

УДК 547.472.3-126:677.017:57.085.2:616-008.85

## ДИНАМИКА *IN VITRO* ДЕГРАДАЦИИ НЕТКАНЫХ МАТРИКСОВ ИЗ ПОЛИМОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ В МОДЕЛЬНОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ

Хлусов И.А.<sup>1,4</sup>, Зайцев К.В.<sup>2</sup>, Жукова О.Б.<sup>2</sup>, Гостюхина А.А.<sup>2</sup>, Абдулкина Н.Г.<sup>2</sup>, Зайцев А.А.<sup>1,2</sup>, Кулагина И.В.<sup>3</sup>, Твердохлебов С.И.<sup>4</sup>, Больбасов Е.Н.<sup>4</sup>, Станкевич К.С.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

<sup>2</sup> Томский НИИ курортологии и физиотерапии ФМБА России, г. Томск

<sup>3</sup> НИИ кардиологии СО РАМН, г. Томск

<sup>4</sup> Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск

### РЕЗЮМЕ

Изучена понедельная деградация *in vitro* при температуре 37 °С волокнисто-пористых нетканых скеффолдов из полимолочной кислоты, полученных аэродинамическим формированием в турбулентном газовом потоке, в модельной среде RPMI-1640, имитирующей телесную жидкость организма. Мономеры молочной кислоты выделялись в раствор по экспоненциальному закону и медленно достигали максимальных концентраций к концу наблюдений (5-я нед растворения). В то же время снижение концентраций ионов кальция и неорганического фосфора в растворах, контактирующих с тестируемыми образцами (10 × 10 × 1 мм<sup>2</sup>), свидетельствовало об адсорбции химических элементов на искусственном материале. Обмен ионами с биологическими жидкостями могут быть основой регулируемой биоактивности волокнисто-пористого биodeградируемого материала в приложении к биоинженерии межклеточного матрикса для регенеративной медицины.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** биорезорбируемые скеффолды, среда RPMI-1640, раствор, мономеры молочной кислоты, кальций, неорганический фосфор.

### Введение

Создание новых материалов с полезными свойствами является одной из ключевых проблем современности. Особую проблему представляет разработка новых изделий биомедицинского назначения, предназначенных для контакта со средой живого организма и необходимых для реконструктивной и регенеративной медицины. Полимолочная кислота, ее сополимеры и композиты входят в современный класс биodeградируемых материалов и широко применяются для изготовления различных имплантатов [1, 2].

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 [3].

Однако немногие из потенциальных медицинских материалов, изделий, систем доставки лекарств и фармакологических препаратов, дошедших до клинических испытаний, достигают его завершающих стадий с позитивным результатом. Одними из главных причин являются их недостаточная эффективность (30% случаев) и непредвиденная токсичность (еще 30% случаев) [4].

В связи с этим при оценке свойств и перспектив новых материалов и готовых изделий, предназначенных для длительного применения, международные и национальные стандарты рекомендуют начинать изучение их биомедицинских свойств с тестов *in vitro* [2, 5]. Одним из первых методов, рекомендуемых стандартом ИСО 10993 (части 9 и 13) [6, 7], является тест *in vitro* на биodeградацию испытуемого материала в результате воздействия биологической среды.

Растворение искусственного матрикса считается важным компонентом его биологической активности [8]. Особенно важен данный тест для полимерных

✉ Хлусов Игорь Альбертович, тел./факс 8 (3822) 42-64-43; e-mail: khlusov63@mail.ru

материалов, поскольку выделяющиеся из них мономеры способны оказывать побочные эффекты (воспалительные и аллергические реакции, канцерогенность и т.п.) на клеточные системы, особенно при длительном контакте с биологическими жидкостями и тканями.

Для изучения процессов растворения и резорбции тестируемых материалов *in vitro* используют различные модельные биологические жидкости. Наиболее известна среди медицинских материаловедов *simulated body fluid* (SBF) на основе насыщенного раствора неорганических солей, близкого к водно-электролитному составу жидкой части крови [9]. Однако изменения структуры материалов в SBF, активно пропагандируемой для изучения деградации изделий, протекают по механизму растворения (преципитации) веществ [10]. Фосфатный буфер для изучения деградации *in vitro* поли(L-лактида) согласно ГОСТ Р ИСО 13781-2011 [11] можно рассматривать как частный случай SBF-раствора.

Изотонический раствор хлорида натрия, рекомендуемый в международном стандарте ISO 10993-5 для приготовления экстрактов изделий, позволяет при 5-недельной длительности эксперимента *in vitro* изучать фазу истинного растворения искусственной поверхности, во многом прогнозирующую поведение и судьбу имплантатов в условиях *in vivo* [12]. Тем не менее изотонический раствор хлорида натрия является электролитом, не содержит буферных систем и не воспроизводит благоприятные условия для жизнедеятельности клеток и тканей.

Современным трендом развития биоинженерии является биомиметическая концепция, рассматривающая возможность для воспроизведения (имитации) естественного микроокружения клеточных систем с помощью искусственных материалов третьей генерации. В этом секторе находятся имплантаты с функционализированной поверхностью и биомиметической структурой (поверхностью) на основе подражания природному межклеточному матриксу [2], способные инициировать (модулировать) процессы структурно-функциональной регенерации тканей посредством стимуляции специфического клеточного ответа на молекулярном уровне.

