

DOI: 10.15825/1995-1191-2021-2-104-113

СВЕРХКРИТИЧЕСКИЙ ДИОКСИД УГЛЕРОДА КАК МЕТОД СНИЖЕНИЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ БИОПОЛИМЕРНЫХ И ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ СКАФФОЛДОВ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Е.А. Немец^{1, 2}, А.Э. Лажко³, А.М. Григорьев¹, В.Ю. Белов^{1, 2}, В.А. Сургученко¹,
Ю.Б. Басок^{1, 2}, А.Д. Кириллова¹, В.И. Севастьянов^{1, 2}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий», Москва, Российская Федерация

³ ФГБУН «Институт общей и неорганической химии имени Н.С. Курнакова» РАН, Москва, Российская Федерация

Цель. Исследовать эффективность сверхкритического диоксида углерода (ск-СО₂) для снижения цитотоксичности биополимерных скаффолдов из биodeградируемых материалов и тканеспецифических скаффолдов из децеллюляризованных фрагментов печени свиньи (ФПс) или мелкодисперсных частиц хряща свиньи (МДЧХс). **Материалы и методы.** Биополимерные скаффолды из композиции сополимера поли(оксибутирата-со-оксивалерата) и желатина, диаметром 4 мм и длиной 80 мм формировали методом электроспиннинга (NANON-01A, МЕСС СО, Япония) и стабилизировали в парах глутарового альдегида в течение 48 ч при комнатной температуре. Для децеллюляризации ФПс и МДЧХс инкубировали при периодическом перемешивании в буферных (рН = 7,4) растворах додецилсульфата натрия (0,1%) и Triton X-100 с повышающейся концентрацией (1, 2 и 3%). Обработку в атмосфере ск-СО₂ проводили при давлении 150–300 бар, температуре 35 °С, скорости потока ск-СО₂ 0,25–2,5 мл/мин в течение 8–24 ч. В качестве модификатора полярности применяли этанол в концентрации 10%. Цитотоксичность оценивали согласно межгосударственному стандарту ГОСТ ISO 10993-5-2011. Исследование пролиферации фибробластов мыши линии NIH/3T3 в присутствии образцов проводили с применением интерактивной оптической системы IncuCyte Zoom. **Результаты.** Исследовано влияние скорости потока и давления ск-СО₂, а также добавление этанола на снижение цитотоксичности скаффолдов. Установлено, что обработка при низкой скорости потока ск-СО₂ (0,25 мл/мин) не приводит к требуемым значениям цитотоксичности. Полного отсутствия цитотоксичности биополимерных скаффолдов удается достичь в присутствии 10% этанола, при скорости потока ск-СО₂ 2,5 мл/мин, давлении 300 бар, температуре 35 °С после 8 ч обработки. Эффективное удаление цитотоксичных детергентов из децеллюляризованной печени происходит уже при давлении 150 бар и не требует применения этанола. Добавление этанола к ск-СО₂ позволяет устранить не только цитотоксическое, но и цитостатическое действие тканеспецифических скаффолдов. **Заключение.** Обработка ск-СО₂ является эффективным способом снижения цитотоксичности трехмерных пористых матриц, получаемых с применением цитотоксических веществ: бифункциональных сшивающих агентов для биополимерных скаффолдов и поверхностно-активных веществ в случае тканеспецифических матриц. Добавление этанола в качестве модификатора полярности позволяет повысить эффективность обработки за счет устранения как цитотоксического, так и цитостатического эффекта.

Ключевые слова: печень свиньи, хрящ свиньи, децеллюляризация, биополимерные скаффолды, сверхкритический СО₂, модификатор полярности, цитотоксичность.

Для корреспонденции: Немец Евгений Абрамович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.
Тел. (903) 579-23-79. E-mail: evgnemets@yandex.ru

Corresponding author: Evgeny Nemets. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.
Phone: (903) 579-23-79. E-mail: evgnemets@yandex.ru

SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE AS A TOOL FOR IMPROVING THE BIOCOMPATIBLE PROPERTIES OF BIOPOLYMER AND TISSUE-SPECIFIC SCAFFOLDS FOR TISSUE ENGINEERING

E.A. Nemets^{1, 2}, A.E. Lazhko³, A.M. Grigoryev¹, V.Yu. Belov^{1, 2}, V.A. Surguchenko¹, Yu.B. Basok^{1, 2}, A.D. Kirillova¹, V.I. Sevastianov^{1, 2}

¹ Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

² Institute for Biomedical Research and Technology, Moscow, Russian Federation

³ Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

Objective: to investigate the efficacy of supercritical carbon dioxide (sc-CO₂) for enhancing the biocompatibility of biopolymer scaffolds from biodegradable materials and tissue-specific scaffolds from decellularized porcine liver slices (PLSs) or fine porcine cartilage particles (FPCPs). **Materials and methods.** Biopolymer scaffolds of a polyoxy(butyrate-co-valerate) and gelatin copolymer composition, 4 mm in diameter and 80 mm in length, were formed by electrospinning (NANON-01A, MECC CO, Japan) and stabilized by incubation in glutaraldehyde vapor for 48 hours at room temperature. For decellularization, PLSs and FPCPs were incubated under periodic stirring in buffer (pH = 7.4) solutions of sodium dodecyl sulfate (0.1%) and Triton X-100 with increasing concentrations (1, 2, and 3%). Treatment in a sc-CO₂ atmosphere was done at 150–300 bar pressure, 35 °C temperature, and 0.25–2.5 mL/min flow rate of sc-CO₂ for 8–24 hours. 10% ethanol was introduced as a polarity modifier. Cytotoxicity was studied according to GOST ISO 10993-5-2011. The growth of NIH/3T3 in the presence of samples was studied using an interactive optical system IncuCyte Zoom. **Results.** The effect of the sc-CO₂ flow rate and pressure, and the effect of addition of ethanol, on the biocompatibility of scaffolds was investigated. It was found that treatment at a low sc-CO₂ flow rate (0.25 mL/min) does not achieve the required cytotoxicity. Complete absence of cytotoxicity in biopolymer scaffolds was achieved in the presence of 10% ethanol, at a sc-CO₂ flow rate of 2.5 mL/min, 300 bar pressure and 35 °C temperature after 8 hours of treatment. Effective removal of cytotoxic detergents from decellularized liver occurs already at a 150-bar pressure and does not require the addition of ethanol. Adding ethanol to sc-CO₂ eliminates not only the cytotoxic, but also the cytostatic effect of tissue-specific scaffolds. **Conclusion.** Sc-CO₂ treatment is an effective way to enhance the biocompatibility of three-dimensional porous matrices produced using cytotoxic substances: bifunctional cross-linking agents for biopolymer scaffolds and surfactants in the case of tissue-specific matrices. Addition of ethanol as a polarity modifier improves the treatment efficiency by eliminating both cytotoxic and cytostatic effects.

