

Формирование биоактивных высокопористых полимерных матриц для тканевой инженерии

С. Э. Богородский, В. Н. Василец, Л. И. Кротова, С. А. Минаева,
А. В. Миронов, Е. А. Немец, В. А. Сургученко,
В. К. Попов, В. И. Севастьянов

Проведено исследование процессов формирования высокопористых (60 – 90 об. %) биоактивных матриц на основе полилактидов и гепарина (Гп) в атмосфере сверхкритического диоксида углерода (ск-СО₂) и их последующей гидрофилизации при обработке плазмой диэлектрического барьерного разряда в присутствии кислорода. Методом спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) с пространственным разрешением показана высокая однородность распределения Гп по объему полученных образцов. С помощью спектрофотометрии изучена кинетика его высвобождения из полимерных матриц в дистиллированной воде. Показано, что, начиная со вторых и вплоть до 15-х суток эксперимента, наблюдается практически линейный рост концентрации Гп в растворе. Проведено сравнительное исследование цитотоксичности и матричных свойств чисто полимерных и гепаринсодержащих образцов в условиях *in vitro* на культуре фибробластов мышей линии NIH 3T3. Обнаружено положительное влияние диспергированного в полилактидных матрицах Гп на процессы адгезии и пролиферации клеток.

Ключевые слова: пористые полимерные матрицы, гепарин, тканевая инженерия, сверхкритический диоксид углерода.

The processes of highly porous (60-90 vol.%) bioactive heparin-containing polylactic scaffolds fabrication in supercritical carbon dioxide followed by their hydrophilization by dielectric barrier discharge plasma treatment at the atmosphere have been studied. Homogeneous distribution of heparin along the polymer volume was demonstrated by spatial resolution Raman spectroscopy. Heparin release kinetics from the scaffolds in distilled water has been studied by spectrophotometry. Virtually linear increase of heparin concentration in solution was shown from the second till 15th day of experiments. Comparative study of cytotoxicity and matrix properties of pure polymer and heparin-containing scaffolds using NIH 3T3 mice fibroblast cultures *in vitro* demonstrated positive effect of heparin distribution along the polylactic scaffolds both on cell adhesion and proliferation.

Keywords: porous polymer scaffolds, heparin, tissue engineering, supercritical carbon dioxide.

Введение

Полимерные матричные структуры, содержащие биологически активные соединения, являются сегодня одними из ключевых элементов современной тканевой инженерии [1, 2]. Они являются основой биоискусственных систем, представляющих собой сочетание биостабильных или биodeградируемых матриц из материалов различной природы и биологических структур (биоактивных молекул, факторов роста, белков плазмы крови, функционирующих клеток). Эти системы предназначены для временной или постоянной замены функций повреж-

денных тканей. Основной целью их использования в регенеративной медицине является восстановление требуемых типов тканей (а, в конечном счете, и органов) из клеток, которые могут быть выделены из эндогенных источников пациента (аутологичные клетки) или доноров (аллогенные клетки) [3 – 5].

Успех создания конкретных биоискусственных систем (или тканеинженерных конструкций (ТИК)) для замещения дефектов или восстановления определенных типов живых тканей во многом обусловлен наличием соответствующих синтетических матриц, обладающих необходимыми физико-химическими и биологическими свойствами

(механической прочностью, эластичностью, биосовместимостью на белковом и клеточном уровнях, биodeградируемостью и пористостью, влияющими на способность поддерживать прикрепление, рост, пролиферацию и дифференцировку клеток и др.).

В качестве основных материалов для разработки таких матриц сегодня широко используют biodeградируемые полимеры природного (альгинаты, коллаген, желатин, хитозан, спидроин, фиброины шелка, полиоксибутираты и их сополимеры) и синтетического (главным образом, гомо- и сополимеры молочной и гликолевой кислот) происхождения [2, 6 – 11]. Промежуточными продуктами biodeструкции таких материалов могут быть вещества, включаемые в метаболизм клеток, например, моносахара, молочная, гликолевая и β -оксимасляная кислоты. Продуктами полной деградации этих полимеров, как правило, являются углекислый газ и вода.

Сополимеры молочной и гликолевой кислот — полилактогликолиды (ПЛГ), являются одними из первых синтетических биорезорбируемых полимеров, разрешенными для клинического применения еще более 40 лет назад [12]. Их гидролитическая нестабильность сначала послужила основой для широкого использования этих полимеров гомологического ряда алифатических полиэфиров в производстве биорезорбируемых хирургических шовных нитей, а в дальнейшем и к изготовлению из них биорезорбируемых фиксационных пластин, крепежных винтов, капсул для лекарственных препаратов пролонгированного действия и, наконец, матриц для ТИК [13 – 15].

Одной из важнейших характеристик матрикса для ТИК является его пористость [16]. Структура системы взаимосвязанных пор (при общей объемной пористости от 50 до 90 %) и их размеры (от нескольких десятков до сотен микрометров) должны обеспечивать прорастание клеток и кровеносных сосудов вглубь матрикса, а также беспрепятственную доставку необходимых питательных веществ клеткам и свободное удаление продуктов их жизнедеятельности.

Существующие сегодня разнообразные методы изготовления таких полиэфирных матриц (нетканое связывание полимерных нитей [17], выщелачивание [18], фазовое разделение [19], электроспinning [20] и целый ряд других), как правило, основаны либо на использовании органических растворителей (ацетон, хлорид метилена и др.) с последующими весьма дорогостоящими и не всегда эффективными процедурами удаления их следов, либо на высокотемпературных процессах (100°C и выше). Это может, с одной стороны, приводить к повышению цитотоксичности конечных продуктов,

а с другой — ограничивать использование практически важных для биомедицинских применений термо- или химически лабильных биоактивных субстанций и материалов.

Одним из возможных вариантов решения этих проблем является использование ск-СО₂ как для формирования пористых полимерных матриц заданной формы и структуры [21, 22], так и внедрения в их состав различных биоактивных компонентов [23].