Естественно, что изучать биомиметические материалы следует в условиях, наиболее приближенных к реалиям живого организма. В наибольшей степени имитируют межклеточные жидкости (естественные буферные системы), значительно отличающиеся в различных тканях и клеточных системах, синтетические питательные среды для культивирования клеток с существенными вариациями органических и неорганических компонентов [13].

Цель исследования – изучить динамику деградации полилактидных (PLA) нетканых материалов, изготовленных методом аэродинамического формирования в турбулентном газовом потоке, перспективных для регенеративной медицины при реконструкции внеклеточного матрикса. В качестве растворителя применяли культуральную среду RPMI-1640, практически не содержащую молочную кислоту [13], что оказалось полезным при изучении возможного минимального выхода потенциальных продуктов разрушения из тестируемого материала.

## Материал и методы

Тестируемые матриксы изготовлены в Томском политехническом университете методом аэродинамического формирования в турбулентном газовом потоке, который ранее использовался в работе [14]. Метод применялся для получения нетканых матриксов и другими авторами [15].

Для приготовления матриксов использовали 5%-й раствор L-полимолочной кислоты молекулярной массой 120 000 г/моль (PURAC, Нидерланды) в дихлорметане (Panreac, Испания). После приготовления матриксы помещали в вакуумную камеру с остаточным давлением  $10^{-4}$  Па на 24 ч для удаления остатков растворителя.

Исследование морфологии поверхности материала проводили методом растровой электронной микроскопии (РЭМ) ESEM Quanta 400 FEG без нанесения проводящих покрытий в режиме низкого вакуума в атмосфере паров воды. Применялись следующие режимы: остаточное давление в камере 60 Па, ускоряющее напряжение 20 кВ, ток пучка 5 мкА. Морфологические характеристики матрикса (диаметр волокон, размер включений) измеряли с использованием программного обеспечения Image J 1.38 (National Institutes of Health, США). Пористость матрикса оценивали в соответствии с методикой, описанной Y.-Sh. Lee и соавт. [16].

Изучение химического состава проводили методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (EDX-анализ, EDS analysis system Genesis 4000, SUTW-Si(Li) детектор). Полуколичественный расчет содержания химических элементов выполняли методом трех поправок: на средний атомный номер, поглощение и флуоресценцию.

Смачиваемость искусственного материала исследовали на установке Easy Drop (Krüss, Германия) методом «сидячей» капли (объем 3 мл), помещенной на исследуемую поверхность (рис. 1), путем измерения краевого угла смачивания. Измерения проводили по двум жидкостям (вода и глицерин) спустя 1 мин после

помещения жидкости на исследуемую поверхность. На основе метода Owens-Wendt-Rabel-Kaelble (OWRK) рассчитывали полную поверхностную энергию, ее полярную и дисперсную компоненты [17].

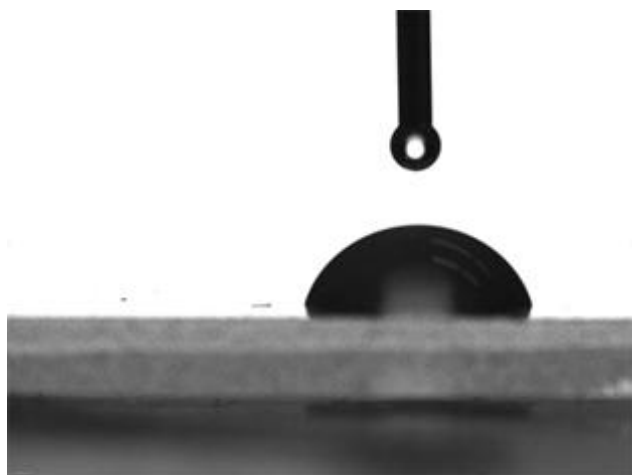


Рис. 1. Пример измерения смачиваемости поверхности матриксов методом «сидячей» капли жидкости

Для тестирования растворимости применяли образцы с линейными размерами  $10 \times 10 \text{ мм}^2$  и толщиной не более 1 мм. В каждой группе было по пять матриксов. В качестве контроля применяли модельную биологическую жидкость без добавления тестируемых матриксов. Синтетическая среда для культивирования клеток RPMI-1640 (Sigma, США) с индикатором pH феноловым красным и низким содержанием кальция служила базовой модельной биологической жидкостью (растворителем) для изучения биодеградации матриксов.

Исследование образцов на растворение проводили в стационарных условиях, моделирующих *in vitro* зону асептического воспаления, неизбежно возникающего после имплантации *in vivo* любых медицинских изделий и сопровождающегося застоем жидкости в месте имплантации. Каждый образец помещали в условиях ламинарного потока стерильного воздуха в индивидуальную стерильную коническую пластиковую пробирку с крышкой фирмы Axugen Scientific (США) с растворителем и культивировали в термостате ТС-80М-2 (Россия) при температуре  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Объем растворителя (4 мл) определяли согласно рекомендациям ISO 10993-5 [18], исходя из суммарной площади поверхности образцов ( $2 \text{ см}^2$ ).

Для определения скорости разложения матриксов их растворяли в течение 5 нед. Понедельно (в конце 1, 2, 3, 4 и 5-й нед культивирования) все растворы полностью забирали из пробирок и заменяли свежей пор-

цией растворителя (за исключением 5-й нед). В забранных порциях экстрактов при комнатной температуре определяли pH, концентрации ионизированного и общего кальция, неорганического фосфора (набор Thermo Fisher Scientific Inc., США) и молочной кислоты (Diagnostic Systems GmbH, Германия) стандартным колориметрическим методом [19] на биохимическом автоматическом анализаторе Konelab 60i (США) согласно инструкциям фирм-производителей. До и в процессе растворения проводили визуальную (макроскопическую) оценку состояния матриксов и модельной биологической жидкости: изменение цвета, наличие осадка или взвеси, состояние тестируемого образца (форма, размеры).

