

Спектральные исследования биodeградации и гемолиза при контакте объемных и пленочных нанокомпозитов с биологическими жидкостями

Аннотация

Проведена оценка возможности применения нанокомпозитов, полученных методом лазерного структурирования одностенных (ОУНТ) и многостенных (МУНТ) углеродных нанотрубок в матрице бычьего сывороточного альбумина в качестве тканеинженерных каркасов, обеспечивающих при имплантации прорастание в себя сетки кровеносных сосудов в процессе собственной биodeградации. Наименьшая скорость биodeградации была получена для объемных и пленочных нанокомпозитов на основе ОУНТ в растворе NaCl и составила 2,45 и 9,77 % потери массы образцов за 14 суток. Анализ динамики изменения оптической плотности раствора NaCl, в котором находились образцы, показал интенсивную биodeградацию нанокомпозитов после 6 суток выдержки. Спектральные исследования гемолиза, вызванного контактом крови с нанокомпозитами продемонстрировали его отсутствие для объемных и пленочных образцов на основе ОУНТ (значение уровня гемолиза – менее 0,5 %).

Введение

В настоящее время проблема нехватки донорских органов и биотканей является крайне серьезной и актуальной [1]. В связи с этим проводятся широкомасштабные исследования в области поиска искусственных материалов, способных осуществить качественную и полноценную замену поврежденных органов и тканей человека. Данные материалы должны обладать физико-химическими характеристиками, сходными с характеристиками восстанавливаемой ткани, а также быть биосовместимыми, поддерживая рост живых клеток в месте дефекта биоткани. Вышеперечисленные задачи решаются в рамках активно развивающейся области науки и техники – тканевой инженерии, целью которой является поиск новых каркасов, способствующих росту колонизированных на них клеток человеческого организма [2].

Для создания тканеинженерных каркасов наиболее подходящими являются композитные материалы, состоящие из биологической матрицы с наноразмерными частицами наполнителя (нанокомпозиты). Нанокомпозиты могут иметь объемный вид (например, для заполнения костных дефектов значительных размеров) или быть выполнены в виде пленки (например, для реконструкции стенок органов, сосудов и соединительных тканей) [3].

Перспективным материалом наполнителя нанокомпозитов являются углеродные нанотрубки (УНТ). Обнаружено заметное сходство УНТ с компонентами натурального внеклеточного матрикса, и доказана способность нанотрубок увеличивать адгезию и пролиферацию клеток соединительной, нервной и костной тканей [4], [5].

В настоящей статье представлены результаты исследований нанокомпозитов, созданных методом лазерного наноструктурирования УНТ в матрице бычьего сывороточного альбумина (БСА) [6]. Для оценки возможности применения нанокомпозитов в качестве тканеинженерных каркасов, обеспечивающих прорастание сетки кровеносных сосудов и дальнейшую самосборку биотканей при собственной биорезорбируемости, спектральным методом были определены скорость биodeградации нанокомпозитов в жидкой среде, имитирующей кровь, и уровень гемолиза крови при контакте с нанокомпозитами.

Помимо перспективности исследуемых нанокомпозитов в области тканевой инженерии, представленные в статье результаты имеют значительный потенциал для разработки биосовместимых покрытий имплантируемых медицинских устройств, вступающих в контакт с кровью, например в кардиохирургии [7].

Материалы и методы

Для приготовления образцов нанокомпозитов использовались следующие компоненты: дистиллированная вода, лиофи-

лизованный БСА – 99 % чистоты, одностенные углеродные нанотрубки (ОУНТ) – 99 % чистоты – и многостенные углеродные нанотрубки (МУНТ) – 98 % чистоты [6].

На первом этапе была изготовлена водная дисперсия БСА с добавлением ОУНТ или МУНТ. Концентрация БСА составляла 250 г/л, УНТ – 0,1 г/л. Во избежание образования агломератов из УНТ и для достижения равномерного распределения компонентов в дисперсии проводилась ее обработка ультразвуком в различных режимах.