Keywords: pig liver, pig cartilage, decellularization, biopolymer scaffolds, supercritical CO₂, polarity modifier, cytotoxicity, biocompatibility.

ВВЕДЕНИЕ

Ключевым вопросом создания тканеинженерных конструкций, предназначенных для применения в регенеративной медицине, является разработка биodeградируемых высокопористых скаффолдов (*синонимы*: матриксы, каркасы), позволяющих доставлять специфические клетки в орган, требующий коррекции и/или лечения и обеспечивать их длительное функционирование.

К настоящему времени разработано большое количество скаффолдов, обладающих необходимым комплексом физико-механических и биологических свойств, причем при их изготовлении предпочтение отдается высокомолекулярным материалам естественного происхождения. Наиболее часто для этой цели применяют коллаген, являющийся основным компонентом внеклеточного матрикса (ВКМ) и способный стимулировать репаративные процессы, а также его производные, например, желатин [1, 2]. Од-

нако при введении в организм скаффолды на основе коллагена и его производных подвергаются крайне быстрой (менее 1 месяца) резорбции [3, 4]. С целью повышения времени резорбции материалов на основе биополимеров был разработан широкий спектр физических и химических методов стабилизации (сшивки) [5–7]. Наибольшее распространение получили методы сшивки при помощи бифункционального сшивающего агента – глutarового альдегида (ГА). Наряду с высокой эффективностью стабилизации структуры биополимеров метод сшивки с применением ГА имеет ряд побочных эффектов, включая проявление цитотоксичности конечного продукта [8, 9].

В нативных тканях основная функция ВКМ состоит не только в обеспечении механической поддержки, но и в поддержании множества биологических функций, таких как жизнеспособность, пролиферация и дифференцировка клеток конкретной ткани или органа [10, 11]. В связи с этим наблюдается боль-

шой интерес к скаффолдам, изготовленным путем децеллюляризации – процесса, направленного на удаление клеток и генетического материала из ткани с сохранением не только структурных, но и тканеспецифических свойств ВКМ. В настоящее время для децеллюляризации органов и тканей применяется широкий спектр различных физических, химических и биологических методов, среди которых наибольшее распространение получила обработка поверхностно-активными веществами (ПАВ) ионной или не ионной природы [12–14]. Одним из существенных недостатков применения ПАВ для децеллюляризации органов и тканей является необходимость их тщательной отмывки в буферных растворах от остатков детергентов в течение длительного (не менее 72 ч) времени [12–15], что повышает риск вымывания значительных количеств гликозаминогликанов и сигнальных молекул и может привести к нарушению процессов рецеллюляризации матрикса [16]. Следовательно, сокращение времени контакта с водной фазой необходимо с точки зрения минимизации риска подобного рода осложнений.

В последнее время наблюдается повышенный интерес к использованию сверхкритических флюидов (СКФ) при создании скаффолдов для тканевой инженерии и регенеративной медицины [17–24]. Любое вещество, находящееся при температуре и давлении выше критической точки, переходит в состояние СКФ (рис. 1), при котором исчезает различие между жидкой и газовой фазой. Одно из наиболее важных свойств СКФ – это способность к растворению веществ, причем растворяющая способность увеличивается с увеличением их плотности. Поскольку при постоянной температуре с увеличением давления плотность СКФ возрастает, меняя давление, можно влиять на его растворяющую способность [25].

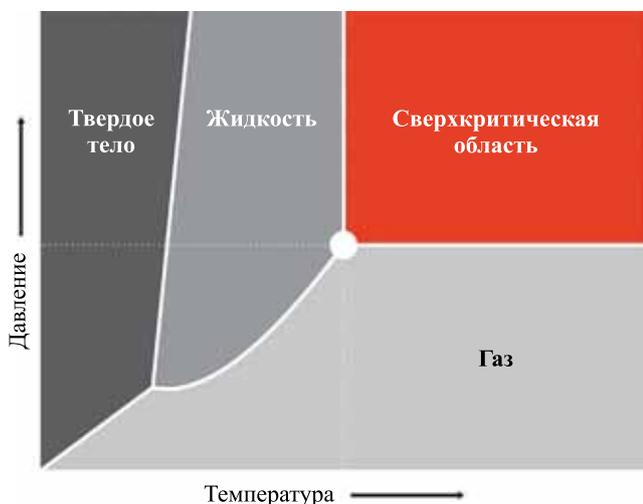


Рис. 1. Переход вещества в сверхкритическое состояние
Fig. 1. Transition of substance into a supercritical state

Из известных СКФ наиболее часто в биомедицинских технологиях применяют сверхкритический диоксид углерода (ск-СО₂). Обработка ск-СО₂ может проводиться при температурах, близких к физиологическим значениям (35–40 °С), и не требует применения дополнительных органических растворителей. По окончании обработки диоксид углерода легко и практически без остатка удаляется простым сбросом давления. Одновременно может происходить удаление растворимых в ск-СО₂ токсичных соединений (непрореагировавшие мономеры и олигомеры, ПАВ, пластификаторы и т. д.), что приводит к существенному улучшению биосовместимых свойств полученных материалов [26].

Поскольку диоксид углерода является неполярным соединением, для повышения эффективности удаления полярных фосфолипидных компонентов клеточных мембран обработку ск-СО₂ проводят в присутствии гидрофильного агента, как правило, этанола [27]. Добавление этанола позволяет также повысить в процессе децеллюляризации сохранность таких важных компонентов ВКМ, как коллагены, гликозаминогликаны, адгезивные белки (фибронектин, ламинин и др.), а также ангиогенные факторы [28].

Все это позволяет предположить, что обработка ск-СО₂ может способствовать эффективному удалению цитотоксичных остатков ПАВ и не прореагировавшего ГА, использованных в процессе формирования матриксов для тканевой инженерии.

Целью данной работы является исследование эффективности ск-СО₂ для снижения цитотоксичности трубчатых пористых скаффолдов из композиции сополимера поли(оксибутират-со-оксивалерата) и желатина (П(ОБ-ОВ) – Ж), стабилизированных ГА, и тканеспецифических скаффолдов из фрагментов печени свиньи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение скаффолдов

Биополимерные пористые трубчатые скаффолды (рис. 2) формировали с применением метода электроспиннинга на установке NANON-01A (MECC CO, Япония) из 10% (по массе) растворов П(ОБ-ОВ) (ММ 680000) и желатина (Gelatin from porcine skin Type A) в гексафторизопропанол (полимеры и растворитель Sigma-Aldrich, США), смешанных в соотношении 1 : 2 (по объему). Напряжение между электродами составляло 25 кВ, расстояние между электродами 10 см, диаметр стержня 4 мм и скорость вращения стержня 500 об/мин. Полученные из композиции (П(ОБ-ОВ) – Ж) образцы механически снимали с подложки, высушивали при 37 °С в течение 4–6 ч и вакуумировали при 37 °С и остаточном давлении 10–20 мм рт. ст. в течение 18–24 ч.