При оценке полученных экспериментальных данных были использованы методы статистического описания, а также методы проверки статистических гипотез, использующиеся в стандартных пакетах программы Statistica 6.0. Результаты выражали как среднее арифметическое  $\bar{X}$ , статистическую девиацию  $SD$  или ошибку среднего значения  $m$ . Для анализа имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (критерий Колмогорова–Смирнова). При соответствии нормальному закону распределения признака в исследуемых выборках проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием  $t$ -критерия Стьюдента. Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали непараметрический критерий Вилкоксона ( $T$ -тест) или Манна–Уитни ( $U$ -тест). Для оценки влияния состава, концентрации биологически активной композиции матриксов на скорость их разложения применяли регрессионный анализ. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Полилактиды, синтетические полимеры, биодеградирующие с выделением природных мономеров молочной кислоты, уже к концу XX столетия имели длительную историю клинического применения для биоинженерии тканей [20].

Получение волокнисто-пористых полимерных материалов является новым перспективным шагом [15, 21], приближающим их структуру к природным матриксам. РЭМ-изображения тестируемых PLA-матриксов показали сложную пространственную организацию их нано- и микроразмерной структуры (рис. 2). Разряженные (низкоплотные) жгуты толщиной до 33–43 мкм (рис. 2,а) состоят из пучков с диаметром отдельных волокон менее 900 нм (рис. 2,б). В матриксе присутствуют шарообразные включения со

средним диаметром ( $17 \pm 3$ ) мкм и сквозные поры. Пористость матрикса, согласно методике расчета [16] составила ( $59 \pm 2$ )%. Представленная морфология материала во многом совпадает с описанной ранее W.-J. Li и соавт. [21] и напоминает структуру межклеточного волокнистого вещества.

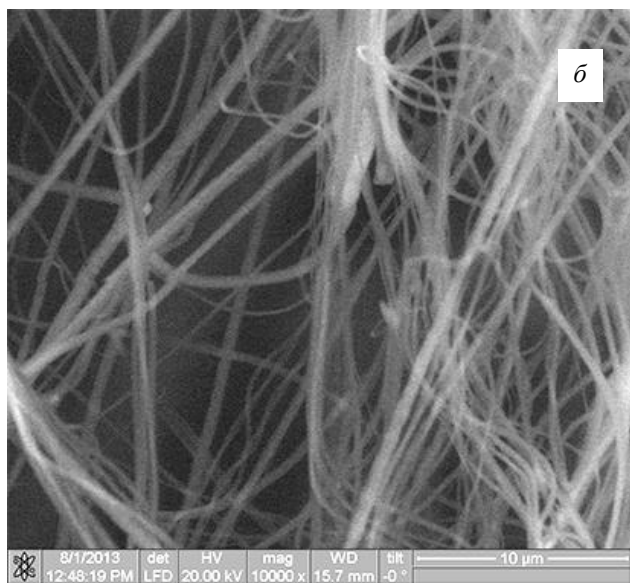
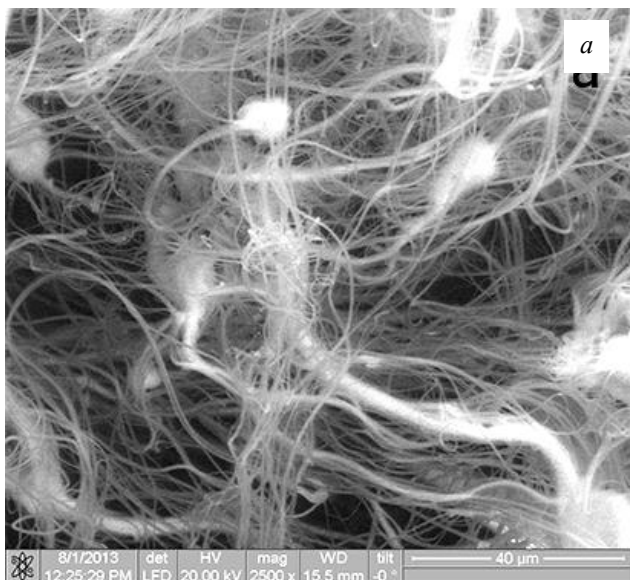


Рис. 2. РЭМ-изображения нетканых матриц, сформированных методом аэродинамического формирования в турбулентном газовом потоке. Ув. 2 500 (а) и 10 000 (б)

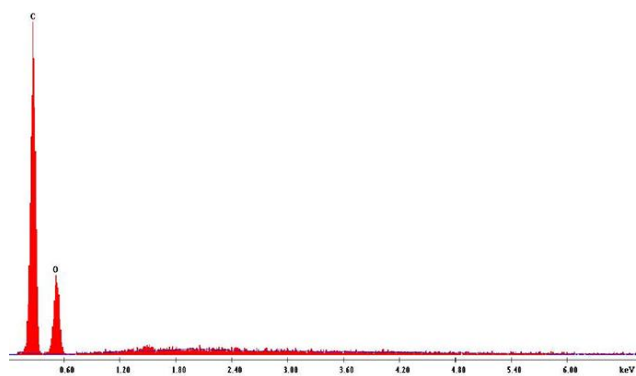


Рис. 3. Типичный EDX-спектр полилактидного матрикса, полученного аэродинамическим формированием в турбулентном газовом потоке

EDX-спектр сформированного матрикса представлен на рис. 3. В спектре преимущественно определяются рефлексы, соответствующие углероду и кислороду. Отсутствие рефлекса, соответствующего хлору, позволяет сделать вывод о полном удалении из матрикса органического растворителя, способного вносить существенные изменения в химические показатели раствора в процессе деградации материала.