Методически “сухие” (без применения органических растворителей) и низкотемпературные (35 – 40 °C) технологии формирования пористых биоактивных полимерных композитов базируются на использовании ск-СО₂ одновременно в качестве реакционной и транспортной среды. В сверхкритическом состоянии ($T_{кр} = 31\text{ °C}$, $P_{кр} = 7,4\text{ МПа}$) диоксид углерода может эффективно пластифицировать аморфные и частично-кристаллические полимеры [24], а также растворять различные (главным образом, неполярные) органические вещества. Это существенно облегчает (вследствие снижения вязкости полимеров) процесс формирования однородно наполненных (растворимыми в ск-СО₂ или просто мелкодисперсными) биоактивными компонентами полимерных систем за счет их чисто механического, либо ультразвукового перемешивания. После образования пластифицированной в ск-СО₂ биополимерной композиции, она может быть инжестирована в пресс-форму высокого давления требуемой конфигурации для получения биоактивных матриц с развитой системой связанных пор [25].

Одним из перспективных методов повышения адгезионных свойств поверхности гидрофобных полиэфирных матриц по отношению к культивируемым на них клеткам является обработка плазмой диэлектрического барьерного разряда в присутствии кислорода [26]. В этом процессе реакционно-способные кислородсодержащие компоненты (озон, О и ОН[•]) проникают внутрь пористого матрикса и образуют карбоксильные и другие полярные группы, приводящие к увеличению его поверхностной энергии и, как следствие, к гидрофилизации его поверхности.

Биосовместимость и биоактивность таких синтетических матриц могут быть существенно повышены за счет наличия в их структуре Гп. Гп, являясь естественным антикоагулянтом крови, в иммобилизованном состоянии может имитировать свойства, характерные для внутренней поверхности кровеносных сосудов [27]. Его способность активно взаимодействовать с широким спектром биоактивных молекул в организме позволяет также имитировать и свойства естественного внеклеточного матрикса,

стимулируя инфильтрацию клеток в объем пористых структур. Поэтому наличие Гп в полимерном матриксе способствует повышению адгезии и интенсификации пролиферации клеток в процессе их культивирования на поверхности материалов и изделий, предназначенных для тканевой инженерии [28]. Кроме того, присутствие Гп в достаточной концентрации (более 0,1 мг/мл) стимулирует дифференцировку мезенхимальных клеток-предшественников костного мозга в адипогенном направлении [29]. Однако для реальных клинических применений важно также иметь в виду, что передозировка Гп может вызвать кровотечение, гепарин-индуцированную тромбоцитопению, нарушение метаболизма липидов и т.д. [30]. Избежать или уменьшить эти отрицательные последствия возможно за счет снижения концентрации Гп в кровотоке с помощью создания и применения его пролонгированной формы, роль которой и может, на наш взгляд, выполнять биорезорбируемый полимерный матрикс.

Как правило, Гп вводят в состав гидрогелевых ТИК, обеспечивающих его выделение при контакте с жидкой фазой [27]. Однако скорость выделения Гп из гидрогелей в водной среде слишком высока и плохо поддается регулированию. Вместе с тем попытки его введения в объем гидрофобных полимеров традиционными жидкостными методами затруднен, так как Гп практически не растворим ни в одном из органических растворителей, применяемых при формировании медицинских изделий из биосовместимых полимеров.

Таким образом, основными недостатками известных подходов к созданию пролонгированных форм Гп с использованием полимерных матриксов являются: низкая конечная емкость по Гп, а также необходимость использования токсичных растворителей или высоких температур, приводящих к резкому снижению биологической активности иммобилизованного или диспергированного Гп.

Цель настоящей работы — исследование процессов формирования высокопористых (60 – 90 об. %) биоактивных матриксов на основе полилактида и Гп в атмосфере ск-СО₂ и их последующей гидрофилизации плазмой диэлектрического барьерного разряда в присутствии кислорода с последующим анализом их цитотоксичности и матриксных свойств *in vitro* с использованием культур фибробластов мышей линии NIH 3T3.

Материалы и методы

В качестве исходных материалов в работе использовали аморфные D,L-полилактиды марки

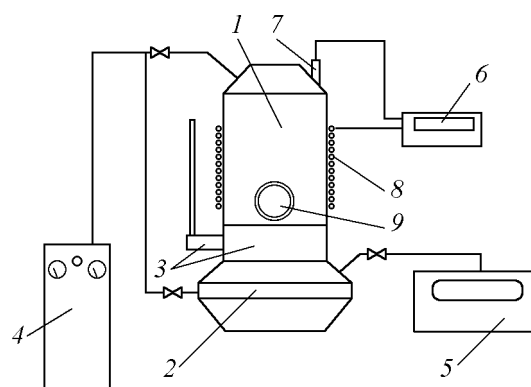


Рис. 1. Схема экспериментальной установки для получения биоактивных полимерных матриксов: 1 — реакционная камера; 2 — ресивер; 3 — выпускное устройство с шаровым клапаном; 4 — насос высокого давления CO₂; 5 — автоматический регулятор давления; 6 — блок управления нагревателем; 7 — термopар; 8 — резистивный нагреватель; 9 — сапфировое окно для визуальных наблюдений.

PURASORB PDL02 и PDL04 (приведенная вязкость 0,2 и 0,4 дл/г, $M_w \approx 13200$ и $M_w \approx 28500$, соответственно) производства компании PURAC Biochem bv (Нидерланды), Гп (Sigma, H4784) и диоксид углерода (марка ОСЧ, ГОСТ 8050-85) производства Балашихинского кислородного завода (г. Балашиха, Московская обл.).

Исследование процесса формирования высокопористых биоактивных полимерных матриксов при инъекции пластифицированной в ск-СО₂ композиции с гепарином через импульсное сопло в пресс-формы требуемой конфигурации, находящиеся при повышенном давлении диоксида углерода проводили на экспериментальной установке (рис. 1). Основные элементы установки: реакционная камера 1 из нержавеющей стали с внутренним объемом ~ 100 см³, инъекционная система 3 (на основе шарового клапана со сменными соплами из полиэфирэфиркетона и капролона (полиамид 6) с выходными диаметрами от 125 до 1000 мкм) и приёмное устройство (ресивер) 2 с пресс-формами для вспенивания и отверждения полимерной композиции. Интенсивное перемешивание и дополнительное размягчение пластифицированной в ск-СО₂ полимерной массы в камере 1 обеспечивали титановым индуктором, приводившимся в действие мощным (2 кВт) магнитно-стрикционным генератором ультразвуковых колебаний на частоте $20 \pm 2,0$ кГц. Реакционная камера, предназначенная для работы при давлениях диоксида углерода до 30 МПа, была снабжена двумя сапфировыми окнами 9, позволяющими вести визуальный контроль происходящих внутри нее процессов. Для герметизации камеры использовали байонетный зажим, обеспе-

чивающий возможность легкой и быстрой загрузки и выгрузки обрабатываемых в ней полимеров.