Дополнительную стабилизацию структуры биополимерных скаффолдов параами ГА (Serva, Германия) осуществляли, помещая образцы в замкнутую емкость (эксикатор), содержащую 25% раствор ГА, без прямого контакта образца с раствором, и инкубировали при комнатной температуре в течение 48 ч.

Децеллюляризация печени и хряща свиньи

Печень, бедренные и коленные суставы свиньи были получены на бойне (ООО «АПК ПРОМАГРО», г. Старый Оскол) после забоя здоровых животных (вес около 120 кг) в соответствии с Европейской директивой 64/433/ЕЕС. После транспортировки в охлажденном виде (4 °С) печень свиньи нарезали фрагментами (ФПс) размером 0,1 × 0,3 см, замораживали при –80 °С и хранили при данной температуре до момента начала децеллюляризации. Хрящ удаляли с суставных поверхностей скальпелем, нарезали фрагментами размером 0,5 × 0,5 см, замораживали при –80 °С и измельчали в условиях непрерывного охлаждения жидким азотом в течение 4 минут при частоте встряхивания размольного стакана 25 Гц с применением криомельницы CryoMill (Retch GmbH, Германия). Фракции мелкодисперсных частиц хряща свиньи (МДЧХс) размером 30–100 мкм выделяли просеиванием содержимого размольного стакана через набор сит с соответствующим размером ячеек.

Децеллюляризацию МДЧХс и ФПс проводили в трех буферных растворах (фосфатно-солевой буфер, PBS, pH = 7,4) 0,1% додецилсульфата натрия (SDS) и Triton X-100 с повышающейся концентрацией (1, 2 и 3%) (все реактивы Sigma-Aldrich, США) при периодическом перемешивании (200 об/мин, 3 раза в сутки, 1 ч, при комнатной температуре). После тщательной отмывки от ПАВ в трех сменах PBS и последующей инкубации в буферном растворе в течение 24 ч при комнатной температуре децеллюляризованные фрагменты печени свиньи (ДФПс) переносили в криобирки и хранили при –80 °С до момента обработки ск-СО₂.

Обработка сверхкритическим СО₂

Обработку в атмосфере ск-СО₂ осуществляли на установке RESS-SAS (Waters corporation, США) при T = 35 °С, давлении 150 и 300 бар, значениях скорости потока ск-СО₂ 0,25 и 2,5 мл/мин в течение 8 или 24 ч. В качестве модификатора полярности был выбран этанол в концентрации 10% (по объему).

Исследование цитотоксичности

Цитотоксичность исследуемых образцов оценивали в условиях *in vitro* согласно межгосударственному стандарту ГОСТ ISO 10993-5-2011 на культуре фибробластов мыши линии NIH/3T3 [29]. Все про-

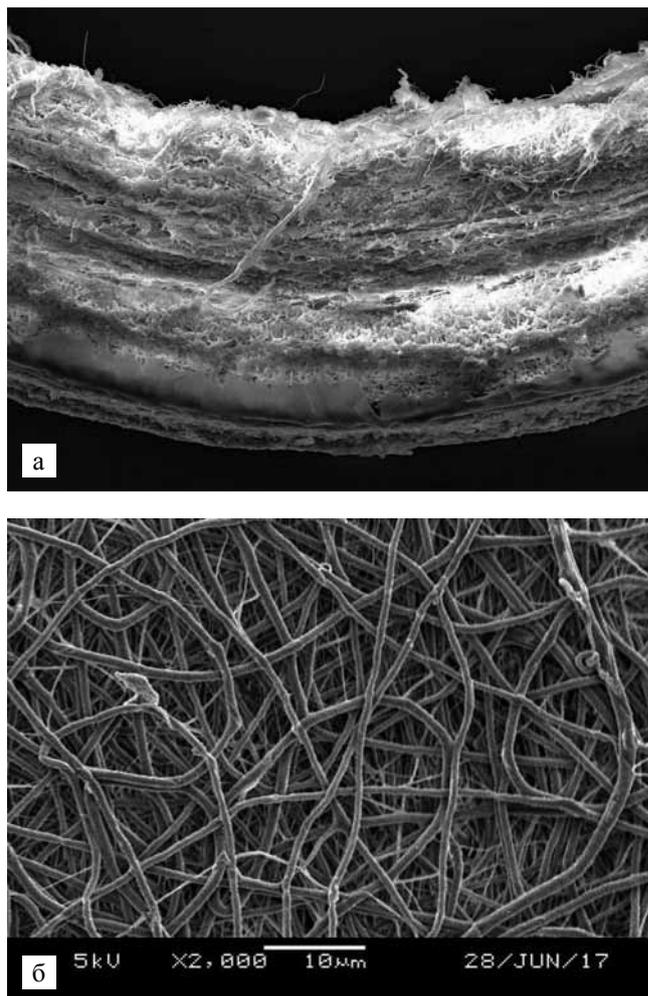


Рис. 2. Структура биополимерного пористого трубчатого скаффолда, d = 4 мм: а – поперечный срез (×100); б – внутренняя поверхность (×2000)

Fig. 2. Structure of a biopolymer porous tubular scaffold, d = 4 mm: а – a cross section (×100); б – inner surface (×2000)

цедуры проводили в асептических условиях. Фибробласты мыши линии NIH/3T3 (ATCC®CRL-1658™) из коллекции ATCC (American Type Culture Collection) высевали в культуральные 24- и 96-луночные плоскодонные планшеты (Corning-Costar, США) в концентрации 8×10^4 клеток/лунку и 2×10^4 клеток/лунку соответственно и инкубировали 24 ч при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей $5 \pm 1\%$ CO₂, до образования $80 \pm 10\%$ монослоя.

Готовили не менее трех вытяжек и проб на каждый образец скаффолда. В качестве экстрагирующего раствора использовали натрия хлорид (НПК, Россия). Соотношение площади поверхности образца к объему экстрагирующего раствора составляло 3 : 1 см²/мл. Время экстракции – 24 ч, температура – 37 °С. Полученную вытяжку вносили в 96-луночный планшет со сформированным монослоем клеток в объеме 100 мкл/лунку.

