

ДЕГРАДАЦІЯ ТА КЛІТИННА ТОКСИЧНІСТЬ НОВИХ НАНОВОЛОКНИСТИХ МАТЕРІАЛІВ ДЛЯ ТКАНИННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

А.В. Гапченко

Сумський державний університет, м. Суми, Україна

Ключові слова:

PLA, NanoMatrix3D, цитотоксичність, DAPI, скафолд.

Буковинський медичний вісник. Т.25, № 1 (97). С. 19-23.

DOI: 10.24061/2413-0737.XXV.1.97.2021.3

E-mail: gapsandrey@gmail.com

Біодеградуючі матеріали є перспективними з огляду на створення каркасів для тканинної інженерії. При цьому вони повинні мати задовільний профіль втрати маси, відсутність токсичності та здатність підтримувати проліферацію клітин. Полілактиди та їх похідні композити інтенсивно використовують для реконструкції тканин та органів і в системах доставки лікарських препаратів, проте технології виготовлення матеріалів не є стандартизованими. Електропрядіння – доступна технологія, за допомогою якої можливо створити нановолокнисті тривимірні конструкції для тканинної інженерії та регенеративної медицини, проте їх використання на сьогодні обмежене через недостатню вивченість.

Мета роботи. Створення тривимірних конструкцій із полімолочної кислоти, дослідження профілю їх біодеградації та клітинної токсичності на моделі дермальних фібробластів.

Матеріал і методи. Нановолокнисті мембрани отримані стандартним методом електропрядіння та за допомогою технології NanoMatrix3D. Дослідження деградації проводилось у розчині SBF у статичному та динамічному режимах із визначенням відсотка втрати маси. Дослідження цитотоксичності проводилось на первинній культурі дермальних фібробластів з оцінкою редукції резазурину та з візуалізацією DAPI.

Висновки. Використання технології електропрядіння дозволяє створити нановолокнисті мембрани, які здатні до біодеградації і мають задовільний профіль токсичності. Динамічна система деградації призводить до зростання втрати маси мембранами через видалення продуктів деградації. Отримані дані свідчать про можливість використання матеріалів на основі PLA для розробки конструкцій для тканинної інженерії.

ДЕГРАДАЦИЯ И КЛЕТОЧНАЯ ТОКСИЧНОСТЬ НОВЫХ НАНОВОЛОКНИСТЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ

А.В. Гапченко

Ключевые слова:

PLA, NanoMatrix3D, цитотоксичность, DAPI, скафолд.

Буковинский медицинский вестник. Т.25, № 1 (97). С.19-23.

Биоразлагаемые материалы являются перспективными с учетом создания каркасов для тканевой инженерии. При этом они должны иметь удовлетворительный профиль потери массы, отсутствие токсичности и способность поддерживать пролиферацию клеток. Полилактид и его производные композиты интенсивно используют для реконструкции тканей и органов и в системах доставки лекарственных препаратов, однако технологии изготовления материалов не стандартизованы. Электропрядение - доступная технология, с помощью которой можно создать нановолокнистые трехмерные конструкции для тканевой инженерии и регенеративной медицины, однако их использование сегодня ограничено через недостаточную изученность.

Цель работы. Создание трехмерных конструкций из полимолочной кислоты, исследования профиля их биодеградации и клеточной токсичности на модели дермальных фибробластов.

Материал и методы. Нановолокнистые мембраны получены стандарт-

Оригінальні дослідження

ным методом электропрядения и с помощью технологии NanoMatrix3D. Исследование деградации проводилось в растворе SBF в статическом и динамическом режимах с определением процента потери массы. Исследование цитотоксичности проводилось на первичной культуре дермальных фибробластов с оценкой редукции резазурина и с визуализацией DAPI.

Выводы. Использование технологии электропрядения позволяет создать нановолокнистые мембраны, которые способны к биодegradации и имеют удовлетворительный профиль токсичности. Динамическая система деградации приводит к росту потери массы мембранами по причине удаления продуктов деградации. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования материалов на основе PLA для разработки конструкций для тканевой инженерии.