В качестве ресивера 2 для инъекции пластифицированной смеси в атмосферу диоксида углерода при давлении до 10 МПа использовали камеру из нержавеющей стали закрытого типа с буферным объемом $\sim 100 \text{ см}^3$, обеспечивавшим демпфирование резких скачков давления CO_2 при заполнении пластифицированным полимером цилиндрических (диаметр — от 5 до 20 мм, длина — от 50 до 100 мм) пресс-форм из политетрафторэтилена.

Для достижения высокой воспроизводимости процесса формирования полимерных матриц при наработке серий их экспериментальных образцов была разработана и использована система автоматизированного контроля и управления всеми значимыми параметрами (температура, давление, интервал и время открытия/закрытия шарового клапана). Постоянство давления (вплоть до предельных 30 МПа) в реакционной камере во всех режимах работы установки обеспечивалось высокопроизводительным насосом высокого давления марки P-200 (Thar Technologies, США) в автоматическом режиме. Для поддержания постоянного градиента давления между автоклавом и приемной камерой закрытого типа, к ее выходу был подключен автоматический регулятор давления ABPR (Thar Technologies, США) с обогреваемым клапаном. Этот же регулятор обеспечивал регулировку скорости сброса давления из приемной камеры при вспенивании пластифицированной полимерной композиции. Дополнительно система контроля давления включает в себя цифровые датчики давления и пропорционально-интегрально дифференциальные (ПИД) регуляторы (ОВЕН ТРМ 101, Россия) для трех зон: давление в магистрали CO_2 , давление в реакционной и приемной камерах. Постоянство температурного поля (в интервале от 20 до 90 °C) в реакционной камере и рабочей зоне пресс-форм обеспечивалось трёхзонной электронной системой термоконтроля. Каждую зону регулировали отдельным блоком управления (Eurotherm 2216), включавшим в себя термодатчик и терморезистивный нагревательный элемент.

Эксперименты по получению композитных биоактивных матриц проводили согласно следующему алгоритму. Определенное количество (от 5,0 до 100,0 мг) мелкодисперсного Гп (частицы размером 20 – 50 мкм) предварительно растворяли в 0,5 мл дистиллированной воды и полученным раствором равномерно смачивали 0,5 – 2,0 г порошков (средний размер частиц $\approx 200 \text{ мкм}$) PDL02 или PDL04 (или их смесей). После сушки полученной массы на воздухе в течение 24 ч при 20 °C ее загружали в камеру

высокого давления. Затем камеру уплотняли, продували и заполняли диоксидом углерода до давления 5 МПа. После этого включали терморезистивный нагреватель и температуру камеры доводили до 40 °C. По мере разогрева давление в ней постепенно увеличивали, а после достижения 40 °C его окончательно доводили до 10 МПа. При этом происходила полная пластификация полилактида (за счет снижения его температуры стеклования T_g). Всю систему выдерживали при этих условиях в течение 100 мин. Затем на 20 мин включали ультразвуковой генератор, обеспечивавший перемещение торца титанового цилиндрического индуктора до 100 мкм, находящегося в непосредственной близости ($\sim 20 \text{ мм}$) от поверхности пластифицированного полимера. После этого открывали шаровой клапан системы инъекции и осуществляли импульсный выпуск полимера в пресс-форму приемной камеры 2 в атмосферу диоксида углерода повышенного (до 6 МПа) давления через сопло определенного диаметра. В процессе сброса давления происходило “вспенивание” и отверждение пластифицированной массы уже внутри пресс-формы. По завершению процесса инъекции, образец выдерживали в пресс-форме при этом давлении в течение 30 мин, а затем проводили плавный (в течение 15 мин) сброс давления CO_2 до атмосферного значения и окончательную разгерметизацию ресивера. После этого полученные образцы выдерживали в атмосферных условиях в течение 3 ч и затем их окончательно извлекали из пресс-форм.

Для дальнейшего анализа полученных матриц их нарезали на диски толщиной 2 мм. Пористость образцов определяли по формуле $\Delta = 1 - m/m_0$, где m — масса пористого образца, а m_0 — масса монолитного (исходного) полимера равного объема плотностью $\rho = 1,21 \text{ г/см}^3$.

Изучение морфологии поверхности и внутренней структуры полученных образцов проводили методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на микроскопе LEO 1450 (Карл Цейс, Германия). Анализ спектров КР исходных полилактида и Гп, а также распределения последнего по поверхности и объему композитных матриц, проводили с помощью дисперсионного КР-спектрометра Almega XR (Thermo Scientific, США) с лазерным возбуждением на длине волны 785 нм мощностью 4 мВт и размером фокального пятна 3 мкм.

Для определения количества Гп, выделяющегося из полиэфириных матриц в дистиллированную воду при 37 °C использовали спектрофотометрический метод регистрации сдвига максимума поглощения толлуидинового синего (ТС), происходящий в результате связывания красителя с заряженными

ионогенными группами (сульфо- и карбоксильными) Гп. Спектральный сдвиг полос поглощения составлял порядка 110 нм (λ раствора ТС — 640 нм, а комплекса красителя с Гп — 530 нм) с их незначительным перекрытием.

При избытке красителя толлуидинового синего процесс образования комплекса ТС – Гп идет до полного насыщения им молекулы антикоагулянта. Для количественного определения концентрации Гп в растворе использовали принцип построения калибровочных прямых, линейных в области низких концентраций антикоагулянта (0,02 – 0,2 мг/мл). Полученные калибровочные прямые по оптической плотности раствора на длине волны $\lambda = 640$ нм позволяли определить концентрацию Гп в водных растворах независимо от его биологической активности.