Тем не менее стандарты качества требуют многостороннего тестирования *in vitro* каждого нового материала и (или) изделия перед его использованием в биомедицине. Для биodeградируемых полимеров одним из важнейших испытаний является тест на растворение, поскольку предъявляемое к ним требование структурной целостности и механической стабильности с одновременной деградацией в течение определенного периода времени, пока клетки не синтезируют естественный матрикс, кажется трудно выполнимым. В этом плане технологии «спиннинга», позволяющие имитировать волокнисто-пористую структуру экстрацеллюлярного матрикса [15, 21], можно считать наиболее продвинутыми.

Биodeградацию материала моделируют *in vivo* и *in vitro* за счет физико-химического и (био)химического растворения материала в агрессивных жидкостях и (или) посредством биорезорбции, осуществляемой клеточными системами организма (макрофаги, остеокласты). Однако чувствительность анализов *in vitro* выше, чем *in vivo* [22].

Текущие исследования показали, что все тестируемые PLA-матрицы непосредственно после внесения в растворитель размещались на границе раздела жидкость – воздух. Растворение в течение 5 нед не привело к видимым изменениям физических свойств материала. Матрицы держались на границе раздела жидкость – воздух до 4-й нед исследования, когда у

двух образцов из пяти (40%) изменилась плавучая плотность, и они опустились на дно сосуда.

Длительная плавучесть образцов обусловлена не только их волокнисто-пористой структурой, препятствующей вытеснению воздуха из материала, но и гидрофобностью поверхности. Действительно (табл. 1), гидрофобность нетканого матрикса подтверждается большими значениями краевого угла смачивания.

К концу наблюдения (5-я нед исследования) только в одном из пяти случаев отмечалось изменение исходного розово-вишневого цвета раствора до слабо-желтого окрашивания, свидетельствующего об увеличении кислотности раствора. Визуальные наблюдения подтвердились самым низким значением pH растворов PLA-матрикса (6,85 ед.; 95% от контроля) в данный срок эксперимента (табл. 2).

Таблица 1

Краевой угол смачивания и свободная поверхностная энергия PLA нетканых матриксов ( $X \pm m$ )				
Краевой угол смачивания водой, град	Краевой угол смачивания глицерином, град	Свободная энергия поверхности, мДж/м <sup>2</sup>	Дисперсная компонента, мДж/м <sup>2</sup>	Полярная компонента, мДж/м <sup>2</sup>
93 ± 8	97 ± 52	18 ± 3	1,1 ± 0,6	17 ± 2

Таблица 2

Состояние растворов полилактидных нетканых матриксов (PLA) в динамике 5-недельной деградации <i>in vitro</i> в среде RPMI-1640 ( $X \pm SD(m)$ )						
Показатель ( $n = 5$ )	Группа	Сроки исследования, недели				
		1	2	3	4	5
pH растворов, ед	Контроль среды (растворителя)	7,22 ± 0,13 (0,06)				
	PLA	7,33 ± 0,07 (0,02)	7,36 ± 0,10 (0,05)	7,12 ± 0,25 (0,11)	7,01 ± 0,12 (0,06)	6,85 ± 0,46 (0,20)
Ca <sup>2+</sup> , ммоль	Контроль среды	0,18 ± 0,03 (0,02)				
	PLA	0,24 ± 0,05 (0,02)	0,20 ± 0,06 (0,03)	0,15 ± 0,03 (0,01)	0,16 ± 0,01 (0,004)	0,16 ± 0,02 <sup>#</sup> (0,01) $p < 0,02$
Лактат, мг/дл	Контроль среды	0,20 ± 0,14 (0,06)				
	PLA	0,24 ± 0,09 (0,04)	0,34 ± 0,11 (0,05)	0,22 ± 0,08 (0,04)	0,40 ± 0,23 (0,10)	1,10 ± 1,03 (0,46)
Неорганический фосфор, ммоль	Контроль среды	4,94 ± 0,05 (0,02)				
	PLA	4,99 ± 0,09 (0,04)	4,85 ± 0,06* (0,03) $p < 0,042$	4,82 ± 0,19 (0,08)	4,39 ± 1,26 (0,57)	4,86 ± 0,05* <sup>#</sup> (0,02) $p < 0,042$

Примечание. \* – статистически значимые различия с контролем, # – с уровнем 1-й недели согласно *U*-критерию Манна–Уитни. Применяли критерий для независимых выборок, поскольку не были выявлены внутригрупповые корреляции показателей.

Согласно линейному регрессионному анализу (величина аппроксимации  $R^2 = 0,92$ ), средняя скорость убывания показателя составила в динамике растворения тестируемого материала 0,13 единицы pH в неделю. В то же время вариации показателя не превышали пределов ±1 ед. pH, рекомендуемых СанПиН 2.1.4.1074-01 [23] в случае водных экстрактов изделий для медицины.