На втором этапе для изготовления объемных образцов нанокомпозитов дисперсия с заданным объемом высушивалась до полного испарения водной составляющей полупроводниковым лазером с длиной волны 810 нм при мощности 3...5 Вт в течение 20...60 мин. Пленочные образцы нанокомпозитов были приготовлены посредством высушивания тонкого слоя дисперсии, равномерно нанесенного на подложку из плетеного инертного синтетического материала – полиэтилентерефталата (ПЭТФ). Время высушивания при аналогичных параметрах излучения составило ~10 мин. Под действием структурирующего электромагнитного поля лазерного излучения нанотрубки осуществляют самосборку, в результате чего образуется прочный пористый каркас, а БСА выступает в качестве матрицы, которая связывает и оборачивает слоем нанотрубки.

Необходимость контроля скорости биodeградации тканеинженерных каркасов обусловлена соотношением времени вставания в них клеточного материала со временем растворения каркаса в процессе его биорезорбируемости при регенерации новой ткани [8]. Для оценки скорости биodeградации образцы помещали в 0,9%-ный раствор NaCl и содержали в нем в течение 14 суток при температуре 37 °С. Перед началом и после окончания эксперимента фиксировали массу образцов нанокомпозитов. Скорость биodeградации оценивали по изменению массы образцов. Для сравнения была измерена скорость биodeградации образцов, полученных методом высушивания исходных дисперсий на основе УНТ и БСА, помещенных в термостат при температуре 60 °С.

Была проведена количественная оценка растворенной части нанокомпозита в растворе NaCl путем определения его оптической плотности по спектрам поглощения в диапазоне длин волн от 300 до 900 нм. Спектры поглощения растворов NaCl, в которых содержались нанокомпозиты, позволили провести уточненный анализ потери массы образцов без учета набора ими жидкости в результате набухания, а также удалось получить более подробную информацию о продуктах биodeградации.

Поскольку прорастание биоткани при имплантации тканеинженерных каркасов начинается со снабжения их кровеносными сосудами, существует необходимость исследования гемосовместимости образцов, а именно гемолиза (разрушения клеток крови и высвобождения гемоглобина), вызванно-

го контактом крови с образцами и продуктами их биодegradации.

Для исследования гемолиза образцы были стерилизованы ультрафиолетовым излучением в течение 20 мин с каждой стороны и помещены в чистые стерильные пробирки. Далее в каждую пробирку с образцом добавляли по 1,5 мл свежей крови человека. В качестве контрольного образца с естественным уровнем гемолиза, происходящим в крови человека, была использована пробирка с кровью без нанокмозитов (отрицательный контроль). Контрольным образцом с полным гемолизом являлась пробирка с кровью без нанокмозитов после проведения процедуры ее замораживания и размораживания (положительный контроль).

После оседания эритроцитов плазму крови из каждой пробирки исследовали спектральным методом с использованием спектрофотометра «Thermo Scientific Genesys 10S UV-vis» в диапазоне длин волн $\lambda = 300...700$ нм с разрешением 0,2 нм. Численный расчет уровня гемолиза в процентах осуществляли на основании значений оптической плотности образцов плазмы на длине волны $\lambda = 540$ нм в соответствии с формулой

$$\delta = \frac{D_{обр} - D_{к(-)}}{D_{к(+)} - D_{к(-)}} \times 100 \%, \quad (1)$$

где $D_{обр}$ – оптическая плотность пробы крови после контакта с образцом нанокмозита; $D_{к(-)}$ – оптическая плотность пробы крови с естественным уровнем гемолиза (отрицательный контроль); $D_{к(+)}$ – оптическая плотность пробы крови с полным гемолизом (положительный контроль).

Результаты

Полученные по описанной методике объемные образцы нанокмозитов имели вид твердых непрозрачных таблеток черного цвета с однородным распределением компонентов. Пленочные образцы нанокмозитов на подложке имели темный цвет, сквозь слой хорошо просматривались переплетения волокон ПЭТФ. Цвет образцов был обусловлен черным цветом углеродных нанотрубок, входящих в состав нанокмозитов.

Расчет потери массы образцов, полученных с использованием лазера и термостата, приведен в *табл. 1*.

