

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ И АПИРОГЕННОСТИ БИОДЕГРАДИРУЕМОГО ПОЛИЛАКТИДНОГО МАТРИКСА

[К. В. Зайцев, О. Б. Жукова, И. А. Хлусов, А. А. Гостюхина, Н. Г. Абдулкина,
С. И. Твердохлебов, Н. П. Степаненко, А. А. Зайцев, В. А. Воробьев](#)

*ФГБУ «Сибирский федеральный научно-клинический центр Федерального
медико-биологического агентства» (ЗАО Северск)*

Исследована биологическая безопасность биodeградируемого матрикса с заданными физико-химическими характеристиками, полученного из полимолочной кислоты методом аэродинамического формирования в турбулентном газовом потоке. При проведении сравнительного анализа жизнеспособности клеток костного мозга крыс в условиях *in vitro* было доказано отсутствие цитотоксичности у тестируемого синтетического полилактидного матрикса. Согласно результатам теста исследуемый материал апирогенен.

Ключевые слова: биodeградируемые полимеры, цитотоксичность, апирогенность.

Зайцев Константин Васильевич — кандидат медицинских наук, руководитель экспериментальной лаборатории биомедицинских технологий Филиала «Томский научно-исследовательский институт курортологии и физиотерапии» ФГБУ «Сибирский федеральный научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства» (г. Томск), рабочий телефон: 8 (3822) 90-65-17, e-mail: ZaycevKV@med.tomsk.ru

Жукова Оксана Борисовна — доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник экспериментальной лаборатории биомедицинских технологий Филиала «Томский научно-исследовательский институт курортологии и физиотерапии» ФГБУ «Сибирский федеральный научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства» (г. Томск), e-mail: exper@med.tomsk.ru

Хлусов Игорь Альбертович — доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник экспериментальной лаборатории биомедицинских технологий Филиала «Томский научно-исследовательский институт курортологии и физиотерапии» ФГБУ «Сибирский федеральный научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства» (г. Томск), e-mail: khlusov63@mail.ru

Гостюхина Алена Анатольевна — научный сотрудник экспериментальной лаборатории биомедицинских технологий Филиала «Томский научно-исследовательский институт

курортологии и физиотерапии» ФГБУ «Сибирский федеральный научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства» (г. Томск), рабочий телефон: 8 (3822)90-65-17, e-mail: exper@med.tomsk.ru

Абдулкина Наталья Геннадьевна — доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе Филиала «Томский научно-исследовательский институт курортологии и физиотерапии» ФГБУ «Сибирский федеральный научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства» (г. Томск), рабочий телефон: 8 (3822) 51-53-88, e-mail: nauka@med.tomsk.ru

Твердохлебов Сергей Иванович — кандидат физико-математических наук, научный сотрудник экспериментальной лаборатории биомедицинских технологий Филиала «Томский научно-исследовательский институт курортологии и физиотерапии» ФГБУ «Сибирский федеральный научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства» (г. Томск), рабочий телефон: 8 (3822) 90-65-17, e-mail: tverd@tpu.ru

Степаненко Нина Петровна — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник экспериментальной лаборатории биомедицинских технологий Филиала «Томский научно-исследовательский институт курортологии и физиотерапии» ФГБУ «Сибирский федеральный научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства» (г. Томск), e-mail: StepanenkoNP@med.tomsk.ru

Зайцев Алексей Александрович — кандидат медицинских наук, директор Филиала «Томский научно-исследовательский институт курортологии и физиотерапии» ФГБУ «Сибирский федеральный научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства» (г. Томск), рабочий телефон: 8 (3822) 51-20-05, e-mail: niikf@med.tomsk.ru

Воробьев Виктор Александрович — генеральный директор ФГБУ «Сибирский федеральный научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства» (ЗАО Северск), рабочий телефон: 8 (3823) 54-37-03, e-mail: kb81@med.tomsk.ru

Введение. Создание новых материалов, предназначенных для контакта со средой живого организма и необходимых для реконструктивной и регенеративной медицины, является одной из ключевых проблем современной биомедицинской науки. Разнообразии физико-механических характеристик искусственных материалов и покрытий позволяет разрабатывать технологии целенаправленного воздействия на функционирование различных биологических систем [4]. С другой стороны, продукты износа имплантатов и покрытий (в частности, ионы и наночастицы) могут обладать выраженным стимулирующим или цитотоксическим действием [6].

Искусственные матрицы определяют механические свойства и форму имплантата, формируют субстрат для адгезии клеток. Кроме того, субстрат выступает в качестве депо для растворимых факторов роста, а многие субстраты содержат сигнальные последовательности, относящиеся к классу нерастворимых биологически активных веществ. Регуляторные факторы субстрата влияют на репертуар синтезируемых клетками компонентов внеклеточного матрикса, являющихся источником сигналов, определяющих функциональное состояние клетки. Таким образом, субстрат активно участвует в инструктировании клеточного морфо- и фенотипа, а также межклеточных

взаимодействий [1].