DEGRADATION AND CELL TOXICITY OF NEW NANOFIBROUS MATERIALS FOR TISSUE ENGINEERING

A.V. Hapchenko

Key words: PLA, NanoMatrix3D, cytotoxicity, DAPI, scaffold.

Bukovinian Medical Herald. V.25, № 1 (97). P. 19-23.

Biodegradable materials are promising for the development of tissue engineering constructions. At the same time, they must have a satisfactory weight loss profile, no toxicity and the ability to support cell proliferation. Polylactides and their derivatives are intensively used to reconstruct tissues and organs and in drug delivery systems, but the technology of manufacturing materials is not standardized. Electrospinning is an affordable technology that can be used to create three-dimensional nanofiber structures for tissue engineering and regenerative medicine, but their use is currently limited due to insufficient study.

The aim. Creation of three-dimensional structures from polylactic acid, evaluation of their biodegradation profile, and cellular toxicity in the model of dermal fibroblasts.

Material and methods. Nanofiber membranes were obtained by standard electrospinning and using NanoMatrix3D technology. The degradation study was performed in SBF solution in static and dynamic modes to determine the percentage of weight loss. Cytotoxicity studies were performed on primary dermal fibroblast culture with assessment of resazurin reduction and DAPI imaging.

Conclusions. The use of electrospinning technology allows us to create nanofiber membranes that are capable of biodegradation and have a satisfactory toxicity profile. The dynamic system of degradation leads to an increase in a mass loss by membranes due to the removal of degradation products. The data indicate the possibility of using PLA-based materials for the development of structures for tissue engineering.

Вступ. Основна функція скафолду є імітація природного позаклітинного матриксу (ECM). Скафолд має підтримувати проліферацію, диференціювання і нормальну функцію клітин. Крім того, скафолди на ділянці регенерації повинні захищати від зовнішніх факторів [1]. Для виконання функцій скафолди в тканинній інженерії мають задовольняти ряд вимог - він повинен бути біологічно сумісним, повинен мати відповідну пористу мікроструктуру і належну хімічну структуру поверхні, щоб дозволити прикріплення клітин, проліферацію і диференціювання. Скафолди повинні мати достатні механічні властивості і мати контрольовану біодegradацію [2]. Найбільш поширені причини для

використання біодegradуючих полімерів для матеріалу скафолду є повне розчинення імплантата, усуваючи довгострокові проблеми біосумісності, уникання вторинних хірургічних операцій [3]. Отже, біодegradуючі складові мають цілу низку вимог, необхідних для виконання певних умов.

Велика увага була приділена молочній кислоті як джерела синтезування складних полієфірів, відповідно супроводжується величезною кількістю публікацій, оглядів і патентів, виданих з 1970-х років. Серед штучних біодegradуючих полімерів, які використовуються в медицині, з них на основі молочної кислоти переважають, тому що: (I) вони розкладаються в людському організмі;

(II) побічні продукти деградації можуть бути видалені з людського організму шляхом фільтрації нирок і біосиміляції [4] і навіть у доквіллі - бактеріями і грибами [5]; (III) попередник L-молочної кислоти, виробляється з поновлюваних ресурсів [6].

Перший, хто синтезував полілактид із низькою молекулярною масою, був Карозерс у 1932 році [7]. Полілактиди, полікапролактон і їх похідні композити інтенсивно використовують для реконструкції тканин та органів (тканинної інженерії) [8] та в системах доставки лікарських препаратів [9], виготовляють мікросфери, в яких міститься діюча речовина, наночасточки, пористі скафолди для створення субстрату для клітин [10], біодеградуючі хірургічні нитки, а також широко - в інших галузях медицини. Біодеградуючі полімери мають багато переваг перед іншими матеріалами, а саме відсутність необхідності видалення імплантата, біосумісність, виготовлення з відновлювальних ресурсів, мають кращі властивості при низькій вартості виготовлення.

Електрогідродинамічні методи, а саме електророзпилення та електроформування, є дуже потужним інструментом для розробки та виробництва матеріалів, структурні особливості яких необхідні для застосування в тканинній інженерії [11].