Таблица 1

Результаты измерений скорости биодegradации

Состав образца	Метод изготовления	Потеря массы объемного образца, %	Потеря массы пленочного образца, %
БСА	Лазер	75,13	25,19
	Термостат	3,80	18,84
БСА, ОУНТ	Лазер	2,45	8,43
	Термостат	2,52	19,44
БСА, МУНТ	Лазер	9,77	17,99
	Термостат	11,37	22,81

Согласно полученным данным, образцы нанокмозитов на основе УНТ, изготовленные методом лазерного наноструктурирования, продемонстрировали меньшие значения потери массы через 14 суток по сравнению с образцами, высушенными в термостате.

Постепенное растворение образцов под действием раствора NaCl сопровождалось увеличением его оптического коэффициента поглощения. Характерный вид спектров поглощения растворов совпадал с видом спектральных кривых исходных дисперсий на основе БСА и УНТ. Поскольку альбумин является основным компонентом (по массовой доле) нанокмозитов и имеет пик поглощения в видимой области спектра на длине волны $\lambda = 440$ нм, то проанализировав значения оптической плотности раствора NaCl на данной длине волны, можно сделать вывод о характере растворения образцов. На основании полученных значений был построен график зави-

симости оптической плотности на длине волны $\lambda = 440$ нм от времени нахождения образца в растворе NaCl (*рис. 1*).

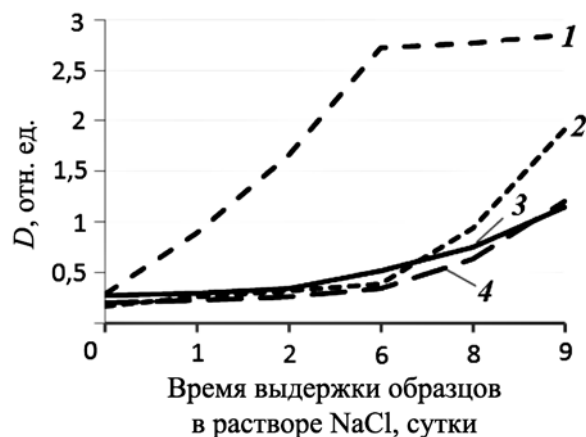


Рис. 1. Динамика изменения оптической плотности раствора NaCl, в котором находились образцы нанокмозитов

На *рис. 1* первые две кривые соответствуют динамике изменения оптической плотности растворов NaCl после выдержки в них нанокмозитов на основе ОУНТ (кривая 1) и МУНТ (кривая 2), полученных термостатным методом, а вторые две кривые – нанокмозитов на основе ОУНТ (кривая 3) и МУНТ (кривая 4), полученных методом лазерного наноструктурирования. Спектральные кривые растворов демонстрируют пологую практически линейную зависимость до 6 суток выдержки нанокмозитов, однако после преодоления данного временного интервала потеря массы образцов происходила интенсивнее.

График изменения оптической плотности раствора NaCl, в который был помещен полученный термостатным методом образец нанокмозита на основе ОУНТ, имеет отличный вид от графиков остальных образцов; данный образец подвергался более активной дегradации через 6 суток, а далее процесс существенно замедлился. Превышающие значения оптической плотности растворов, в которых содержались полученные термостатным методом образцы, согласуются с результатами измерений их потерь массы. Наименьшее изменение оптической плотности было получено для растворов, в которых находились образцы с наименьшей потерей массы, т. е. нанокмозиты, полученные методом лазерного наноструктурирования.

Спектры поглощения плазмы крови после 24-часового контакта с образцами, полученные в процессе исследования гемолиза, представлены на *рис. 2*. На зависимостях *рис. 2а-в* видно отсутствие пиков поглощения в диапазоне длин волн 400...600 нм, которые могли быть отнесены к характерным полосам поглощения соединений гемоглобина. Данные пики присутствуют на кривой спектра поглощения образца с полным гемолизом (*рис. 2г*) [9].