Экспериментальные образцы полилактидных матриц, содержащих Гп, инкубировали в дистиллированной воде при 37 °С в статическом режиме. Через выбранные промежутки времени дистиллированную воду удаляли для последующего анализа количества выделившегося Гп и заменяли ее новой порцией. Результаты каждого последующего измерения складывали с предыдущей суммой.

Перед измерениями исследуемые образцы в течение 5 мин тщательно отмывали в физиологическом растворе для удаления молекул Гп, слабо связанных с поверхностью матрикса и обуславливающих первый мощный выброс Гп. Его выведение за рамки расчета позволяло четче фиксировать динамику выделения Гп, иммобилизованного в объеме полимерного матрикса.

Эксперименты по гидрофилизации поверхности полученных полиэфирных матриц диэлектрическим барьерным разрядом (ДБР) проводили с использованием двухэлектродного высоковольтного источника импульсного напряжения (амплитудой импульса 15 кВ, длительностью 5 мкс с частотой следования 1 кГц). Высоковольтный электрод был покрыт слоем диэлектрика (кварца), в то время как другой, заземленный электрод, представлял собой металлическую пластину. Зазор между электродами (где размещался обрабатываемый образец) составлял 2 – 4 мм. ДБР обработка полимерных матриц производилась на открытом воздухе при атмосферном давлении и температуре 20 °С в течение от 30 до 300 с.

Для анализа цитотоксичности полученных образцов *in vitro* использовали культуры фибробластов мышей линии NIH 3T3, полученные из коллекции перевиваемых соматических клеток позвоночных ГУ НИИ вирусологии им. Д. И. Иванковского РАМН. В качестве реактивов применяли полную ростовую среду (PPC): культуральная среда DMEM (без

глутамина, с феноловым красным, ПанЭко, Россия); сыворотка эмбриональная телячья, стерильная, тестируемая на цитотоксичность и отсутствие микоплазмы 10% (HyClone®, HyClone UK Ltd); гентамицин 50 мкг/мл (ФГУП “НПО Микроген”, Россия); L-Глутамин 2 мМ (ПанЭко, Россия); NEPER 1 мМ (ПанЭко, Россия); раствор Версена (ПанЭко, Россия). А также раствор трипсина 0,25% (ПанЭко, Россия), раствор Дюльбекко без фенолового красного (DPBS, ПанЭко, Россия) и раствор витального красителя трипанового синего 0,1% (разведение 0,9% раствором NaCl).

В асептических условиях клетки высевали в культуральные плоскодонные 24-луночные планшеты (Corning-Costar, США) и инкубировали 24 ± 2 ч при температуре 37 °С в стандартных условиях (влажная атмосфера, содержащая 5 ± 1 % CO_2) до образования 80 ± 10 % монослоя, на поверхность которого помещали образцы исследуемых матриц. Непосредственно перед этим образцы стерилизовали гамма-излучением с интегральной дозой 1,5 Мрад и затем инкубировали в PPC в течение 24 ч. Морфологию и лизис клеток под образцами оценивали через 24 ± 2 ч их инкубации. Уровень конфлюэнтности монослоя оценивали с помощью бинокулярного инвертированного микроскопа Биолам П-1 (Россия). Положительным контролем был стандартный раствор цинка в азотной кислоте (Zn — 1 – 2 масс.%, HNO_3 , разведение 1:200 раствором 0,9 % NaCl для инъекций), а отрицательным — культуральная среда DMEM, не содержащая сыворотку.

На культуре фибробластов мышей линии NIH 3T3 исследовали также матричные свойства (то есть их способность поддерживать прикрепление и пролиферацию клеток) полученных образцов *in vitro*. Для этого в асептических условиях 20 мкл суспензии, содержащей $1 \cdot 10^5$ фибробластов, наносили на поверхность предварительно проинкубированных в PPC пористых полимерных дисков с последующей их инкубацией в течение 2 ч при температуре 37 °С в стандартных условиях, давая клеткам возможность проникнуть внутрь пор и прикрепиться, после чего помещали образцы в микропробирки, содержащие PPC.

Через 24, 48, 72 и 96 ч инкубации образцов в микропробирках в стандартных условиях оценивали метаболическую активность клеток, добавляя по 10 об.% витального реагента prestoBlue® (Invitrogen™, USA). Изменение поглощения среды регистрировали с помощью комбинированного ридера для микропланшет Synergy™2, модель SLFPA (Bio Tec Instruments Inc., USA) на длинах волн 570 и 600 нм. В качестве контроля использовали PPC без клеток с

добавлением 10 об.% prestoBlue®. Обработку полученных данных проводили с помощью программы Microplate data collection & Analysis software Gen5™.

Результаты и их обсуждение

В ходе нашей предшествующей работы [25] было установлено, что перепад давления суб- или ск- CO_2 между реакционной и приемной камерами величиной всего 2 МПа уже может обеспечивать режим стабильной инъекции пластифицированных алифатических полиэфиров в цилиндрические пресс-формы. Наряду с этим, было обнаружено, что высокопористые (более 90 об.%) полилактидные (PDL02 и PDL04) матрицы (рис. 2а) полученные инъекцией их СКФ пластифицированной массы в пресс-формы подвержены явлению объемной контракции — изменению физических размеров в процессе их инкубации в фосфатно-солевом буфере (рН = 7,4) при 37 °С на фоне неизменного веса исследуемых образцов. Уже после 5 ч инкубации эти матрицы теряют до половины исходного объема. Процесс их контракции завершается к исходу первой недели инкубации. При этом объем матрикса из PDL04 падает в несколько меньшей степени, по сравнению с образцами, изготовленными из PDL02 с меньшей молекулярной массой (приблизительно в 6 и 8 раз, соответственно, рис. 2б).

Важно отметить, что не только физические размеры, но и топология поверхности этих полилактидных матриц претерпевали значительные изменения в результате их инкубации в фосфатно-солевом буфере.

Так, если стадия ранней, наиболее активной контракции (5 ч, уменьшение объема около 50%) слабо сказывалась на изменении микрорельефа поверхности исследуемых образцов, то на более

поздних стадиях наблюдали его сглаживание с прогрессирующим во времени исчезновением сначала микро-, а затем и макропор. Такие изменения способны оказать неблагоприятное влияние на процессы культивирования клеток, поскольку именно наличие системы взаимосвязанных пор является непременным условием их успешной реализации на поверхности трехмерных пористых матриц.