При исследовании цитотоксичности методом прямого контакта образцы биополимерного скаффолда ($1 \times 1 \text{ см}^2$ и толщиной 0,1 см) и тканеспецифические матриксы (навеска массой 5 мг) по 5 образцов каждого вида помещали непосредственно в 24-луночный планшет на поверхность монослоя клеток. Планшеты инкубировали 24 ч при температуре 37°C во влажной атмосфере, содержащей $5 \pm 1\% \text{ CO}_2$.

На 2 сутки инкубации оценивали конfluenceнтность монослоя (степень покрытия клетками субстрата), а также степень лизиса клеток с помощью бинокулярного инвертированного микроскопа MC 700 (Micros, Австрия).

Отрицательным контрольным образцом (K^-) служила культуральная среда DMEM с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки или без нее, положительным (K^+) – раствор цинка в азотной кислоте: Zn 1–2 вес.% в HNO_3 (Sigma-Aldrich, США), разбавление 1 : 100 физиологическим раствором.

Анализ результатов проводился согласно оценочной шкале степени ответной реакции клеток согласно ГОСТ ISO 10993-5-2011:

0 – не цитотоксично, наблюдаются единичные интрацитоплазматические гранулы, лизиса нет;

1 – легкая цитотоксичность, не больше 20% клеток лизированы (круглые, слабо прикрепленные, без интрацитоплазматических гранул);

2 – средняя цитотоксичность, не больше 50% клеток лизированы (круглые, слабо прикрепленные, без интрацитоплазматических гранул);

3 – значительная цитотоксичность, больше 70% клеток лизированы (практически полностью разрушенный монослой).

Отрицательный контрольный образец – степень ответной реакции клеток 0, не цитотоксично. Положительный контрольный образец – степень ответной реакции клеток 3 балла. Реактивность исследуемого экстракта не должна превышать степени 0 (не цитотоксично).

Исследование пролонгированного (до 72 ч) цитотоксического эффекта в условиях непосредственного контакта клеток с исследуемыми образцами проводили с использованием интерактивной оптической системы для длительных клеточных исследований IncuCyte Zoom (Essen BioScience, США). Данный комплекс позволяет инкубировать клетки в стандартных условиях и микроскопировать культуральный планшет через заданные промежутки времени с фотофиксацией изображения. Анализ полученных изображений с помощью встроенного программного обеспечения позволяет рассчитать изменение конfluenceнтности клеточного монослоя для каждого образца в зависимости от времени.

Влияние остаточных количеств цитотоксичных веществ на пролиферативную активность фибро-

бластов NIH/3T3 изучали с помощью интерактивной оптической системы IncuCyte Zoom, позволяющей в режиме реального времени регистрировать кривые роста клеток на поверхности культурального пластика при прямом контакте с исследуемым образцом.

Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel. Уровень статистической достоверности составлял $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

До обработки образцов в атмосфере ск- CO_2 цитотоксичность вытяжек из биополимерных скаффолдов соответствовала уровню 2 оценочной шкалы (средняя цитотоксичность), а в случае тканеспецифических скаффолдов – уровню 3 (значительная цитотоксичность).

После воздействия ск- CO_2 , независимо от выбора режима обработки, вытяжки из биополимерного скаффолда, а также матриксов МДЧХс и ДФПс были не цитотоксичны (уровень 0). В то же время в условиях прямого контакта с монослоем фибробластов NIH/3T3 образцы демонстрировали цитотоксичность, степень выраженности которой зависела от условий обработки.

Обработка скаффолдов ск- CO_2 с низкой скоростью потока (0,25 мл/мин) оказалась малоэффективной. Наибольшего снижения уровня цитотоксичности – до «легкой» (уровень 1) – удалось добиться после длительной обработки (24 ч) образцов ДФПс в среде ск- CO_2 с добавлением этанола. Однако этот результат не удовлетворяет требованиям ГОСТ ИСО 10993-5-2011.

Повышение скорости потока ск- CO_2 до 2,5 мл/мин положительно сказывается на эффективности обработки как биополимерных, так и тканеспецифических скаффолдов (табл. 1 и 2).

Обработка биополимерных скаффолдов ск- CO_2 при скорости потока 2,5 мл/мин и давлении 150 бар оказалась малоэффективной даже в случае добавления этанола (табл. 1). Повышение давления ск- CO_2 до 300 бар сопровождается заметным уменьшением цитотоксичности до «легкой» (уровень 1) после 24 ч воздействия (табл. 1). И только введение этанола в состав ск- CO_2 позволяет добиться полного отсутствия цитотоксического эффекта биополимерных скаффолдов при давлении 300 бар после 8 ч обработки (табл. 1).

В случае скаффолдов из ДФПс повышение скорости потока ск- CO_2 имеет более выраженный эффект на снижение цитотоксичности (табл. 2). В случае обработки образцов в течение 24 ч индивидуальным ск- CO_2 с давлением 150 бар происходит снижение цитотоксичности до «легкой» (уровень 1). Добавление

этанола позволяет полностью подавить цитотоксичность скаффолдов уже после 8 ч обработки ск-СО₂.

Повышение давления со 150 до 300 бар усиливает эффект от обработки ДФПс ск-СО₂ (табл. 2). Полное отсутствие цитотоксичности (уровень 0) получали уже после 8 ч воздействия ск-СО₂ без добавления этанола.

Следует особо отметить, что образцы, обработанные в режимах, обеспечивающих эффективное удаление ПАВ, продемонстрировали отсутствие цитотоксичности не только после 24 ч непосредственного контакта с клетками, но и в условиях длительного прямого контакта с клетками в течение 72 ч.

Полученные результаты позволяют прийти к заключению, что для эффективной отмывки от остатков цитотоксичных ПАВ обработку ДФПс следует проводить в течение 8 ч при температуре 35 °С, скорости потока ск-СО₂ 2,5 мл/мин и давлении 300 бар в атмосфере чистого диоксида углерода. Аналогичный результат может быть достигнут за счет обработки при давлении 150 бар при условии введения в состав

сверхкритического флюида модификатора полярности (этанола).

Методики децеллюляризации под действием детергентов [12–15] предполагают длительную (не менее 72 ч) отмывку полученных скаффолдов от цитотоксичных ПАВ, что повышает риск вымывания значительных количеств биологически активных молекул (гликозаминогликанов и цитокинов), играющих важную роль в процессе рецеллюляризации скаффолдов.

В результате применения обработки СКФ удается сократить время удаления ПАВ в водной среде до 24 ч.

Для выявления влияния остаточных количеств цитотоксичных веществ на пролиферативную активность фибробластов было проведено дополнительное исследование с применением интерактивной оптической системы IncuCyte Zoom, позволяющей в режиме реального времени регистрировать изменения пролиферативной активности клеток в присутствии скаффолдов.