Технологія електропрядіння складається з трьох основних компонентів: джерела електричного поля (високовольтне джерело живлення), фільтри (форсунка, приєднана до шприца та насоса) та протидіючого електрода (як правило, металева колекторна пластина) [12]. Розчин подають за допомогою насоса, а різниця в електричній напрузі застосовується на проміжку між форсункою і протидіючим електродом. Швидкість потоку розчину полімеру та застосовану напругу потрібно оптимізувати, залежно від типу використовуваного розчину.

Мета дослідження – створення тривимірних конструкцій із полімолочної кислоти, дослідження профілю їх біодеградації та клітинної токсичності на моделі дермальних фібробластів.

Матеріал і методи

Виготовлення матеріалів. Для виготовлення матеріалів в експерименті використані такі реагенти: полілактид (PLA) ($M_w = 60\ 000$ г/моль), гексафтор – 2 – пропанол (HFP), які отримані від Sigma Aldrich, хлороформ (чистота $\geq 99\%$), етанол (чистота 95,4-96,8%), що отримані від Penta Chemicals. Полімерні розчини готували так: PLA (7%) - у хлороформі / HFP (у співвідношенні 3 : 1). Розчини полімеру змішували за допомогою магнітної мішалки протягом 4 годин при кімнатній температурі для повного розчинення перед електропрядінням.

Матеріали для дослідження отримували методом традиційного електропрядіння та за методикою NanoMatrix3D. Для отримання матеріалів звичайним методом електропрядильний електрод підключали до пластикового шприца з розчином полімеру та джерелом високої напруги (Spellman SI100). Електрод був позитивно заряджений (22). Обертаючий електрод знаходився на 180 мм нижче від негативно зарядженого колектора

з нержавіючої сталі розміром 160 мм x 355 мм (ширина x глибина). Нановолокна були зібрані на нетканому матеріалі Spunbond (Pegas, CZ), розташованому під колектором з протилежним зарядом (10 кВ). Полімерний розчин PLA переносили у шприц 20 мл, доповненим шприцовим насосом (neMESYS, Cetoni) і дозували з постійною швидкістю 11 мл/год. Використання методу NanoMatrix3D дозволяє виробляти продукт у стерильних умовах та використовувати додаткові методики видалення розчинника. Для видалення залишкового розчинника всі шари скафолдів NM3D® сушили попередньо в ексикаторі та в спеціальному випарнику з високим вакуумом.

Вивчення деградації. Використовували прямокутні смуги (10 x 5 мм) PLA. Початкову масу всіх окремих смуг вимірювали за допомогою аналітичних вагів SPS202F (OHAUS, США). Ми використовували статичний та динамічний тест на деградацію. При статичному тесті - продукти деградації можуть накопичуватися у зразках і впливати на її швидкість, при динамічному тесті - продукти деградації вимиваються зі зразків, оскільки імітуються умови *in-vivo*. Як тестовий розчин для проведення експерименту обрана Simulated Body Fluid (SBF), яка подібна до іонного складу плазми крові. Перед вимірюванням маси зразки сушили під вакуумом протягом 12 годин.

Статична деградація. Зразки (5 на кожен пункт часу) занурювали у розчин SBF та інкубували при температурі 37 °C, щоб імітувати умови деградації *in-vivo*. Зразки видаляли з розчину SBF через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11 і 12 тижнів, тричі промивали очищеною водою, сушили під вакуумом протягом 12 годин. Втрачена маса визначалася з використанням рівняння: $W1 / W0 \times 100\%$, де $W0$ - вихідна маса стрічки, а $W1$ - маса зразка після експерименту.

Динамічна деградація. Для оцінки динамічної деградації ми використовували спеціальний пристрій (рис. 1). Зразки (5 на кожен пункт часу) помістили до контейнера (B), потік розчину SBF із контейнера (A) надходив до зразків у нижньому контейнері (B). Швидкість потоку (1 мл на хвилину) регулюється регулятором швидкості між контейнером А та В. Новий розчин SBF додавали до контейнера А щодня. Всю процедуру деградації забезпечували при 37 °C. Оцінка втрати маси була визначена тим же методом, що і для статичної деградації.