С целью подавления этого неблагоприятного эффекта, во всех дальнейших экспериментах были использованы матрицы средней пористостью 60 – 80 об.%, полученные в режиме инъекции СКФ пластифицированных полиэфирных смесей PDL02/PDL04 в соотношении 1:1, а также чистого PDL04, импрегнированных Гп с концентрацией от 0,5 до 5,0 масс.% в цилиндрические пресс-формы, находящиеся в атмосфере диоксида углерода при температурах и давлениях варьировавшихся в диапазонах от 20 до 40 °С и от 4 до 8 МПа, соответственно. Эти образцы в значительно меньшей степени были подвержены объемной контракции и, что особенно важно, изменению топологии их поверхности и внутренней структуры. Так матрицы из полилактида PLD04 и смеси PLD02:PLD04 в соотношении 1:1 за 5 ч инкубации в буферном растворе теряли лишь 10 и 15 об.%, соответственно. Интегральная объемная контракция этих матриц в процессе их инкубации в фосфатно-солевом буфере при 37 °С к концу седьмых суток не превышала 50%.

На рис. 3 представлены характерный вид и микроструктура среза образца матрикса средней пористостью 80 об. % из смеси PDL02/PDL04 с 0,5 масс.% Гп, полученного при температуре 40°С, давлении диоксида углерода в реакционной камере и ресивере 6,0 и 4,0 МПа, соответственно, и использовании сопла диаметром 300 мкм. На рис. 3а хорошо виден радиальный градиент плотности образца

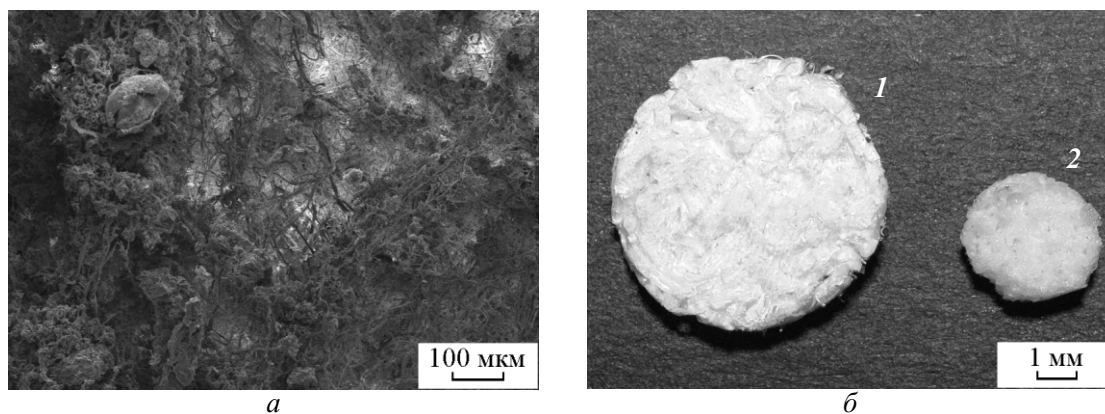


Рис. 2. СЭМ внутренней структуры высокопористого (96 об.%) матрикса из PDL02 (а), б — сравнительная фотография его внешнего вида до (1) и после 7 дней (2) выдержки в фосфатно-солевом буфере.

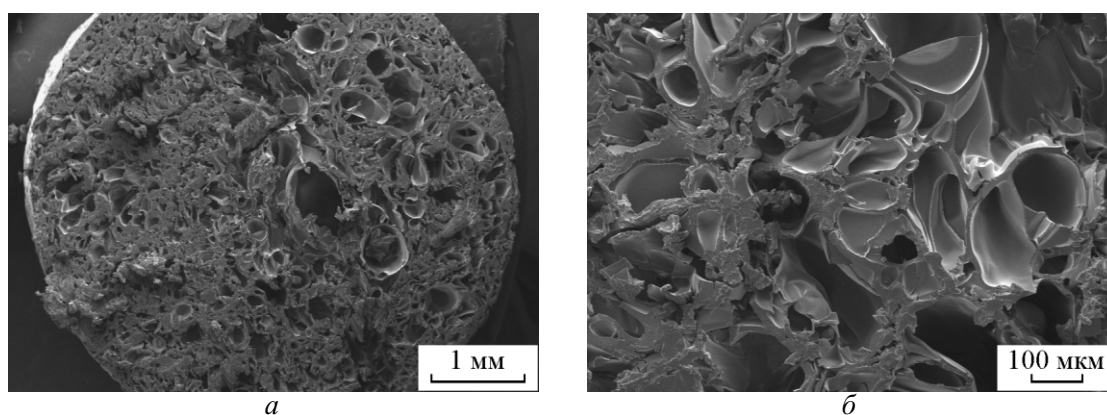


Рис. 3. СЭМ структуры высокопористого 80 ± 5 об.% биоактивного полиэфирного матрикса.

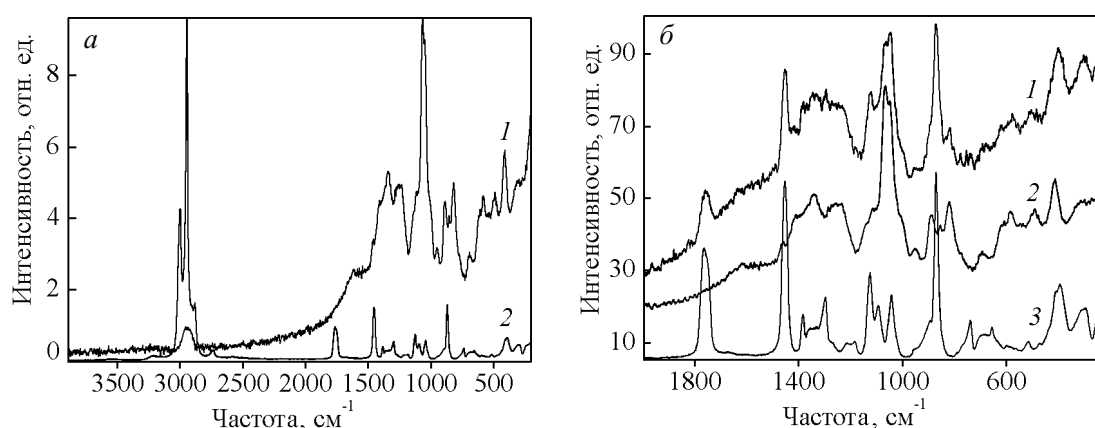


Рис. 4. *a* — КР-спектр Гп (1) и полилактида (2) в диапазоне $100 - 4000 \text{ см}^{-1}$, *б* — КР-спектр композитного матрикса (1), Гп (2) и полимера (3) в выбранном для анализа диапазоне $300 - 2000 \text{ см}^{-1}$.