Таблица 1

**Цитотоксичность пористых биополимерных скаффолдов
(скорость потока ск-СО₂ 2,5 мл/мин)**

**Cytotoxicity of porous biopolymer scaffolds
(sc-CO₂ flow rate 2.5 mL/min)**

	Этанол, %	Давление, бар	Время, ч	Цитотоксичность
1	Контроль (без обработки ск-СО ₂)			Значительная (3)
2	–	150	8	Значительная (3)
3	–	150	24	Значительная (3)
4	10	150	8	Средняя (2)
5	10	150	24	Средняя (2)
6	–	300	8	Средняя (2)
7	–	300	24	Легкая (1)
8	10	300	8	Отсутствует (0)
9	10	300	24	Отсутствует (0)

Таблица 2

**Цитотоксичность тканеспецифического скаффолда
(скорость потока ск-СО₂ 2,5 мл/мин)**

**Cytotoxicity of tissue-specific scaffold
(sc-CO₂ flow rate 2.5 ml/min)**

	Этанол, %	Давление, бар	Время, ч	Цитотоксичность
1	Контроль (без обработки ск-СО ₂)			Значительная (3)
2	–	150	8	Средняя (2)
3	–	150	24	Легкая (1)
4	10	150	8	Отсутствует (0)
5	10	150	24	Отсутствует (0)
6	–	300	8	Отсутствует (0)
7	–	300	24	Отсутствует (0)
8	10	300	8	Отсутствует (0)
9	10	300	24	Отсутствует (0)

Для данного исследования были отобраны образцы, продемонстрировавшие отсутствие цитотоксического эффекта при использовании оценочной шкалы, полученные при одинаковых условиях обработки $sc\text{-CO}_2$: скорость потока 2,5 мл/мин, давление 300 бар (табл. 2, образцы 6–9).

Сразу же после внесения образцов (20 ч после посева клеток на культуральный пластик) наблюдали заметное снижение пролиферативной активности фибробластов NIH/3T3 после контакта с образцами, обработанными $sc\text{-CO}_2$ без добавления этанола (рис. 3). В то же время скаффолды, обработанные в присутствии этанола, не вызывали снижения скорости пролиферации клеток по сравнению с отрицательным контрольным образцом (культуральный пластик).

Микроскопическое исследование, проведенное после окончания эксперимента по исследованию роста фибробластов мыши линии NIH/3T3 в присутствии скаффолдов из ДФПс, обработанных $sc\text{-CO}_2$

в разных режимах (рис. 4), подтвердило отсутствие каких-либо признаков негативного влияния на клетки (лизис, изменение морфологии), что еще раз подтверждает сделанный ранее вывод об отсутствии у исследованных образцов цитотоксичности. Однако снижение пролиферативной активности клеток, обнаруженное при контакте со скаффолдами, обработанными $sc\text{-CO}_2$ без добавления этанола, позволяет предположить в этом случае наличие цитостатического эффекта.

Матрицы из МДЧХс, обработанные в условиях оптимальных с точки зрения повышения биосовместимых свойств матриц из печени свиньи ($sc\text{-CO}_2$ 2,5 мл/мин с добавлением этанола; 35 °С; 300 бар; 8 ч), также продемонстрировали отсутствие цитотоксичности (уровень 0). При этом присутствие децеллюляризованных мелкодисперсных частиц хряща не только не оказывает цитостатического воздействия на культуру фибробластов мыши линии NIH/3T3, но стимулирует пролиферацию данного типа кле-

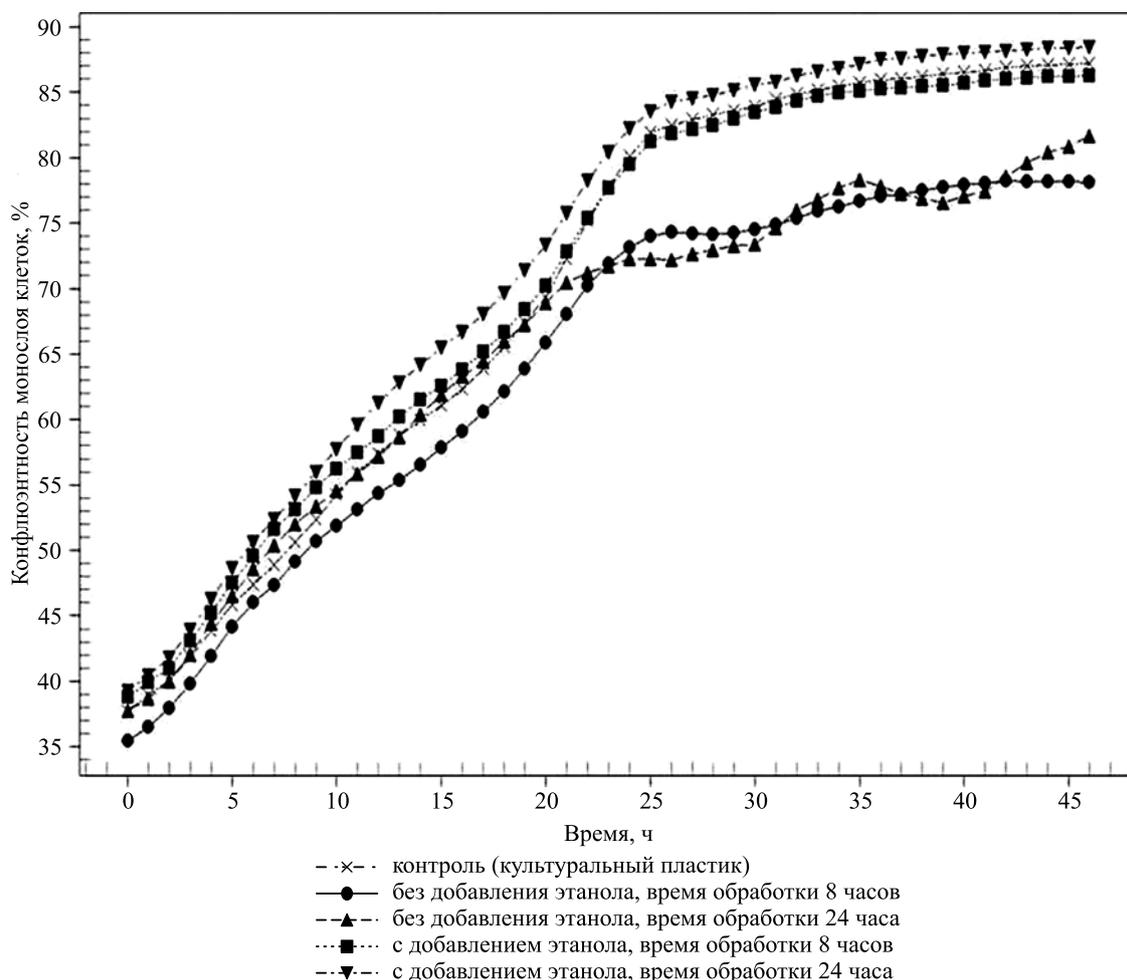


Рис. 3. Кривая роста фибробластов мыши линии NIH/3T3 в присутствии матриц из децеллюляризованной печени свиньи, обработанных $sc\text{-CO}_2$ (300 бар, 35 °С, скорость подачи $sc\text{-CO}_2$ 2,5 мл/мин)