Оцінка цитотоксичності. Шкірні фібробласти (DFBs) виділяли шляхом ферментативного перетворення підшкірної клітковини та фрагментів дерми, а потім їх культивували в середовищі альфа - MEM, доповненої 10% FBS і 1 нг / мл bFGF при 5% CO₂. Клітини поміщали на зразки PLA в кількості 104 клітини на кожний зразок у 24-лункових культуральних планшетах та інкубували протягом семи днів. Життєздатність клітин і швидкість проліферації фіксовані через 24 год, три доби, п'ять і сім діб методом урахування редукції резазурину. Оцінка абсорбції резазурину проводилася на довжині хвилі 570 та 600 нм за допомогою Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Оригінальні дослідження

Флуоресцентна мікроскопія зразків проводилась на 7-й день експерименту. Зразки промивали розчином PBS протягом 1 хвилини без струшування. Після цього зразки інкубували з 1: 35 000 4', 6-діамідин-2'-феніліндол дигідрохлоридом (DAPI, Roche) у PBS протягом 2 хвилин у темряві з подальшим промиванням у PBS протягом 1 хвилини без струшування. Після цього зразки розміщували на предметному склі та аналізували за допомогою флуоресцентного мікроскопа (мікроскоп Axio Imager A1, Carl Zeiss) у каналі DAPI.

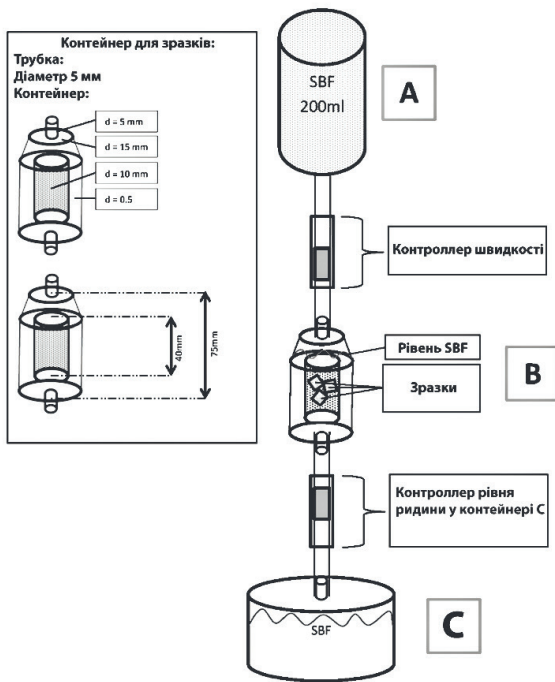


Рис. 1. Система динамічної деградації. Контейнер A містить SBF, який надходить у камеру B (зі зразками). Регулятор швидкості регулює потік SBF, щоб імітувати капілярний потік. Нижче камери B - це інший контролер, який регулює рівень SBF у камері B

Статистична обробка результатів. Статистичну обробку даних проводили за допомогою програмного забезпечення SPSS версії 8.0 (SPSS Inc., Чикаго, Іллінойс, США). Результати подавались як середнє значення ± стандартне відхилення. Для визначення рівня значущості використовували односторонній дисперсійний аналіз ($p < 0,05$ визначали як значущий).

Результати дослідження та їх обговорення. Результати статичної та динамічної деградації мембран представлені на рисунку 2. До кінця першого місяця (4-й тиждень) спостерігається помірна втрата маси матеріалу, виготовленого за традиційною методикою електропрядіння, яка не перевищує $8,27 \pm 2,4\%$ для статичної деградації і $12,8\% \pm 1,9$ – для динамічної. У подальшому відбувається прискорення втрати маси мембраною, що свідчить про розрив зв'язків у полімерному ланцюгу PLA. При цьому спостерігається достовірна різниця між запропонованими видами деградації – зміна сере-

довища при динамічних умовах призводить до достовірного прискорення втрати маси зразками. Через 12 тижнів експерименту втрата маси становить відповідно $40,2 \pm 1,9\%$ та $53,8 \pm 4,1\%$ ($p \leq 0,019$).