Таблица 2

Значения оптической плотности и уровня гемолиза экспериментальных и контрольных образцов

Состав образца	Объемные образцы		Пленочные образцы	
	D, отн. ед.	δ , %	D, отн. ед.	δ , %
БСА	0,19	0	0,11	0
БСА, ОУНТ	0,20	0,25	0,12	0
БСА, МУНТ	0,22	9,49	0,13	1,20
ПЭТФ	–	–	0,11	0
Отрицательный контроль	0,19	0	0,11	0
Положительный контроль	0,61	100	1,05	100

Измеренные значения оптической плотности (D) на основной длине волны поглощения гемоглобина $\lambda = 540$ нм и значения уровня гемолиза, вычисленные по формуле (1) для экспериментальных и контрольных образцов, приведены в табл. 2.

Полученные результаты указывают на хорошую гемосовместимость объемных и пленочных нанокompозитов на основе ОУНТ (0,25 и 0 % соответственно), поскольку их значения уровня гемолиза соизмеримы со значениями образцов на основе чистого БСА и с отрицательным контролем. Уровень гемолиза для пленочных нанокompозитов на основе МУНТ имеет малое значение, которое составляет 1,20 %, при этом контакт объемного образца с данным типом УНТ вызвал 9,49 % разрушенных эритроцитов с высвобожденным гемоглобином в крови. Вероятнее всего, такой гемолиз нанокompозитов на основе МУНТ связан с форм-фактором нанотрубок, образующих каркас в матрице БСА.

Заключение

Проведена оценка возможности применения нанокompозитов, полученных методом лазерного структурирования ОУНТ и МУНТ в матрице БСА в качестве тканеинженерных каркасов, обеспечивающих при имплантации прорастание в себя сетки кровеносных сосудов в процессе собственной биодеградации.

Скорость биодеградации при помещении нанокompозитов в раствор NaCl была ниже у объемных образцов в сравнении с пленочными и составила 2,45 и 9,77 % потери массы образцов на основе ОУНТ через 14 суток. Значения потери массы нанокompозитов на основе МУНТ были выше – 9,77 и 17,99 % для объемных и пленочных образцов соответственно. Уточненный анализ динамики изменения оптической плотности раствора NaCl, в котором находились образцы, показал интенсивную биодеградацию нанокompозитов после 6 суток выдержки.

Спектральные исследования уровня гемолиза, вызванного контактом крови с нанокompозитами, продемонстрировали хорошую гемосовместимость объемных и пленочных нанокompозитов на основе ОУНТ (0,25 и 0 % соответственно). Однако

уровень гемолиза при контакте объемного нанокompозита на основе МУНТ составил 9,49 %, а пленочного – 1,20 %. Гемолиз, вызванный объемными и пленочными нанокompозитами на основе ОУНТ, не превышает допустимого уровня для изделий, непосредственно взаимодействующих с кровью [10].

Таким образом, можно сделать вывод, что нанокompозиты на основе УНТ в матрице БСА могут успешно использоваться как биорезорбируемые имплантационные материалы, например, для восстановления костной и соединительной тканей или для создания временных биосовместимых покрытий имплантируемых медицинских устройств.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-39-00044).

Список литературы:

1. *Citerio G. et al.* Organ donation in adults: A critical care perspective // Intensive Care Medicine. 2016. Vol. 42. № 3. PP. 305-315.
2. *Berthiaume F., Maguire T.J., Yarmush M.L.* Tissue engineering and regenerative medicine: History, progress, and challenges // Annual review of Chemical and Biomolecular Engineering. 2011. Vol. 2. PP. 403-430.
3. *Kwon I.K., Matsuda T.* Co-electrospun nanofiber fabrics of poly (L-lactide-co- ϵ -caprolactone) with type I collagen or heparin // Biomacromolecules. 2005. Vol. 6. № 4. PP. 2096-2105.
4. *Yang S. et al.* The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors // Tissue Engineering. 2001. Vol. 7. № 6. PP. 679-689.
5. *Jell G. et al.* Carbon nanotube-enhanced polyurethane scaffolds fabricated by thermally induced phase separation // Journal of Materials Chemistry. 2008. Vol. 18. № 16. PP. 1865-1872.
6. *Gerasimenko A. Yu., Ichkitidze L.P., Podgaetsky V.M., Savelyev M.S., Selishchev S.V.* Laser nanostructuring 3-D bioconstruction based on carbon nanotubes in a water matrix of albumin // Proc. of SPIE. 2016. Vol. 9887. PP. 988725-1-988725-10.