Fig. 3. Growth curve of NIH/3T3 cells in the presence of matrices from decellularized porcine liver, treated with $sc\text{-CO}_2$ (300 bar, 35 °С, $sc\text{-CO}_2$ feed rate 2.5 mL/min)

ток (рис. 5): время достижения фибробластами 80% монослоя в присутствии децеллюляризованных частиц хряща значительно сокращается. Стимулирующий эффект, вероятно, обусловлен присутствием в составе матрикса из децеллюляризованного хряща сигнальных молекул, способствующих ускорению адгезии и пролиферации фибробластов, что коррелирует с экспериментальными результатами, описанными в литературе [30].

Таким образом, оптимальными с точки зрения подавления как цитотоксического, так и цитостатического эффекта тканеспецифических матриксов после децеллюляризации с применением детергентов являются режимы обработки СКФ на основе

диоксида углерода, содержащими добавки этанола. Причина этого, на наш взгляд, в том, что в составе децеллюляризирующего раствора присутствуют как неионные (Triton X-100), так и ионные (SDS) детергенты. Диоксид углерода в сверхкритическом состоянии представляет собой неполярный растворитель, эффективность которого с точки зрения удаления полярного ПАВ достаточна для устранения цитотоксического эффекта, но недостаточна для подавления цитостатического. Добавление полярного этанола (модификатора полярности) позволяет снизить содержание SDS до уровней, не способных оказывать цитостатический эффект.

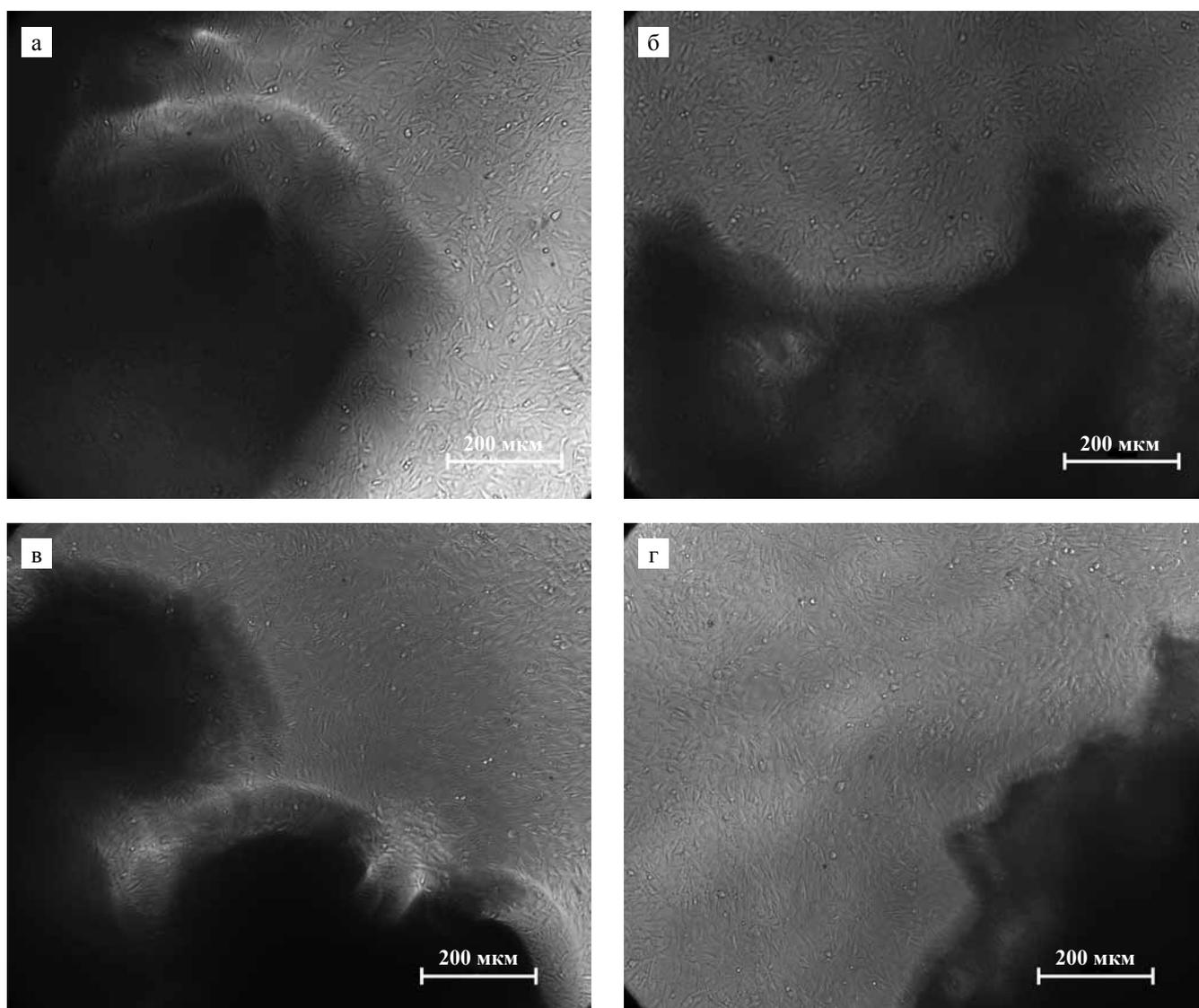


Рис. 4. Популяция фибробластов мыши линии NIH/3T3 через 48 часов культивирования в присутствии матриксов из децеллюляризованной печени свиньи, обработанных ск- CO_2 (300 бар, 35 °С, 2,5 мл/мин): а – ск- CO_2 , 8 часов; б – ск- CO_2 , 24 часа; в – ск- CO_2 + этанол, 8 часов; г – ск- CO_2 + этанол, 24 часа. $\times 100$

Fig. 4. Cell populations after 48 hours of culturing NIH/3T3 in the presence of matrices from decellularized porcine liver, treated with sc- CO_2 (300 bar, 35 °C, 2.5 mL/min): а – sc- CO_2 , 8 hours; б – sc- CO_2 , 24 hours; в – sc- CO_2 + ethanol, 8 hours; г – sc- CO_2 + ethanol, 24 hours. $\times 100$