(связанный с особенностью выхода диоксида углерода из цилиндрической пресс-формы), ограниченного газонепроницаемыми тефлоновыми стенками. Более пористая центральная область образуется за счёт коаксиального потока выходящего газа. Следует отметить, что подобная неравномерность обратно-пропорционально связана с вязкостью СКФ пластифицированной смеси. Увеличение вязкости ведёт к снижению неравномерности радиального градиента плотности формируемого матрикса.

Методом КР-спектроскопии с пространственным разрешением (микро-КР спектроскопии) были получены спектры исходных (порошкообразных) полилактида и Гп, а также их смесей (рис. 4а). Были определены характеристические полосы Гп (810 , 1100 и 1380 см^{-1}), которые не перекрывались с полосами КР полилактида. Эти полосы использовали нами для проведения дальнейшего анализа полученных образцов спектральными методами (рис. 4б).

Результаты микро-КР спектроскопического анализа, полученные при сканировании зондирующего

лазерного излучения с пространственным разрешением порядка 3 мкм по поверхности срезов полученных композитных образцов, продемонстрировали высокую (отклонение от средней по объёму концентрации $\pm 20\%$) однородность распределения Гп по структуре полилактидных матриксов.

Изучение кинетики высвобождения Гп из полиэфирных матриксов в дистиллированную воду при 37°C проводили согласно спектрофотометрической методике.

В случае матриксов с высоким содержанием Гп ($5,0 \pm 0,1 \text{ мкг/мг}$) первый выброс Гп составлял более трети от его общего количества, выделяемого этими образцами ($(1,7 - 2,0) \pm 0,1 \text{ мкг}$ гепарина на мг матрикса). Полилактидные матриксы с относительно низким содержанием Гп ($0,50 \pm 0,01 \text{ мкг/мг}$) демонстрировали незначительный первый выброс Гп ($0,05 \pm 0,01 \text{ мкг/мг}$) на фоне длительного (до 15 суток) периода стабильного, практически линейно нарастающего выделения антикоагулянта. При этом суммарная концентрация выделяемого Гп к мо-



Рис. 5. Капля дистиллированной воды на поверхности необработанного (а) и обработанного ДБР в течение 180 с образца из PLD 04 (б).

менту завершения эксперимента составляла $0,35 \pm 0,05$ мкг/мг.

С целью повышения гидрофильности полученных полиэфирных матрицков (а, следовательно, и повышения их биосовместимости) нами был исследован процесс их обработки ДБР, активными окислительными компонентами которого является не только УФ излучение, но и заряженные частицы (электроны, ионы), а также озон и атомарный кислород. Обработка полилактидных матрицков ДБР на протяжении 30 и 60 с не приводила к их заметной гидрофилизации. Однако увеличение времени воздействия разряда до 180 с позволяло достигнуть желаемого результата как в случае матрицков из PLD 02/PDL04, так и матрицков из чистого PLD 04 (рис. 5). Капля дистиллированной воды объемом 20 мкл практически полностью растекалась по их поверхности (рис. 5б). К сожалению, в силу высокой пористости и неоднородности поверхности полилактидных матрицков количественная оценка изменения поверхностной энергии и гидрофильности материала по контактному углу смачивания не представлялась возможной. Дальнейшее увеличение времени обработки полимерных образцов ДБР до 300 с уже вызывало частичную деструкцию матрицков, проявлявшуюся в нарушении их пространственной структуры.

Таким образом, использование плазмы ДБР позволяет существенно улучшить гидрофильные свойства поверхности полиэфирных образцов, что необходимо для их нормального функционирования в качестве клеточного матрикса и повышения их смачиваемости и совместимости с различными биоактивными веществами.

При обработке образцов плазмой ДБР может происходить частичная деструкция полимера с возможным образованием токсичных продуктов. Это может неблагоприятно сказываться на биосовместимости по-

лученных матрицков. В связи с этим были проведены эксперименты по оценке цитотоксичности полилактидных матрицков (как чистых, так и содержащих гепарин) до и после их плазменной обработки.

Анализ цитотоксичности этих образцов *in vitro* проводили на культурах фибробластов мыши линии NIH 3T3.

В качестве критерия оценки цитотоксичности был выбран метод витальной окраски. Для этого через 24 ± 2 ч инкубации образцов из лунок удаляли содержимое и промывали раствором Дюльбекко. В каждую лунку добавляли 0,1 % раствор витального красителя трипанового синего. Трипановый синий окрашивает лизированные клетки и/или клетки с поврежденными клеточными мембранами. Через 1 – 2 мин краситель удаляли из лунок, аккуратно промывали лунки раствором Дюльбекко, после чего сразу же производили оценку культуры микроскопически на наличие морфологических изменений и/или уменьшения плотности клеток. Полученные результаты цитотоксической реакции культуры фибробластов мышей линии NIH 3T3 интерпретировали с использованием стандартной таблицы “Степень ответной реакции клеток” (ГОСТ Р ИСО 10993.5-99 “Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследование на цитотоксичность: методы *in vitro*”).

В результате проведенных экспериментов степень ответной реакции клеток на действие всех исследованных образцов была оценена как “0”, то есть никакой реакции клеток вокруг образцов и под ними отмечено не было. Положительный и отрицательный контроли действовали на культуру клеток согласно выбранному протоколу.