Новым направлением приложения полимеров в области регенеративной медицины является разработка трехмерных волокнистых структур (нетканых скеффолдов), имеющих высокое отношение площади поверхности к общему объему, имитирующих межклеточное волокнистое вещество различных тканей. Развиваемая концепция биосовместимых материалов позволяет на стадии их изготовления задавать точные параметры микрорельефа (шероховатость, пористость, поверхностный потенциал, элементный и фазовый составы, гидрофильность), которые предположительно могут определять вектор дифференцировки клеток [5]. Тем не менее, стандарты качества требуют многостороннего тестирования *in vitro* и *in vivo* каждого нового материала и/или изделия перед его использованием в медицине.

В связи с этим целью настоящего экспериментального исследования явилась оценка цитотоксичности и апиrogenности гибридного синтетического биодеградируемого полилактидного матрикса с заданными физико-химическими характеристиками.

Материалы и методы исследования. Для изучения цитотоксичности гибридного синтетического биодеградируемого полилактидного матрикса использовали стерильные образцы с линейными размерами 10 × 10 мм и толщиной не более 1 мм. По одному матриксу размещали в лунки 24-луночных планшетов («Orange Scientific», Бельгия) и добавляли взвесь костного мозга, свежeweделенного из бедра крысы. В контрольные лунки помещали взвесь клеток без тестируемых объектов. В каждой группе было по 5 матриксов. Конечная концентрация миелокариоцитов в лунках составила $5,0 \times 10^6$ жизнеспособных ядросодержащих клеток в 1 мл полной культуральной среды, содержащей 85 % среды DMEM/F12 («Gibco», США), 15 % инактивированной нагреванием сыворотки крови эмбрионов коров («Sigma», США), 280 мг/л L-глутамин («Sigma», США), 8 мл/л смеси пенициллин/стрептомицин («Sigma», США). Клетки культивировали в атмосфере 5 % углекислого газа в течение 1 ч при температуре 37 °C и 100 % влажности.

В клеточной взвеси рассчитывали индекс цитотоксичности через определение процента погибших (окрашенных красителем) или выживших (неокрашенных) клеток после контакта с объектом исследования. Для этого 100 мкл клеточной суспензии смешивали с равным объемом красителя 0,4 % трипановый синий, перемешивали жидкости в течение 20 сек и в камере Горяева подсчитывали количество окрашенных (погибших) клеток на 100 встреченных при подсчете клеток.

Экспериментальное исследование апиrogenности было выполнено на 20-ти половозрелых крысах-самцах породы Wistar массой 280–300 г, содержавшихся в стандартных условиях вивария. Под CO₂-наркозом в ламинарном потоке стерильного воздуха 10-ти крысам имплантировали подкожно (в область живота) по 1-му матриксу через кожный разрез. В качестве контроля служила группа из 10-ти ложнооперированных животных, которым выполняли срединный разрез кожи, подкожно вводили пинцет, формировали боковой карман и зашивали рану без введения изделия. Для оценки возможной гипертермической реакции у крыс контрольной и опытной групп проводили измерение ректальной температуры до операции и на 1, 2, 3 и 7-е сутки после операции.

При обработке полученных данных были использованы методы статистического описания, включающие проверку на нормальность распределения исследуемого признака по критерию Шапиро-Вилка, расчет среднего (\bar{X}), ошибки среднего (m), межгрупповое сравнение показателей с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни.

Различия считались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты исследований и обсуждение. Для исследования нам были предложены трехмерные нетканые матриксы, изготовленные в Национально-исследовательском Томском политехническом университете методом аэродинамического формования в турбулентном газовом потоке из 4 % раствора полимолочной кислоты с молекулярной массой 92000 г/моль в дихлорэтано [7].

В условиях *in vitro* ответ клеток различается в зависимости от состава искусственных материалов. Для изделий с предполагаемым внедрением в область биоинженерии костный мозг является подходящей тест-системой, поскольку содержит стволовые клетки различных дифференоров и активно применяется для биотестирования материалов [2].

Результаты экспериментов *in vitro* показали, что количество выживших клеток при 1-часовом контакте клеточной суспензии и тестируемого матрикса составило $96,80 \pm 0,97$ %, что статистически значимо не отличалось от показателя в контрольной культуре клеток, не контактировавших с искусственным материалом ($96,80 \pm 0,97$ %).