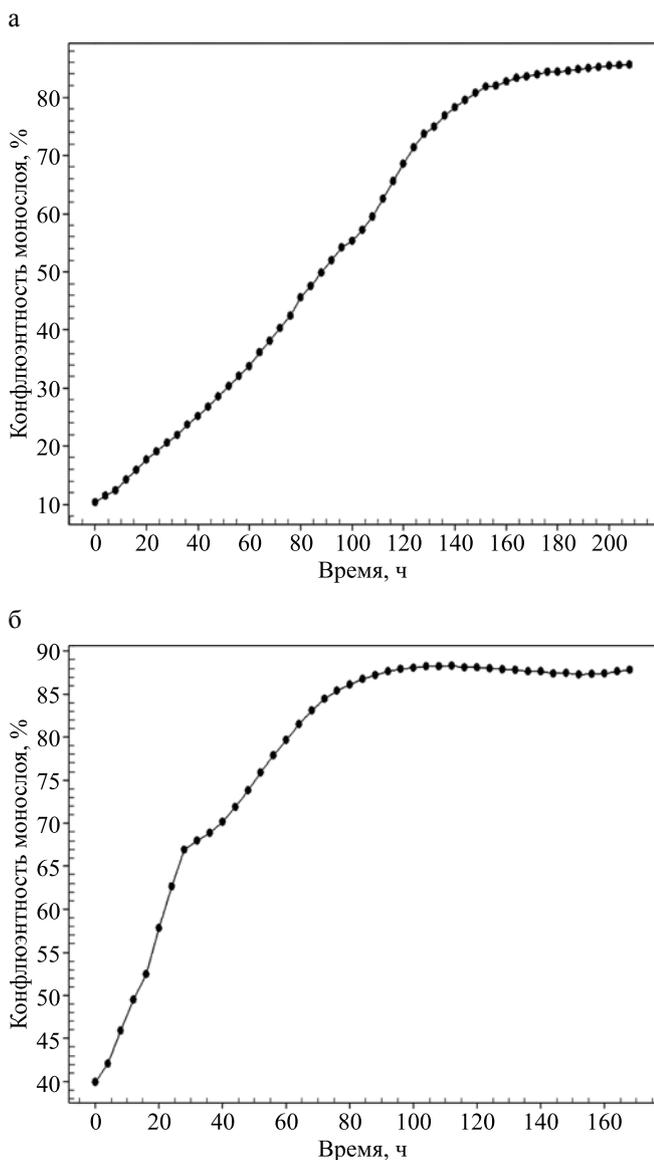


Рис. 5. Кривая роста фибробластов мыши линии NIH/3T3 на поверхности культурального пластика в отсутствие (а) и в присутствии (б) матриц из мелкодисперсных частиц децеллюляризованного хряща свиньи, обработанных сверхкритическими флюидами в оптимальном режиме (ск-СО₂ 2,5 мл/мин + этанол, 300 бар, 35 °С, 8 часов)

Fig. 5. Growth curve of NIH/3T3 cells on the surface of culture plate in the absence (a) and presence (b) of matrices made of fine particles of decellularized porcine cartilage treated with supercritical fluids in the optimal mode (sc-CO₂ 2.5 mL/min + ethanol, 300 bar, 35 °C, 8 hours)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обработка ск-СО₂ является эффективным способом снижения цитотоксичности трехмерных пористых матриц, получаемых с применением цитотоксических веществ: бифункциональных сшивающих агентов для биополимерных скаффолдов и ПАВ для тканеспецифических матриц МДЧХс и ДФПс. Добавление этанола в качестве модификатора полярности позволяет повысить эффективность обработки

за счет устранения как цитотоксического, так и цитостатического эффекта.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-15-00251, <https://rscf.ru/project/21-15-00251/>.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare no conflict of interest.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Сургученко ВА. Матрицы для тканевой инженерии и гибридных органов. Биосовместимые материалы: учебное пособие / Под ред. В.И. Севастьянова, М.П. Кирпичникова. М.: МИА, 2011. Часть II: 199–228. *Surguchenko VA. The matrices for tissue engineering and hybrid organs. Biocompatible materials (textbook). Ed. by: V.I. Sevastianov, M.P. Kirpichnikov. M.: MIA, 2011. Chast' II: 199–228.*
2. Sevastianov VI, Basok YB, Grigor'ev AM, Kirsanova LA, Vasilets VN. Formation of tissue-engineered construct of human cartilage tissue in a flow-through bioreactor. *Bull Exp Biol Med.* 2017; 164 (2): 269–273. doi: 10.1007/s10517-017-3971-z.
3. Goissis G, Suzigan S, Parreira DR, Maniglia JV, Braille DM, Raymundo S. Preparation and characterization of collagen-elastin matrices from blood vessels intended as small diameter vascular grafts. *Artif Organs.* 2000; 24: 217–223. doi: 10.1046/j.1525-1594.2000.06537.x. PMID: 10759645.
4. Busra MFM, Lokanathan Y. Recent development in the fabrication of collagen scaffolds for tissue engineering applications: A review. *Curr Pharm Biotechnol.* 2019; 20 (12): 992–1003. doi: 10.2174/1389201020666190731121016. PMID: 31364511.
5. Oryan A, Kamali A, Moshiri A, Baharvand H, Daemi H. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds. *Int J Biol Macromol.* 2018; 107 (Pt A): 678–688. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.184.
6. Kawecki M, Łabuś W, Klama-Baryla A, Kitala D, Kraut M, Glik J et al. A review of decellularization methods caused by an urgent need for quality control of cell-free extracellular matrix' scaffolds and their role in regenerative medicine. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2018; 106 (2): 909–923. doi: 10.1002/jbm.b.33865. PMID: 28194860.
7. Rose JB, Pacelli S, Haj AJE, Dua HS, Hopkinson A, White LJ et al. Gelatin-based materials in ocular tissue engineering. *Materials (Basel).* 2014; 7 (4): 3106–3135. doi: 10.3390/ma7043106. PMID: 28788609.
8. Nemets EA, Pankina AP, Sevastianov VI. Comparative analysis of methods for increasing of biostability of collagen films. *Inorganic Materials: Applied Research.* 2017; 5: 718–722.
9. Umashankar PR, Arun T, Kumari TV. Short duration glutaraldehyde cross linking of decellularized bovine pericardium improves biological response. *J Biomed Mater*

