaterialia*. 2010. Vol. 6. PP. 2028-2034.
3. *Zhang A. P. et al.* Fabrication of Complex 3D Extracellular Microenvironments by Dynamic Optical Projection Stereolithography // *Adv. Mater.* 2012. Vol. 16, 24. № 31. PP. 4266-4270.
4. *Gaebel R. et al.* Patterning human stem cells and endothelial cells with laser printing for cardiac regeneration // *Biomaterials*. 2011. Vol. 32. PP. 9218-9230.
5. *Benzoni P.* Biomanufacturing of a chitosan/collagen scaffold to drive adhesion and alignment of human cardiomyocyte derived from stem cells // *Procedia CIRP*. 2016. Vol. 49. PP. 113-120.
6. *Lewis A.* A peptide-modified chitosan-collagen hydrogel for cardiac cell culture and delivery // *Acta Biomaterialia*. 2012. Vol. 8. PP. 1022-1036.
7. *Dozois M. D.* Carbon Nanomaterial-Enhanced Scaffolds for the Creation of Cardiac Tissue Constructs: A New Frontier in Cardiac Tissue Engineering // *Carbon*. 2017. Vol. 120. PP. 338-349.

*Александр Юрьевич Герасименко,*  
 канд. физ.-мат. наук, доцент,  
 ст. научный сотрудник,  
*Юлия Олеговна Федорова,*  
 техник,  
*Павел Николаевич Василевский,*  
 техник,  
*Александр Александрович Полохин,*  
 инженер,  
*Михаил Сергеевич Савельев,*  
 инженер,  
*Виталий Маркович Подгаецкий,*  
 д-р физ.-мат. наук, профессор,  
 кафедра биомедицинских систем,  
 Национальный исследовательский университет «МИЭТ»,  
 г. Москва, г. Зеленоград,  
 e-mail: [gerasimenco@bms.zone](mailto:gerasimenco@bms.zone)

*Ч.Т. Нгуен, З.М. Юлдашев*

## Алгоритм выявления фибрилляции предсердий и формирования тревожного сигнала в системе удаленного мониторинга ЭКГ

### Аннотация

В статье рассматривается алгоритм формирования тревожного сигнала эпизодов фибрилляции предсердий, применяемый в системе удаленного мониторинга состояния пациента с фибрилляцией предсердий. Предложен комплекс значимых показателей, отражающий динамику изменения состояния пациента при наступлении фибрилляции предсердий с целью повышения эффективности выявления эпизодов фибрилляции предсердий. Для мониторинга эффективности лечения предлагается гистограмма динамики распределения частоты эпизодов фибрилляции предсердий по продолжительности.

### Актуальность

Фибрилляция предсердий (ФП) – одно из серьезных нарушений ритма сердца, вызывающее изменение гемодинамики и сердечную недостаточность. Нарушения ритма сердца при ФП проявляются в виде трепетания – ритмичных сокращений мышечной ткани предсердия с частотой от 250 до 400 уд/мин – либо в виде мерцания отдельных групп мышечных волокон с частотой до 700 уд/мин. Продолжительные приступы ФП увеличивают риск тромбообразования в предсердиях, ишемического инсульта.

Ранняя диагностика ФП обеспечивает возможность контролировать состояние здоровья пациента, позволяет подобрать эффективную тактику лечения заболевания и медицинского сопровождения пациента с ФП, снижает риск смерти [1]. Поэтому разработка инструментальных средств диагностики ФП с целью повышения эффективности обнаружения эпизодов ФП играет важную роль в медицинском приборостроении.

Цель работы – разработка метода и алгоритма on-line мониторинга и формирования тревожного сигнала эпизодов ФП.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Формирование комплекса показателей, характеризующих развитие ФП.
2. Разработку модифицированного алгоритма тревожной сигнализации эпизодов ФП у пациента на основе использования комплекса показателей.
3. Экспериментальную апробацию разработанного алгоритма тревожной сигнализации эпизодов ФП.

Известно, что при ФП, как правило, увеличивается вариабельность сердечного ритма (ВСР), т. е. имеет место нестабиль-

ность частоты сердечных сокращений (ЧСС), на электрокардиографическом сигнале (ЭКГ-сигнал) II, III, V1, V2 и aVR-отведений вместо Р-волн обнаруживаются f-волны различной амплитуды и формы, которые обусловлены хаотичной генерацией импульсов области предсердий.

### Формирование диагностически значимых показателей

Первым признаком, характеризующим нарастание ФП, является увеличение ВСР. Существуют различные алгоритмы классификации эпизодов ФП и нормальных синусовых ритмов. Для оценки нерегулярности RR-интервалов используются различные методы. При использовании марковского процесса ошибки классификации нерегулярности RR-интервалов не превышают *Err* 8,3 % [2]. При использовании тестов Колмогорова-Смирнова и оценке коэффициентов вариации ошибки классификации не превышают *Err* 6,04 % [3]. Известны методы на основе анализа спектрограммы и энтропии RR-интервалов [4], [5]. Однако все эти методы обладают существенным недостатком – невозможностью обнаружения коротких эпизодов ФП с продолжительностью менее 10 с, так как в них используются окна обработки ЭКГ-сигнала от 1 до 2 мин.

Второй признак нарастания ФП – появление хаотичных низкоамплитудных f-волн на ЭКГ в некоторых отведениях и отсутствие Р-волн во всех отведениях ЭКГ. Широко используемым методом выявления в ЭКГ-сигнале f-волн является спектральный анализ сигнала предсердной активности, который формируется путем удаления QRST-комплексов из ЭКГ-сигнала [6]. При ФП f-волны появляются по всему кардиоциклу, поэтому для выделения f-волн из ЭКГ-сигнала необходимо использовать накопление QRST-комплексов, а затем вычитание усредненного QRST-комплекса из текущего комплекса.