Макроскопическое изучение поведения матрикса в клеточной взвеси показало, что он находился на границе раздела воздух/жидкость. В то же время клетки под действием силы тяжести опускались на дно культуральной посуды (установлено при микроскопическом исследовании). Таким образом, влияние матрикса на жизнеспособность миелокариоцитов было как прямым, так и опосредовано через продукты биodeградации тестируемых образцов, выделяющиеся из материала при контакте с модельной биологической жидкостью.

Получить апиrogenный продукт — одно из основных требований, предъявляемых к имплантируемым материалам. Пирогенная реакция выражается повышением температуры тела, ознобом и другими симптомами. Причиной такой реакции часто являются эндотоксины грамотрицательных бактерий, которые при внутреннем введении обладают значительно большей активностью, чем при накожном нанесении [3].

Для оценки возможной гипертермической реакции у крыс контрольной и опытной групп проводили измерение ректальной температуры до подкожной имплантации исследуемого полилактидного матрикса и на 1, 2, 3 и 7-е сутки после операции. Согласно полученным данным статистически значимых изменений температурной реакции во все сроки у экспериментальных животных выявлено не было (см. табл.).

Таким образом, тестируемый гибридный синтетический биodeградируемый полилактидный матрикс не вызывал гипертермической реакции организма крыс при имплантации, т. е. апиrogenен.

Температура тела у крыс при подкожной имплантации гибридного синтетического биodeградируемого матрикса из полимолочной кислоты ($\bar{X} \pm m$)

Группа животных	Температура тела, °C				
	до операции	1-е сутки после операции	2-е сутки после операции	3-и сутки после операции	7-е сутки после операции
Ложно-оперированные крысы	$38,3 \pm 0,9$	$39,5 \pm 0,3$	$38,6 \pm 0,5$	$38,0 \pm 0,7$	$38,5 \pm 0,8$
Крысы с имплантированным полилактидным матриксом	$38,2 \pm 0,7$ $p > 0,05$	$39,4 \pm 0,4$ $p > 0,05$	$38,8 \pm 0,6$ $p > 0,05$	$38,5 \pm 0,4$ $p > 0,05$	$38,4 \pm 0,6$ $p > 0,05$

Примечание: р — уровень статистической значимости различий показателя у крыс опытной группы по сравнению с аналогичным показателем у ложно-оперированных животных

Согласно проведенным тестам, исследуемый материал может быть представлен на испытания биосовместимости и биоактивности в системах *in vivo* для решения различных биоинженерных задач.

Выводы

1. При проведении сравнительного анализа жизнеспособности клеток костного мозга крыс в условиях *in vitro* было доказано отсутствие цитотоксичности у тестируемого синтетического полилактидного матрикса.
2. Гибридный биodeградируемый синтетический матрикс из полимолочной кислоты является апиrogenным изделием, поскольку при подкожной имплантации лабораторным крысам не вызывал повышения температуры тела.

Список литературы

1. Локальные и системные эффекты имплантатов гиалуроновой кислоты при коррекции возрастных изменений кожи / И. А. Хлусов [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. — 2013. — Т. 12, № 1. — С. 61-68.
2. Регуляция поведения клеток фосфатами кальция *in vitro*, синтезированными механохимическим методом / А. В. Карлов [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2004. — Т. 138, № 9. — С. 356-360.
3. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. А. Н. Миронова. — Ч. 1. — М. : Гриф и К, 2012. — 944 с.
4. Biomaterials science : an introduction to materials in medicine / Ed. by B. D. Ratner. — San Diego : Elsevier Academic Press, 2004. — 851 p.
5. Lutolf M. P. Designing materials to direct stem-cell fate / M. P. Lutolf, P. M. Gilbert, H. M. Blau // Nature. — 2009. — Vol. 462. — P. 433-441.
6. Nanotechnology for cell-substrate interactions / N. J. Sniadecki [et al.] // Annals of Biomedical Engineering. — 2006. — Vol. 34. — P. 59-74.
7. Nonwoven Polylactide Scaffolds Obtained by Solution Blow Spinning and the *In Vitro* Degradation Dynamics / S. Tverdokhlebov [et al.] // Advanced Materials Research. — 2014. — Vol. 872. — P. 257-262.

EVALUATING CYTOTOXICITY AND APYROGENICITY OF A BIODEGRADABLE POLYLACTIDE MATRIX

[K. V. Zaytsev, O. B. Zhukova, I. A. Khlusov, A. A. Gostyukhina, N. G. Abdulkina, S. I. Tverdokhlebov, N. P. Stepanenko, A. A. Zaytsev, V. A. Vorobyev](#)

State Budgetary Institution «The Siberian Federal Research Clinical Center under the Federal Medical Biological Agency» (Seversk)

The article examines the biological safety of a biodegradable matrix with specified physical and chemical properties fabricated from the polylactic acid by aerodynamic spinning and extrusion in the turbulent gas flow. Via a comparative analysis of the viability of rat bone marrow cells *in vitro*, we have determined that the studied synthetic polylactide matrix lacks cytotoxicity. According to the test results, the studied material proved to be apyrogenic.