- Res. 2011; 97 (3): 311–320. doi: 10.1002/jbm.a.33061. PMID: 21448995.
10. Gattazzo F, Urciuolo A, Bonaldo P. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1840 (8): 2506–2519. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.01.010. PMID: 24418517.
 11. Sun Y, Wang TL, Toh WS, Pei M. The role of laminins in cartilaginous tissues: from development to regeneration. *Eur Cell Mater*. 2017; 34: 40–54. doi: 10.22203/eCM.v034a0.
 12. Shirakigawa N, Ijima H. Decellularized tissue engineering. *Advanced Structured Materials*. 2017; 66: 185–226. doi: 10.1007/978-981-10-3328-5_5.
 13. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011; 32 (12): 3233–3243. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057. PMID: 21296410.
 14. Gilpin A, Yang Y. Decellularization strategies for regenerative medicine: From processing techniques to applications. *Biomed Res Int*. 2017; 2017: 9831534. doi: 10.1155/2017/9831534. PMID: 28540307.
 15. Готье СВ, Севастьянов ВИ, Шагидулин МЮ, Немец ЕА, Басок ЮБ. Тканеспецифический матрикс для тканевой инженерии паренхиматозного органа и способ его получения. Патент на изобретение RU 2693432 C2, 02.07.2019. Gautier SV, Sevastyanov VI, Shagidulin MYu, Nemets EA, Basok YuB. Тканеспецифический матрикс для тканевой инженерии паренхиматозного органа и способ его получения. Патент на изобретение RU 2693432 C2, 02.07.2019.
 16. Kawasaki T, Kirita Y, Kami D, Kitani T, Ozaki C, Itakura Y et al. Novel detergent for whole organ tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2015; 103 (10): 3364–3373. doi: 10.1002/jbm.a.35474. PMID: 25850947.
 17. Song C, Luo Y, Liu Y, Li S, Xi Z, Zhao L et al. Fabrication of PCL scaffolds by supercritical CO₂ foaming based on the combined effects of rheological and crystallization properties. *Polymers (Basel)*. 2020; 12 (4): 780. doi: 10.3390/polym12040780. PMID: 32252222.
 18. Немец ЕА, Белов ВЮ, Ильина ТС, Сургученко ВА, Панкина АП, Севастьянов ВИ. Композитный пористый трубчатый биополимерный матрикс малого диаметра. *Перспективные материалы*. 2018; 9: 49–59. Nemets EA, Belov VJu, Ilina TS, Surguchenko VA, Pankina AP, Sevastianov VI. Composite porous tubular biopolymer matrix of small diameter. *Perspektivnye materialy*. 2018; 9: 49–59. [In Russ, English abstract]. doi: 10.30791/1028-978X-2018-9-49-59.
 19. White LJ, Hutter V, Tai H, Howdle SM, Shakesheff KM. The effect of processing variables on morphological and mechanical properties of supercritical CO₂ foamed scaffolds for tissue engineering. *Acta Biomater*. 2012; 8 (1): 61–71. doi: 10.1016/j.actbio.2011.07.032. PMID: 21855663.
 20. Antons J, Marascio MG, Aeberhard P, Weissenberger G, Hirt-Burri N, Applegate LA et al. Decellularised tissues obtained by a CO₂-philic detergent and supercritical CO₂. *Eur Cell Mater*. 2018; 36: 81–95. doi: 10.22203/eCM.v036a07. PMID: 30178445.
 21. Casali DM, Handleton RM, Shazly T, Matthews MA. A novel supercritical CO₂-based decellularization method for maintaining scaffold hydration and mechanical properties. *J Supercrit Fluids*. 2018; 131: 72–81. doi: 10.1016/j.supflu.2017.07.021.
 22. Huang YH, Tseng FW, Chang WH, Peng IC, Hsieh DJ, Wu SW et al. Preparation of acellular scaffold for corneal tissue engineering by supercritical carbon dioxide extraction technology. *Acta Biomater*. 2017; 58: 238–243. doi: 10.1016/j.actbio.2017.05.060. PMID: 28579539.
 23. Gil-Ramírez A, Rosmark O, Spégel P, Swärd K, Westergren-Thorsson G, Larsson-Callerfelt AK et al. Pressurized carbon dioxide as a potential tool for decellularization of pulmonary arteries for transplant purposes. *Sci Rep*. 2020; 10 (1): 4031. doi: 10.1038/s41598-020-60827-4. PMID: 32132596.
 24. Разгонова МП, Захаренко АМ, Сергиевич АА, Каленик ТК, Голохваст КС. Сверхкритические флюиды: теория, этапы становления, современное применение: учебное пособие. СПб.: Лань, 2019. 192 с. Razgonova MP, Zaharenko AM, Sergievich AA, Kalenik TK, Golohvast KS. Sverhkriticheskie fljuidy: teorija, jetapy stanovlenija, sovremennoe primenenie: uchebnoe posobie. SPb.: Lan', 2019. 192.
 25. Алексеев ЕС, Алентьев АЮ, Белова АС, Богдан ВИ и др. Сверхкритические флюиды в химии. *Успехи химии*. 2020; 89: 1337–1427. Alekseev ES, Alent'ev AYu, Belova AS, Bogdan VI et al. Supercritical fluids in chemistry. *Rus Chem Rev*. 2020; 89: 1337–1427. [In Russ, English abstract]. doi: 10.1070/RCR4932.
 26. Понов ВК. Имплантаты в заместительной и регенеративной медицине костных тканей. *Биосовместимые материалы (учебное пособие)*. Под ред. В.И. Севастьянова, М.П. Кирпичникова. М.: МИА, 2011. Часть II: 271–294. Popov VK. Implantaty v zamestitel'noj i regenerativnoj medicine kostnyh tkanej. *Biosovmestimye materialy (uchebnoe posobie)*. Pod red. V.I. Sevast'janova, M.P. Kirpichnikova. M.: MIA, 2011. Chast' II: 271–294.
 27. Ingrosso F, Ruiz-López MF. Modeling Solvation in Supercritical CO₂. *Chemphyschem*. 2017; 18: 2560–2572. doi: 10.1002/cphc.201700434.
 28. Seo Y, Jung Y, Kim SH. Decellularized heart ECM hydrogel using supercritical carbon dioxide for improved angiogenesis. *Acta Biomater*. 2018; 67: 270–281. doi: 10.1016/j.actbio.2017.11.046. PMID: 29223704.
 29. ГОСТ ISO 10993-5-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*». GOST ISO 10993-5-2011 «Izdelija medicinskie. Ocenka biologicheskogo dejstvija medicinskih izdelij. Chast' 5. Issledovanija na citotoksichnost': metody *in vitro*».
 30. Sun Y, Yan L, Chen S, Pei M. Functionality of decellularized matrix in cartilage regeneration: A comparison of tissue versus cell sources. *Acta Biomater*. 2018; 74: 56–73. doi: 10.1016/j.actbio.2018.04.048. PMID: 29702288.

Статья поступила в редакцию 8.04.2021 г.
The article was submitted to the journal on 8.04.2021