Кислотно-щелочное равновесие имеет огромное значение для жизнедеятельности организма, его сдвиг может провоцировать клеточную гибель [24]. В связи с этим, недостоверные изменения pH растворов в сравнении с контролем среды позволяет считать PLA

матрикса подходящим материалом для биоинженерных решений.

Наиболее чувствительным методом получения информации о скорости растворения имплантатов *in vitro* является химический анализ электролита [25]. При биохимическом анализе растворов (табл. 2) выявлен экспоненциальный ( $R^2 = 0,92$ ; рис. 4) прирост концентрации мономеров молочной кислоты, связанный с их выходом из растворяющихся PLA-матрикса и достигающий максимальных значений (550% от контроля) к 5-й нед наблюдения. Тем не менее изменения показателя не достигали статистически значимых различий с контрольным уровнем лактата на протяжении всего эксперимента (табл. 2). Относительно слабое

растворение матриксов может объяснять описанные выше незначительные колебания pH растворов.

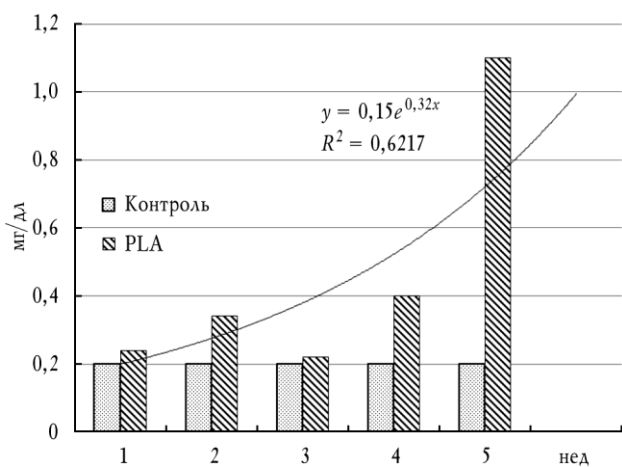


Рис. 4. Средние концентрации мономеров молочной кислоты в растворах полилактидных матриксов в динамике 5-недельного растворения в среде RPMI-1640

Еще одним объяснением могут быть ионообменные процессы между веществом матрикса и модельной биологической средой, сопровождающиеся уменьшением (в сравнении с составом растворителя) в растворах концентрации неорганического фосфора (2-я и 5-я нед растворения, табл. 2), по-видимому, в результате его осаждения на PLA-матрикс. Кроме того, об этом может свидетельствовать факт статистически значимого ( $p < 0,03$  согласно *U*-критерию Манна–Уитни) уменьшения значений показателя в растворах к концу периода наблюдения в сравнении с уровнем 1-й нед (см. табл. 2).

Важным этапом было определение вектора движения ионов кальция на границе раздела материал – раствор, отражающего процессы растворения и (или) преципитации (обратного осаждения) солей (прежде всего фосфатов) кальция. Концентрация ионизированного кальция практически не менялась в сравнении с показателем растворителя на протяжении всего эксперимента. Однако к 5-й нед содержание ионов кальция в растворах тестируемых образцов падало до 67% ( $p < 0,05$ ) от уровня 1-й нед (табл. 2), понедельное убывание показателя протекало со средней линейной скоростью 0,02 ммоль ( $R^2 = 0,70$ ).

В связи с этим при деградации PLA-матриксов ионообменные процессы могут привести к адсорбции фосфора и кальция на поверхности и в объеме материала вследствие его волокнисто-пористой структуры. Естественная поляризация материалов способствует формированию дзета-потенциала на границе раздела фаз [24]. Согласно полученным данным, процесс формирования двойного электри-

ческого слоя протекает как минимум за счет кальция и неорганического фосфора в физиологически активных концентрациях.

Для любого искусственного материала (биотолерантного, биоинертного, биоактивного) принципы интеграции с биологическими тканями во многом одинаковы и отличаются прежде всего скоростью обменных процессов в системе имплантат – ткань. В классическом понимании концепция биоактивности рассматривает высвобождение в окружающую среду биологически активных молекул и ионов в результате биodeградации искусственного материала [26], что приводит к построению новой функциональной системы имплантат – ткань.

В представленном случае биоактивные свойства PLA-матриксов связаны не только с известными процессами деградации и медленным выходом лактата (естественного продукта метаболизма клеток), но и обменом ионами с модельным раствором, имитирующим телесные жидкости организма. Как следствие, возможность управлять биоактивностью нетканых PLA-материалов за счет производственного контроля их физико-химических свойств позволяет рассматривать данный материал как перспективный шаг для регуляции разнообразных клеточных систем *in vitro* и целенаправленной биоинженерии их микроокружения *in vivo*.

## Заключение

Нетканые матриксы, сформированные из раствора полимолочной кислоты в дихлорметане методом аэродинамического формирования в турбулентном газовом потоке, деградируют *in vitro* в модельной среде RPMI-1640, имитирующей телесную жидкость организма, с выделением в раствор мономеров молочной кислоты по экспоненциальному закону с достижением максимальных концентраций к концу наблюдений (5-я нед растворения). В то же время снижение концентраций ионов кальция и неорганического фосфора в растворах, контактирующих с тестируемыми изделиями, свидетельствует об адсорбции химических элементов на искусственном материале. Ионообменные процессы с биологическими жидкостями организма могут быть основой регулируемой биоактивности волокнисто-пористого биodeградируемого материала в приложении к биоинженерии межклеточного матрикса для регенеративной медицины.