Таким образом, образцы как исходных, так и обработанных диэлектрическим барьерным разрядом в течение 3 мин высокопористых матрицков,

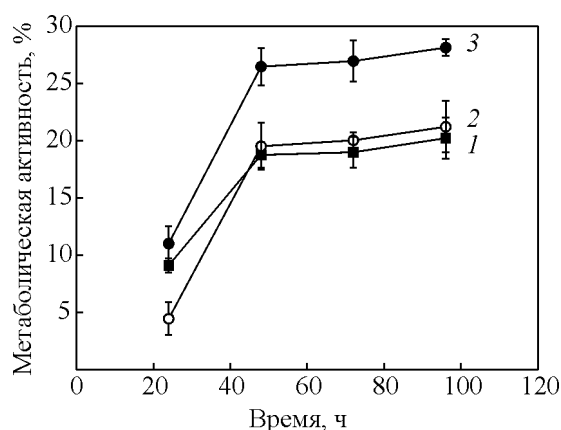


Рис. 6. Метаболическая активность фибробластов мыши линии NIH 3T3 после посева на образцы полимерных дисков, содержащих различные количества Гп: 1 — PLD04, 2 — PLD04 + 0,5 масс. % Гп, 3 — PLD04 + 5,0 масс. % Гп.

изготовленных из полилактидов PLD02 и PLD04, а также их смесей с Гп, в условиях проведенных экспериментов не оказывают цитотоксического действия на культуру фибробластов мышей линии NIH 3T3.

Метаболическую активность клеток оценивали по витальному красителю prestoBlue®, в состав которого входит индикатор окислительно-восстановительных процессов. Пролиферирующие клетки восстанавливают prestoBlue®, вследствие чего происходит изменение его цвета с индиго на розовый.

Из представленных на рис. 6 кривых видно, что через 24 ч метаболическая активность фибробластов мыши, характеризующая количество адгезировавших клеток, для контроля (образцы PDL04 без Гп), достоверно выше таковой для образцов PDL04 + 0,5 масс. % Гп и достоверно не отличается от образцов PDL04 + 5,0 масс. % Гп. Через 48 ч метаболическая активность фибробластов мыши NIH 3T3 на образце PDL04 + 0,5 масс. % Гп становится сравнима с контролем и достоверно не различается на протяжении всего периода исследования. Для образца PDL04 + 5,0 масс. % Гп, содержащего наибольшее количество Гп, метаболическая активность клеток для этого же времени инкубации существенно выше, чем у контроля. Полученные данные подтверждают данные [28] о положительном влиянии диспергированного в полилактидной матрице Гп на процессы адгезии и пролиферации клеток *in vitro*. Обнаруженный нами концентрационный эффект влияния Гп на матриксные свойства исследованных высокопористых и гидрофилизированных обработкой ДБР полилактидных матриц позволяет рассчитывать на их эффективное использование в качестве биоактивных каркасов при создании тканеинженерных конструкций.

Выводы

Разработанный нами метод инъекции СКФ пластифицированной смеси алифатических полиэфиров в пресс-формы, находящиеся в атмосфере диоксида углерода при давлении до 6 МПа, позволяет получать высокопористые (60 – 90 об.%) биоактивные матриксы на основе полилактида и Гп. Методом КР-спектроскопии с пространственным разрешением продемонстрирована высокая однородность распределения Гп по объему полученных образцов. С помощью спектрофотометрии показано, что, начиная со вторых и вплоть до 15-х суток высвобождения Гп из полимерных матриксов в дистиллированной воде, наблюдается практически линейный рост его концентрации в растворе. Обработка полученных образцов плазмой диэлектрического барьерного разряда в присутствии кислорода позволяет существенно улучшить смачиваемость их исходно гидрофобной поверхности, что необходимо для их эффективного функционирования в качестве клеточного матрикса. Анализ цитотоксичности и матричных свойств полученных образцов *in vitro*, проведенный с использованием культур фибробластов мышей линии NIH 3T3, продемонстрировал их полное соответствие требованиям, предъявляемым по этим параметрам к полимерным матриксам для тканевой инженерии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (Проект № 11-02-12185).

Литература

1. Хенч Л., Джонс Д. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей. М.: Техносфера, 2007, 304 с.
2. Биосовместимые материалы. Под ред. В.И. Севастьянова и М.П.Кирпичникова. М.: Медицинское информационное агентство, 2011, 560 с.
3. Atala A., Lanza R., Thompson J., Nerem R. Principles of regenerative medicine. Boston (MA), USA: Academic Press, 2008, 1472 p.
4. Репин В.С., Ржанинова А.А., Шаменков Д.А. Эмбриональные стволовые клетки: фундаментальная биология и медицина. М.: Реметекс, 2002, 225 с.
5. Биология стволовых клеток и клеточные технологии. Под ред. М.А. Пальцева. М.: Медицина, 2009, 728 с.
6. Bhattarai N., Gunn J., Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. Adv. Drug. Deliv. Rev., 2010, v. 62, no. 1, p. 83 – 99.
7. Lowson M.A., Barralet J.E., Wang L., Shelton R.M., Triffitt J.T. Adhesion and growth of bone marrow stromal cells on modified alginate hydrogel. Tissue Engineering, 2004, v. 10, no. 9/10, p. 1480 – 1491.