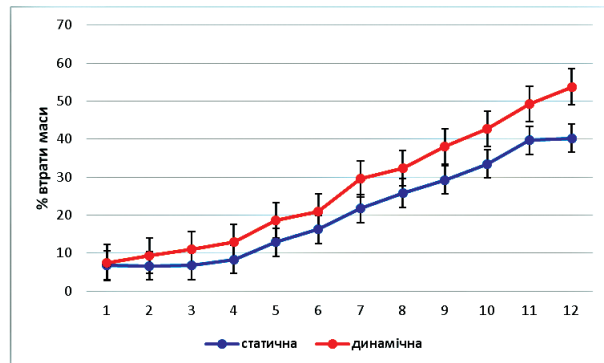


Рис. 2. Динаміка втрати маси (у відсотках) в розчині SBF нановолокнистими мембранами, які виготовлені за стандартною технологією

Мембрани, які виготовлені за технологією NM3D®, мають подібну динаміку втрати маси упродовж 12 тижнів спостереження (рис. 3). На відміну від попередньої групи, різниця між статичною та динамічною деградацією спостерігається вже через сім тижнів спостереження: відсоток втрати маси становить відповідно $22,1 \pm 3,2\%$ та $31,5 \pm 5,8\%$ ($p \leq 0,0043$). У подальшому різниця зростає і через 12 тижнів спостереження відсоток втрати маси становить відповідно $42,7 \pm 2,5\%$ та $56,2 \pm 3,7\%$ ($p \leq 0,009$). Слід зауважити, що незважаючи на наявні відмінності у швидкості деградації мембран, виготовлених за різними технологіями електропрядіння, достовірна різниця у швидкості деградації між цими групами відсутня.

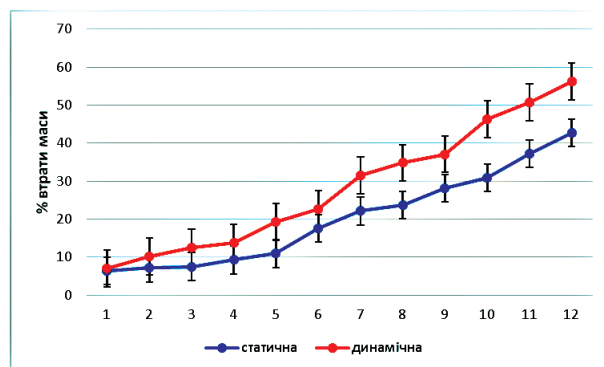


Рис. 3. Динаміка втрати маси (у відсотках) в розчині SBF нановолокнистими мембранами, які виготовлені за технологією NM3D®

Експеримент з первинними дермальними фібробластами продемонстрував задовільний проліферативний профіль для обох мембран (рис. 4). Через добу спостерігається адекватна адгезія клітин на поверхні зразків та їх проліферація до 7-ї доби спостереження. На кінцевий термін показники редукції становлять $89,3 \pm 3,9\%$

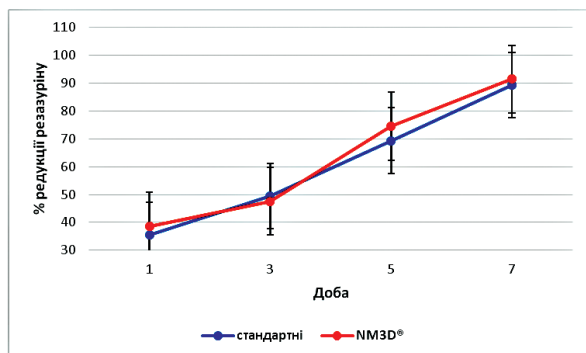


Рис. 4. Динаміка редукції резазурину після культивування первинних дермальних фібробластів на поверхні нановолокнистих мембран

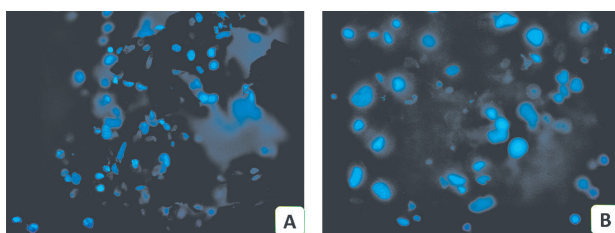


Рис. 5. Флуоресцентне забарвлення DAPI дермальних фібробластів на поверхні PLA мембран, виготовлених за традиційною технологією електропрядіння (A) та за технологією NM3D® (B)

та $91,5 \pm 5,2\%$ відповідно для мембран, які виготовлені за традиційною технологією та технологією NM3D®.