*Исследования выполнены при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–*

2013 годы» (государственный контракт № 14.512.11.0012), РФФИ (грант № 13-08-98052 p\_сибирь\_a), государственного заказа (проект № 7.1084.2011).

### Литература

1. Волова Т.Г., Севастьянов В.И., Шишацкая Е.И. Полиоксиканоаты – биоразрушаемые полимеры для медицины: 2-е изд., дополн. и переработ. Красноярск: Платина, 2006. 288 с.
2. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 2<sup>nd</sup> ed. / ed. by B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. 851 p.
3. Lee Y.-Sh., Arinze T.L. Electrospun Nanofibrous Materials for Neural Tissue Engineering // *Polymers*. 2011. V. 3. P. 413–426.
4. Kola I., Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? // *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2004. V. 3. P. 711–715.
5. *Биосовместимые материалы* / под ред. В.И. Севастьянова, М.П. Кирпичникова. М.: Мед. информ. агентство, 2011. 544 с.
6. *ГОСТ Р ИСО 10993-9-2009*. Оценка биологического действия медицинских изделий. Ч. 9. Основные принципы идентификации и количественного определения потенциальных продуктов деградации. М.: Стандартинформ, 2010. 11 с.
7. *ГОСТ Р ИСО 10993-13-2009*. Оценка биологического действия медицинских изделий. Ч. 13. Идентификация и количественное определение продуктов деградации полимерных медицинских изделий. М.: Стандартинформ, 2010. 17 с.
8. Damien C.J., Ricci J.L., Christel P. et al. Formation of a calcium phosphate-rich layer on absorbable calcium carbonate bone graft substitutes // *Calcif Tissue Int.* 1994. V. 55. P. 151–158.
9. Kokubo T., Kushitani H., Sakka S. et al. Solutions Able to Reproduce *in vivo* Surface-Structure Changes in Bioactive Glass-Ceramic A–W // *J. Biomed. Mater. Res.* 1990. V. 24. № 6. P. 721–734.
10. Вересов А.Г., Путляев В.И., Третьяков Ю.Д. Химия неорганических материалов на основе фосфатов кальция // *Рос. хим. журн.* 2004. Т. XLVIII, № 4. С. 52–64.
11. *ГОСТ Р ИСО 13781-2011*. Смолы и отформованные элементы на основе поли(L-лактида) для хирургических имплантатов. Исследование деградации методом *in vitro*. М.: Стандартинформ, 2011. 12 с.
12. Хлусов И.А., Карлов А.В., Поженько Н.С. и др. Зависимость остеогенных свойств клеток костного мозга от рельефа и растворимости кальцийфосфатных покрытий // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 2006. Т. 141, № 1. С. 107–112.
13. *Введение* в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей / под ред. В.В. Новицкого, В.П. Шахова, И.А. Хлусова. Томск: STT, 2004. 386 с.
14. Tverdokhlebov S.I., Bolbasov E.N., Shesterikov E.V. Scaffold materials based on fluorocarbon composites modified with RF magnetron sputtering // *Osteogenesis* / ed. Y. Lin. Rijeka: InTech, 2012. P. 83–116.
15. Medeiros E.S., Glenn G.M., Klamczynski A.P. et al. Solution blow spinning: A new method to produce micro- and nanofibers from polymer solutions // *J. Appl. Polym. Sci.* 2009. V. 113. P. 2322–2330. DOI: 10.1002/app.30275.
16. Lee Y.-Sh., Collins G., Livingston T., Arinze T.L. Neurite extension of primary neurons on electrospun piezoelectric scaffolds // *Acta Biomaterialia*. 2011. V. 7. P. 3877–3886.
17. Owens K., Wendt R.C. Estimation of surface free energy of polymers // *J. Appl. Polym. Sci.* 1969. V. 13. P. 1741D–1747D.
18. *Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods* // ISO 10993-5. First Edition. Switzerland, 1992. 7 p.
19. Туц Н. Клиническое руководство по лабораторным тестам: пер. с англ. / под ред. В.В. Меньшикова. М.: Юни-мед-Пресс, 2003. 942 с.
20. Behraves E., Yasko A.W., Engel P.S., Mikos A.G. Synthetic biodegradable polymers for orthopaedic applications // *Clin Orthop.* 1999. V. 367S. S118–S125.
21. Li W.-J., Laurencin C.T., Caterson E.J. et al. Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering // *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2002. V. 60, Issue 4. P. 613–621 DOI: 10.1002/jbm.10167.
22. Johnson H.J., Northup S.J., Seagraves P.A. et al. Biocompatibility test procedures for materials evaluation *in vitro*. II. Objective methods of toxicity assessment // *J. Biomed. Mater. Res.* 1985. V. 19. P. 489–508.
23. СанПиН 2.1.4.1074-01 Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. Введ. 01.01.2002. М.: Минздрав, 2002.
24. Самойлов В.О. Медицинская биофизика. СПб.: СпецЛит, 2007. 560 с.
25. Bundy K.J., Luedeman R. Factors which influence the accuracy of corrosion rate determination of implant materials // *Proc. 5<sup>th</sup> South. Biomed. Eng. Conf.*, Shreveport, 20–21 October 1986. N.Y., 1986. P. 289–296.
26. Kokubo T., Kushitani H., Ohtsuki C. et al. Chemical reaction of bioactive glass and glass-ceramics with a simulated body fluid // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1992. V. 3. P. 79–83.
27. Лушников Е.Ф., Абросимов А.Ю. Гибель клетки (апоптоз). М.: Медицина, 2001. 192 с.