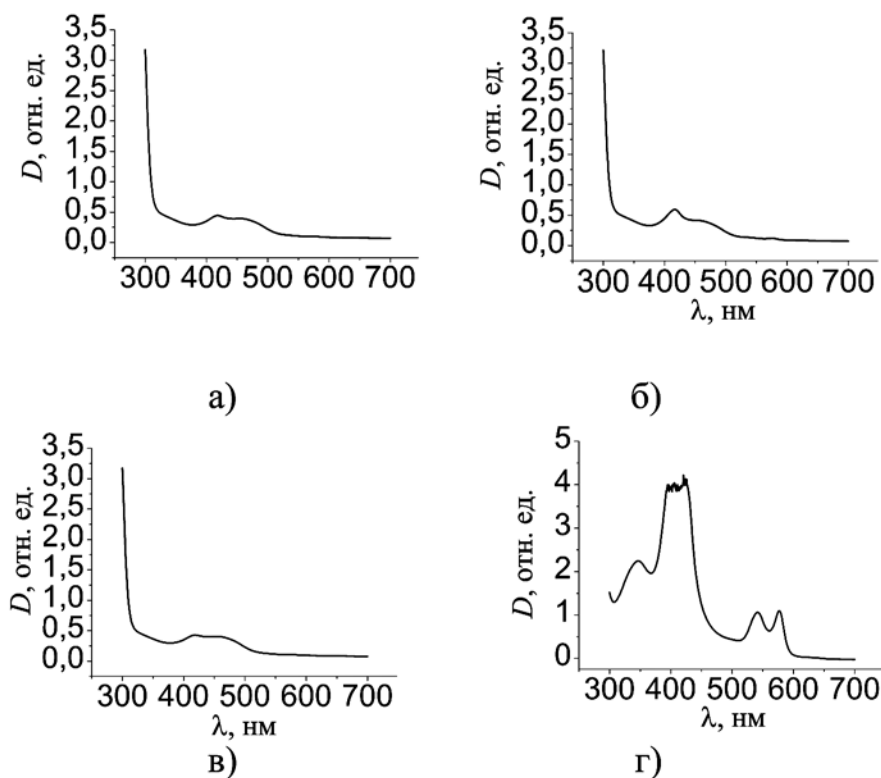


Рис. 2. Спектры поглощения плазмы крови после контакта с пленочными образцами на основе ОУНТ (а), МУНТ (б), отрицательного (в) и положительного (г) контролей

7. *Sin D.C., Kei H.L., Miao X.* Surface coatings for ventricular assist devices // *Expert Review of Medical Devices*. 2009. Vol. 6. № 1. PP. 51-60.
8. *Lu L., Mikos A.G.* The importance of new processing techniques in tissue engineering // *Mrs Bulletin*. 1996. Vol. 21. № 11. PP. 28-32.
9. *Blakney G.B., Dinwoodie A.J.* A spectrophotometric scanning technique for the rapid determination of plasma hemoglobin // *Clinical biochemistry*. 1975. Vol. 8. № 1-6. PP. 96-102.
10. *Севастьянов В.И. и др.* Биосовместимость. – М: ИЦ ВНИИГС, 1999. 368 с.

Ульяна Евгеньевна Курилова,
инженер,

Наталья Николаевна Журбина,
инженер,

кафедра биомедицинских систем,

Национальный исследовательский университет «МИЭТ»,

г. Москва, г. Зеленоград,

Марина Владимировна Мезенцева,

д-р биолог. наук, руководитель,

Леонид Иванович Руссу,
научный сотрудник,

Ирина Александровна Суетина,

канд. биолог. наук, вед. научный сотрудник,
лаборатория культур тканей,

Федеральный научно-исследовательский центр
эпидемиологии и микробиологии им. почетного

академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ,
г. Москва,

Иван Владимирович Пьянов,

канд. физ.-мат. наук, ст. научный сотрудник,
Дмитрий Викторович Тельшев,

канд. техн. наук, ст. научный сотрудник,

Александр Юрьевич Герасименко,

канд. физ.-мат. наук, ст. научный сотрудник,
кафедра биомедицинских систем,

Национальный исследовательский университет «МИЭТ»,

г. Москва, г. Зеленоград,

e-mail: gerasimenko@bms.zone

С.О. Мазуренко, О.Г. Мазуренко, А.А. Енькин, К.Г. Старосельский

Применение двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии для оценки риска переломов у диализных пациентов

Аннотация

В исследовании была поставлена цель – доказать способность двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (ДРА) прогнозировать общий риск переломов у диализных пациентов. Выполнено проспективное исследование 522 пациентов (мужчин – 271, женщин – 251), получающих длительную терапию гемодиализом в диализных центрах Санкт-Петербурга. Пошаговый многовариантный регрессионный анализ Кокса показал, что комбинация показателей минеральной плотности поясничных позвонков, костей дистального отдела предплечья и продолжительности заместительной почечной терапии наилучшим образом предсказывает общий риск переломов. Заключение: ДРА является приемлемым инструментом оценки риска переломов у пациентов, получающих лечение гемодиализом.

Введение

Двухэнергетическая абсорбциометрия вошла в клиническую практику как оптимальный метод выявления остеопороза и прогнозирования риска переломов у женщин постменопаузального возраста [1]. Однако возможность применения этого диагностического метода у больных с уреимией, получающих лечение гемодиализом, для оценки риска переломов вызывает сомнение у ряда авторов [2], [3]. Связано это с особенностями изменения минеральной плотности костей (МПК) у пациентов, страдающих почечной недостаточностью, под влиянием таких факторов, как нарушение функции околощитовидных желез и метаболизма витамина D [4]. При прогрессировании нефросклероза развиваются тяжелые и многогранные нарушения обмена, которые неизбежно приводят к нарушению цикла ремоделирования костной ткани и развитию очевидной костной патологии [5]. При этом риск переломов у больных с уреимией значительно возрастает по сравнению с общей популяцией [6], [7]. В представленном исследовании была поставлена задача: определить возможности двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии в оценке риска переломов у больных с уреимией, получающих длительное лечение гемодиализом.

Материалы и методы

В исследование было включено 522 пациента (мужчин – 271, женщин – 251), получавших лечение гемодиализом, средний возраст которых составил $(44,9 \pm 12,3)$ лет (от 20 до 79 лет).

Средний срок наблюдения от момента выполнения денситометрии составил $(5,9 \pm 4,1)$ лет. МПК оценивали методом денситометрии с использованием двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (аппарат «Hologic Discovery W», США). Исследование скелета осуществляли в трех стандартных зонах: позвонки L1-L4 поясничного отдела позвоночника, проксимальный отдел бедренной кости и дистальный отдел предплечья. Расчеты диагностических индексов *T* и *Z* были выполнены автоматически по стандартным формулам. Индекс *T* показывает отличие значений минеральной плотности костей исследуемого пациента от «нормальных» значений МПК молодого взрослого (30 лет) человека того же пола, индекс *Z* – отличие от возрастной нормы. Нормой считали значения, отклоняющиеся менее чем на 1 SD. Для рентгенографии использовали аппараты «Diagnost 56» («Philips») и «Prestilics» («General Electric»). Диагностику переломов позвонков выполняли полуколичественным методом по методике Genant (H.K. Genant et al., 1993). Рассчитывались чувствительность и специфичность метода в оценке риска по стандартной методике (D.G. Altman, 1994). Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с помощью программы «STATISTICA for Windows», версия 10.0.1011.0 («Statsoft Inc.», Tulsa, США). Для анализа вида распределения количественных данных использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Межгрупповые различия оценивали с использованием параметрических (двухвыборочный *t*-критерий Стьюдента) и непараметрических методов анализа (Манна-Уитни). Также оценивали абсолютный риск переломов. Для оценки прогности-