Флуоресцентне забарвлення DAPI клітин на 7-й день культивування показало рівномірний розподіл фібробластів на поверхні зразків. Дослідження не показало наявності патологічних фенотипів клітин та різниці між мембранами, виготовленими за різними технологіями (рис. 5).

Висновки. Таким чином, використання технології електропрядіння дозволяє створити нановолокнисті мембрани, які здатні до біодеградації і мають задовільний профіль токсичності. Динамічна система деградації призводить до зростання втрати маси мембранами через видалення продуктів деградації. Отримані дані свідчать

Відомості про автора

Гапченко Андрій Валерійович – молодший науковий співробітник Центру Біомедичних Досліджень Медичного інституту Сумського державного університету, м. Суми, Україна.

Сведения об авторе

Гапченко Андрей Валерьевич – младший научный сотрудник Центра Биомедицинских Исследований Медицинского института Сумского государственного университета, г. Сумы, Украина.

Information about the author

Harchenko Andrii – junior researcher, Biomedical Research Center, Sumy State University, Medical Institute, Sumy, Ukraine.

про можливість використання матеріалів на основі PLA для розробки конструкцій для тканинної інженерії.

Список літератури

1. Ceccarelli G, Presta R, Benedetti L, Cusella De Angelis MG, Lupi SM, Rodriguez Y Baena R. Emerging perspectives in scaffold for tissue engineering in oral surgery. *Stem Cells Int.* 2017;2017:4585401. DOI: 10.1155/2017/4585401.
2. Hosseinpour S, Ghazizadeh Ahsaie M, Rezai Rad M, Baghani MT, Motamedian SR, Khojasteh A. Application of selected scaffolds for bone tissue engineering: a systematic review. *Oral Maxillofac Surg.* 2017;21(2):109-29. DOI: 10.1007/s10006-017-0608-3.
3. Bracaglia LG, Smith BT, Watson E, Arumugasaamy N, Mikos AG, Fisher JP. 3D Printing for the design and fabrication of polymer-based gradient scaffolds. *Acta Biomater.* 2017;56:3-13. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.03.030.
4. Lasprilla AJ, Martinez GA, Lunelli BH, Jardini AL, Filho RM. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices – A review. *Biotechnol Adv.* 2012;30(1):321-8. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.06.019.
5. Martino VP, Jiménez A, Ruseckaite RA. Processing and characterization of poly(lactic acid) films plasticized with commercial adipates. *Journal of Applied Polymer Science.* 2009;112(4):2010-18.
6. Thellen C, Orroth C, Froio D, Ziegler D, Lucciarini J, Farrell R, et al. Influence of montmorillonite layered silicate on plasticized poly(L-lactide) blown films. *Polymer.* 2005;46(25):11716-27.
7. Lunt J. Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. *Polymer Degradation and Stability.* 1998;59:145-52.
8. Serra T, Ortiz-Hernandez M, Engel E, Planell J, Navarro M. Relevance of PEG in PLA-based blends for tissue engineering 3D-printed scaffolds. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014;38:55-62. DOI: 10.1016/j.msec.2014.01.003.
9. Vert M. After soft tissues, bone, drug delivery and packaging, PLA aims at blood. *European Polymer Journal.* 2015;68:516-25.
10. Lasprilla AJ, Martinez GA, Lunelli BH, Jardini AL, Filho RM. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices – A review. *Biotechnol Adv.* 2012;30(1):321-8. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.06.019.
11. Shalumon KT, Binulal NS, Selvamurugan N, Nair SV, Menon D, Furuie T. Electrospinning of carboxymethyl chitin/poly(vinyl alcohol) nanofibrous scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers.* 2009;77:863-69.
12. Klossner RR, Queen HA, Coughlin AJ, Krause WE. Correlation of Chitosan's rheological properties and its ability to electrospin. *Biomacromolecules.* 2008;9(10):2947-53. DOI: 10.1021/bm800738u.

Надійшла до редакції 26.01.2021
Рецензент — проф. Кривецький В.В.
© А.В. Гапченко, 2021