Поступила в редакцию 21.08.2013 г.

Утверждена к печати 09.10.2013 г.

Хлусов Игорь Альбертович (✉) – д-р мед. наук, профессор кафедры морфологии и общей патологии СибГМУ (г. Томск).

Зайцев Константин Васильевич – канд. мед. наук, зав. лабораторией изучения механизмов действия физических факторов Томского НИИКиФ ФМБА России (г. Томск).

Жукова Оксана Борисовна – д-р мед. наук, ст. науч. сотрудник лаборатории изучения механизмов действия физических факторов Томского НИИКиФ ФМБА России (г. Томск).

Гостюхина Алёна Анатольевна – мл. науч. сотрудник лаборатории изучения механизмов действия физических факторов Томского НИИКиФ ФМБА России (г. Томск).

**Абдулкина Наталья Геннадиевна** – д-р мед. наук, зам. директора по науке Томского НИИКиФ ФМБА России (г. Томск).

**Зайцев Алексей Александрович** – канд. мед. наук, директор Томского НИИКиФ ФМБА России, зав. кафедрой восстановительной медицины, физиотерапии и курортологии ФПК и ППС СибГМУ (г. Томск).

**Кулагина Ирина Владимировна** – канд. мед. наук, зав. клинико-диагностической лабораторией НИИ кардиологии СО РАМН (г. Томск).

**Твердохлебов Сергей Иванович** – канд. физ.-мат. наук, доцент кафедры теоретической и экспериментальной физики НИ ТПУ (г. Томск).

**Болбасов Евгений Николаевич** – аспирант кафедры теоретической и экспериментальной физики НИ ТПУ (г. Томск).

**Станкевич Ксения Сергеевна** – магистрант кафедры биотехнологии и органической химии НИ ТПУ (г. Томск).

✉ **Хлусов Игорь Альбертович**, тел./факс 8 (3822) 42-64-43; e-mail: khlusov63@mail.ru

## THE DYNAMICS OF IN VITRO DEGRADATION OF NON-WOVEN POLYLACTIDE MATRICES IN MODEL BIOLOGICAL LIQUID

**Khlusov I.A.<sup>1,4</sup>, Zaitsev K.V.<sup>2</sup>, Zhukova O.B.<sup>2</sup>, Gostyukhina A.A.<sup>2</sup>, Abdulkina N.G.<sup>2</sup>, Zaitsev A.A.<sup>1,2</sup>, Kulagina I.V.<sup>3</sup>, Tverdokhlebov S.I.<sup>4</sup>, Bolbasov E.N.<sup>4</sup>, Stankevich K.S.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> *Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation*

<sup>2</sup> *Tomsk Research Institute of Balneology and Physiotherapy, FMBA of Russia, Tomsk, Russian Federation*

<sup>3</sup> *Institute of Cardiology, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, Russian Federation*

<sup>4</sup> *National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation*

### ABSTRACT

The weekly *in vitro* degradation of fibrous-porous non-woven polylactide scaffolds made by aerodynamic formation in a turbulent gas flow has been studied with 37 °C in model RPMI-1640 medium imitated body fluid of organism. Lactate monomers released into solution exponentially and reached slowly a maximum value the end of the observation (5th week of dissolution). At the same time, reducing the concentrations of calcium and inorganic phosphorus ions in solutions contacted with tested samples (10×10×1 mm<sup>2</sup>) testified about chemical elements adsorption on artificial material. Ions exchange with biological fluids may be a basis of regulated bioactivity of fibrous-porous non-woven biodegradable material in application to intercellular matrix bioengineering for regenerative medicine.

**KEY WORDS:** bioresorbable scaffolds, RPMI-1640 medium, solution, lactic acid monomers, calcium, inorganic phosphorus.

*Bulletin of Siberian Medicine*, 2013, vol. 12, no. 6, pp. 73–81

### References

1. Volova T.G., Sevastyanov V.I., Shishatskaya E.I. *Polyhydroxyalkanoates – biodegradable polymers for medicine: 2nd ed., add. and reprocessing*. Krasnoyarsk, Platinum, 2006. 288 p. (in Russian).
2. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 2<sup>nd</sup> ed. Ed. by B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons. San Diego, Elsevier Academic Press, 2004. 851 p.
3. Lee Y.-Sh., Arinzeh T.L. Electrospun Nanofibrous Materials for Neural Tissue Engineering. *Polymers*, 2011, vol. 3, pp. 413–426.
4. Kola I., Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov*, 2004, vol. 3, pp. 711–715.
5. *Biocompatible materials*. V.I. Sevastyanov, M.P. Kirpichnikov, eds. Moscow, Medical Information Agency, 2011. 544 p. (in Russian).
6. GOST R ISO 10993-9-2009 *Biological evaluation of medical devices*. Part 9. The basic principles of identification and quantification of potential degradation products. Moscow, Standartinform, 2010. 11 p. (in Russian).
7. GOST R ISO 10993-13-2009 *Biological evaluation of medical devices*. Part 13. Identification and quantification of degradation of polymeric medical devices. Moscow, Standartinform, 2010. 17 p. (in Russian).
8. Damien C.J., Ricci J.L., Christel P. et al. Formation of a calcium phosphate-rich layer on absorbable calcium carbonate bone graft substitutes. *Calcif. Tissue Int.*, 1994, vol. 55, pp. 151–158.
9. Kokubo T., Kushitani H., Sakka S. et al. Solutions Able to Reproduce *in vivo* Surface-Structure Changes in Bioactive Glass-Ceramic A–W. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1990, vol. 24, no. 6, pp. 721–734.
10. Veresov A.G., Putlyaev V.I., Tretyakov Yu.D. Chemistry of inorganic materials based on calcium phosphates. *Russian Chemical Journal*, 2004, vol. XLVIII, no. 4, pp. 52–64 (in Russian).