Keywords: biodegradable polymers, cytotoxicity, apyrogenicity.

About authors:

Zaytsev Konstantin Vasilyevich — Cand. Sci. (Med.), Head of Laboratory, Tomsk Research Institute of Health Resort Medicine and Physiotherapy of State Budgetary Institution «The Siberian Federal Research Clinical Center under the Federal Medical Biological Agency» (Tomsk), phone: 8 (3822) 90-65-17, e-mail: ZaycevKV@med.tomsk.ru

Zhukova Oksana Borisovna — Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher, Tomsk Research Institute of Health Resort Medicine and Physiotherapy of State Budgetary Institution «The Siberian Federal Research Clinical Center under the Federal Medical Biological Agency» (Tomsk), e-mail: exper@med.tomsk.ru

Khlusov Igor Albertovich — Dr. Sci. (Med.), Professor, Leading Researcher, Tomsk Research Institute of Health Resort Medicine and Physiotherapy of State Budgetary Institution «The Siberian Federal Research Clinical Center under the Federal Medical Biological Agency» (Tomsk), e-mail: khlusov63@mail.ru

Gostyukhina Alena Anatolyevna — Researcher, Tomsk Research Institute of Health Resort Medicine and Physiotherapy of State Budgetary Institution «The Siberian Federal Research Clinical Center under the Federal Medical Biological Agency» (Tomsk), phone: 8 (3822) 90-65-17, e-mail: exper@med.tomsk.ru

Abdulkina Natalya Gennadyevna — Dr. Sci. (Med.), Deputy Director for Science, Tomsk Research Institute of Health Resort Medicine and Physiotherapy of State Budgetary Institution «The Siberian Federal Research Clinical Center under the Federal Medical Biological Agency» (Tomsk), phone: 8 (3822) 51-53-88, e-mail: nauka@med.tomsk.ru

Tverdokhlebov Sergey Ivanovich — Cand. Sci. (Phys.-Math.), Researcher, Tomsk Research Institute of Health Resort Medicine and Physiotherapy of State Budgetary Institution «The Siberian Federal Research Clinical Center under the Federal Medical Biological Agency» (Tomsk), phone: 8 (3822) 90-65-17, e-mail: tverd@tpu.ru

Stepanenko Nina Petrovna — Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Tomsk Research Institute of Health Resort Medicine and Physiotherapy of State Budgetary Institution «The Siberian Federal Research Clinical Center under the Federal Medical Biological Agency» (Tomsk), e-mail: StepanenkoNP@med.tomsk.ru

Zaytsev Aleksey Aleksandrovich — Cand. Sci. (Med.), Director, Tomsk Research Institute of Health Resort Medicine and Physiotherapy of State Budgetary Institution «The Siberian Federal Research Clinical Center under the Federal Medical Biological Agency» (Tomsk), phone: 8 (3822) 51-20-05, e-mail: niikf @med.tomsk.ru

Vorobyev Viktor Aleksandrovich — Executive Director, State Budgetary Institution «The Siberian Federal Research Clinical Center under the Federal Medical Biological Agency» (Seversk), phone: 8 (3823) 54-37-03, e-mail: kb81@med.tomsk.ru

List of the Literature:

1. Local and system effects of hyaluronic acid implants in conditions of corrections of age-related changes in skin / I. A. Khlusov [et al.] // Bulletin of Siberian Medicine. — 2013. — Vol. 12, N 1. — P. 61-68.
2. In vitro regulation of cell behavior by calcium phosphates synthesized by the mechanochemical method / A. V. Karlov [et al.] // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. — 2004. — Vol. 138, N 9. — P. 356-360.
3. Guidance on Preclinical Trials of Drugs / Ed. by A. N. Mironov. — P. 1. — M. : Grif & Co., 2012. — 944 p.
4. Biomaterials science : an introduction to materials in medicine / Ed. by B. D. Ratner. — San Diego : Elsevier Academic Press, 2004. — 851 p.
5. Lutolf M. P. Designing materials to direct stem-cell fate / M. P. Lutolf, P. M. Gilbert, H. M. Blau // Nature. — 2009. — Vol. 462. — P. 433-441.
6. Nanotechnology for cell-substrate interactions / N. J. Sniadecki [et al.] // Annals of Biomedical Engineering. — 2006. — Vol. 34. — P. 59-74.
7. Nonwoven Polylactide Scaffolds Obtained by Solution Blow Spinning and the In Vitro Degradation Dynamics / S. Tverdokhlebov [et al.] // Advanced Materials Research. — 2014. — Vol. 872. — P. 257-262.