8. Перова Н.В., Порунова Ю.В., Урьяш В.Ф., Фаминская Л.А., Крашенинников М.Е., Расулов М.Ф., Онщенко Н.А., Севастьянов В.И., Шумаков В.И. Биодegradуемый коллагенсодержащий матрикс Сферогель™ для клеточной трансплантации. Перспективные материалы, 2004, № 2, с. 52 – 59.
9. Karageorgiou V., Meinel L., Hofmann S., Malhotra A., Volloch V. Bone morphogenetic protein-2 decorated silk fibroin films induce osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. J. Biomed. Mater. Res. A, 2004, v. 71, no. 3, p. 528 – 537.
10. Shih H.N., Fang J.F., Chen J.H., Yang Ch.L., Chen Y.H., Sung T.H., Shih L.Y. Reduction in experimental peridural adhesion with the use of crosslinked hyaluronate/collagen membrane. J. Biomed. Mater. Res. B, 2004, v. 71, no. 2, p. 421 – 428.
11. Vert M., Li M.S., Spenlehauer G., Guerin P. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. J. Mater. Science: Mater. Med., 1992, v. 3, p. 432 – 436.
12. Frazee E.J., Schmitt E.F. A new absorbable suture. J. Biomed. Mater. Res., 1971, v. 1, p. 43 – 58.
13. Temenoff J.S., Mikos A.G. Review: Tissue engineering for regeneration of articular cartilage. Biomaterials, 2000, v. 21, no. 5, p. 431 – 440.
14. Guarino V., Causa F., Ambrosio L. Bioactive scaffolds for bone and ligament tissue. Expert Rev. Medical Devices, 2007, v. 4, no. 3, p. 405 – 418.
15. Huttmacher D.W., Schantz J.T., Lam C.X.F., Tan K.C., Lim T.C. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. J. Tissue Eng. Regen. Med., 2007, v. 1, p. 245 – 260.
16. Karageorgiou V., Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. Biomaterials, 2005, v. 26, no. 27, p. 5474 – 5491.
17. Mooney D.J., Mazzoni C.L., Breuer C., McNamara K., Hern D., Vacanti J.P. Stabilized polyglycolic acid fibre-based tubes for tissue engineering. Biomaterials, 1996, v. 17, p. 115 – 124.
18. Mikos A.G., Temenoff J.S. Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. J. Biotechnology, 2000, v. 3, no. 2, p. 114 – 119.
19. Nam Y.S., Park T.G. Biodegradable polymeric microcellular foams by modified thermally induced phase separation method. Biomaterials, 1999, v. 20, p. 1783 – 1790.
20. Li M., Mondrinos M.J., Gandhia M.R., Kob F.K., Weiss A.S., Lelkes P.I. Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. Biomaterials, 2006, v. 27, p. 2705 – 2715.
21. Mooney D.J., Baldwin D.F., Suh N.P., Vacanti J.P., Langer R. Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. Biomaterials, 1996, v. 17, p. 1417 – 1422.
22. Попов В.К., Краснов А.П., Воложин А.И., Хоудл С.М. Новые биоактивные композиты для регенерации костных тканей. Перспективные материалы, 2004, № 4, с. 49 – 57.
23. Howdle S.M., Watson M.S., Whitaker M.J., Popov V.K., Davies M.C., Mandel F.S., Wang J.D., Shakesheff K.M. Supercritical fluid mixing: preparation of thermally sensitive polymer composites containing bioactive materials. Chem. Commun., 2001, с. 109 – 110.
24. Гумеров Ф.М., Сабирзянов А.Н., Гумерова Г.И. Суб- и сверхкритические флюиды в процессах переработки полимеров. Казань: ФЭН, 2000, 320 с.
25. Богородский С.Э., Кротова Л.И., Миронов А.В., Попов В.К., Получение высокопористых биорезорбируемых полимерных матриц с помощью сверхкритического диоксида углерода. Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика, 2013, т. 8, № 1, с. 46 – 56.
26. Plasma deposition, treatment and etching of polymers. Ed. D'Agostino R. London, Academic, 1990, 528 p.
27. Norrby K., Nordenhem A., Dalteparin, a low-molecular-weight heparin, promotes angiogenesis mediated by heparin-binding VEGF-A *in vivo*. APMIS, 2010, v. 118, p. 949 – 957.
28. Kurpinski K., Stephenson J., Janairo R.R.R., Lee H., Song Li. The effect of fiber alignment and heparin coating on cell infiltration into nanofibrous PLLA scaffolds. Biomaterials, 2010, v. 31, p. 3536 – 3542.
29. Luo W., Shitaye H., Friedman M., Bennett C.N., Miller J., MacDougald O.A., Hankenson K.D. Disruption of cell-matrix interactions by heparin enhances mesenchymal progenitor adipocyte differentiation. Exp. Cell Res., 2008, v. 314, p. 3382 – 3391.
30. Лоуренс Д.Р., Бенитт Н.Н. Клиническая фармакология. М.: Медицина, 1991, 656 с.

Статья поступила в редакцию 28.02.2013 г

Богородский Сергей Эдуардович — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем лазерных и информационных технологий (г. Москва), научный сотрудник. Специалист в области сверхкритических флюидных технологий. E-mail: bogens2@mail.ru.

Василец Виктор Николаевич — ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник. Специалист в области плазмохимии, фото- и радиационной химии полимеров, а также материалов и изделий медицинского назначения.

Кротова Лариса Ивановна — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем лазерных и информационных технологий (г. Москва), научный сотрудник. Специалист в области электронной микроскопии, спектроскопии, сверхкритических флюидных технологий. E-mail: krollar@yandex.ru.

Минаева Светлана Анатольевна — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем лазерных и информационных технологий (г. Москва), младший научный сотрудник. Специалист в области тканевой инженерии, хроматографии, спектроскопии комбинационного рассеяния. E-mail: minaeva.svetlana@gmail.com.

Миронов Антон Владимирович — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем лазерных и информационных технологий (г. Москва), научный сотрудник. Специалист в области биополимеров, сверхкритических флюидных технологий. E-mail: scflab@gmail.

Немец Евгений Абрамович — ФГБУ “ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова” Минздрава России, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий химико-технологической лабораторией АНО “Институт медико-биологических исследований и технологий”. Специалист в области химии высокомолекулярных соединений, материалов и изделий медицинского назначения, искусственных и биоискусственных органов.

Сургученко Валентина Александровна — ФГБУ “ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова” Минздрава России, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией клеточных технологий АНО “Институт медико-биологических исследований и технологий”. Специалист в области клеточной биологии, регенеративной медицины и тканеинженерных конструкций.

Попов Владимир Карпович — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем лазерных и информационных технологий (г. Москва), кандидат физико-математических наук, заведующий лабораторией. Специалист в области сверхкритических флюидных технологий, нано- и микроструктур, биофизики. E-mail: popov@laser.ru.

Севастьянов Виктор Иванович — ФГУ “ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова” Минздрава России, руководитель отдела по исследованию биоматериалов, профессор, доктор биологических наук. Специалист в области биоматериаловедения, тканевой инженерии и систем доставки лекарственных веществ.