11. GOST R ISO 13781-2011 *Resins and molded elements based on poly (L-lactide) for surgical implants. Study of degradation by in vitro method*. Moscow, Standartinform, 2011. 12 p. (in Russian).
12. Khlusov I.A., Karlov A.V., Pozhen'ko N.S. et al. A dependence of osteogenic properties of bone marrow cells from a relief and solubility of calcium phosphate coatings. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2006, vol. 141, no. 1, pp. 107–112 (in Russian).
13. *Introduction to the cell culture, organ and tissue bioengineering*. Novitsky V.V., Shakhov V.P., Khlusov I.A. eds. Tomsk, STT, 2004. 386 p. (in Russian).
14. Tverdokhlebov S.I., Bolbasov E.N., Shesterikov E.V. Scaffold materials based on fluorocarbon composites modified with RF magnetron sputtering. *Osteogenesis*. Y. Lin, ed. Rijeka, InTech, 2012. Pp. 83–116.
15. Medeiros E.S., Glenn G.M., Klamczynski A.P. et al. Solution blow spinning: A new method to produce micro- and nanofibers from polymer solutions. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2009, vol. 113, pp. 2322–2330. DOI: 10.1002/app.30275.
16. Lee Y.-Sh., Collins G., Livingston T., Arinze T.L. Neurite extension of primary neurons on electrospun piezoelectric scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 2011, vol. 7, pp. 3877–3886.
17. Owens K., Wendt R.C. Estimation of surface free energy of polymers. *J. Appl. Polym. Sci.*, 1969, vol. 13, pp. 1741D–1747D.
18. Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods. *ISO 10993-5*. First Edition. Switzerland, 1992. 7 p.
19. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders, 1998. (Russ. ed.: *Klinicheskoe rukovodstvo po laboratornym testam*. pod red. prof. Norberta U. Tica; gl. red. rus. izd. prof. V.V. Men'shikov ; per. s angl. prof. V.V. Men'shikov i dr. Moscow, JuNIMED-Press Publ., 2003. 942 p.).
20. Behravesch E., Yasko A.W., Engel P.S., Mikos A.G. Synthetic biodegradable polymers for orthopaedic applications. *Clin Orthop*, 1999, vol.367S. S118–S125.
21. Li W.-J., Laurencin C.T., Catterson E.J. et al. Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*, 2002, vol.60, Issue 4, pp. 613–621 DOI: 10.1002/jbm.10167.
22. Johnson H.J., Northup S.J., Seagraves P.A. et al. Biocompatibility test procedures for materials evaluation *in vitro*. II. Objective methods of toxicity assessment. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1985, vol. 19, pp. 489–508.
23. SanPin 2.1.4.1074-01 *Drinking water*. Hygienic requirements for water quality of centralized drinking water supply. Quality control. Introduce 01.01.2002. Moscow, Ministry of Health, 2002 (in Russian).
24. Samoilov V.O. *Medical biophysics*. St. Petersburg, SpetsLit publ., 2007. 560 p. (in Russian).
25. Bundy K.J., Luedeman R. Factors which influence the accuracy of corrosion rate determination of implant materials. *Proc. 5<sup>th</sup> South. Biomed. Eng. Conf., Shreveport, 20–21 October 1986*, N.Y., 1986, pp.289–296.
26. Kokubo T., Kushitani H., Ohtsuki C. et al. Chemical reaction of bioactive glass and glass-ceramics with a simulated body fluid. *J Mater Sci Mater Med*, 1992, vol. 3, pp. 79–83.
27. Lushnikov E.F., Abrosimov A.Yu. *Cell death (apoptosis)*. Moscow, Medicina Publ., 2001. 192 p. (in Russian).

**Khlusov Igor A.** (✉), Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Zaitsev Konstantin V.**, Tomsk SRI of Balneology and Physiotherapy, Tomsk, Russian Federation.

**Zhukova Oksana B.**, Tomsk SRI of Balneology and Physiotherapy, Tomsk, Russian Federation.

**Gostyukhina Alyena A.**, Tomsk SRI of Balneology and Physiotherapy, Tomsk, Russian Federation.

**Abdulkina Natalya G.**, Tomsk SRI of Balneology and Physiotherapy, Tomsk, Russian Federation.

**Zaitsev Aleksey A.**, Tomsk SRI of Balneology and Physiotherapy, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Kulagina Irina V.**, Institute of Cardiology, SB of RAMS, Tomsk, Russian Federation.

**Tverdokhlebov Sergey I.**, National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation.

**Bolbasov Eugeny N.**, National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation.

**Stankevich Xenia S.**, National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation.

✉ **Khlusov Igor A.**, Ph./Fax +7-3822-42-64-43; e-mail: khlusov63@mail.ru