

ИНЪЕКЦИОННЫЙ, РАСТЯЖИМЫЙ, УСИЛЕННЫЙ, БИОАДГЕЗИВНЫЙ КОМПОЗИТНЫЙ ГИДРОГЕЛЬ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Мамаризаев Дилшод Юнусович

Самаркандский государственный медицинский университет

Мочевой пузырь подвергается постоянным внутренним и внешним механическим силам из-за своей деформации и динамичной среды, в которой он находится, что может затруднить его восстановление после травмы. Традиционные гидрогелевые материалы имеют ограничения в использовании в мочевом пузыре из-за их плохих механических и адгезивных свойств. В этом исследовании был разработан композитный гидрогель, состоящий из метакрилатного желатина, метакрилатного шелкового фиброина и диакрилата Pluronic F127, который сочетает в себе характеристики натуральных и синтетических полимеров. Механические свойства нового гидрогеля, такие как растяжимость, вязкоэластичность и прочность, были улучшены благодаря особой стратегии молекулярного дизайна, при которой ковалентные и нековалентные взаимодействия создают эффект сшивания. Кроме того, композитный гидрогель обладает важными эксплуатационными свойствами; его можно вводить в жидком виде и быстро преобразовывать в гель с помощью фотиницируемого сшивания. Это было продемонстрировано на изолированном свином мочевом пузыре, где гидрогель закрыл произвольные дефекты ткани в течение 90 секунд после его применения, подтверждая его эффективные биоадгезивные и запечатывающие свойства. Этот композитный гидрогель имеет большой потенциал для применения в восстановлении повреждений мочевого пузыря в качестве каркаса для тканевой инженерии.

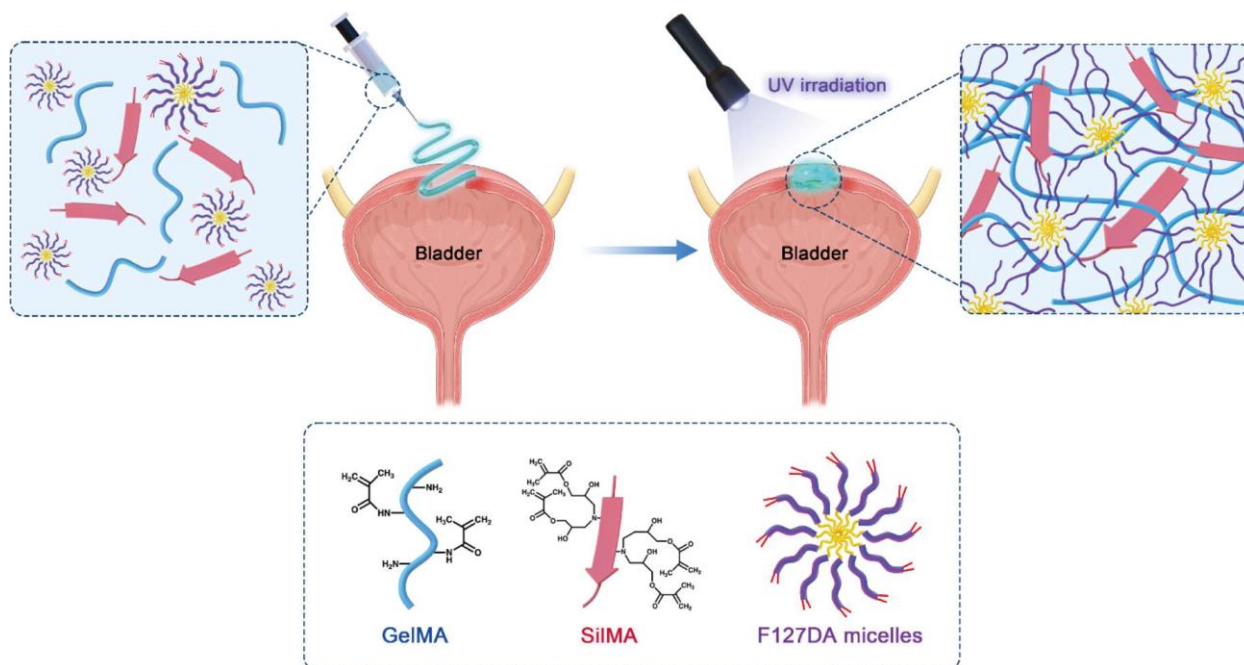
Введение

Мочевой пузырь — это полый орган, отвечающий за хранение и выделение мочи. Травмы, злокачественные опухоли, нейрогенные заболевания и врожденные аномалии вызывают анатомические или функциональные нарушения мочевого пузыря и требуют лечения, связанного с заменой мочевого пузыря. Однако этот хирургический подход несет риск осложнений, таких как метаболические нарушения, образование камней в желчном пузыре и мочевые свищи. Поэтому необходимо искать новые методы для достижения восстановления и регенерации мочевого пузыря. Тканевая инженерия, которая интегрирует стволовые клетки, материалы каркаса и биоактивные молекулы, предлагает возможное решение для регенеративной медицины, и материалы каркаса были широко изучены как важный компонент этого подхода. Гидрогели считаются предпочтительным материалом для каркасов тканевой инженерии, имея трехмерную сетевую структуру, включающую большое количество гидрофильных групп, и их сходство с натуральной внеклеточной матрицей. Однако традиционные гидрогели часто демонстрируют плохие механические свойства, такие как хрупкость и высокий коэффициент набухания. Более того, поскольку мочевой пузырь подвергается физической активности и постоянно деформируется, он подвержен механическим силам, таким как растягивающие и сжимающие силы. Неспособность поврежденного мочевого пузыря адаптироваться к динамическим механическим изменениям может увеличить вероятность местных воспалительных реакций из-за утечек. Поэтому гидрогель, подходящий для реконструкции мочевого пузыря, должен удовлетворять следующим четырем критериям: (1) адаптивность в отношении его механических свойств (т.е. высокие уровни прочности, растяжимости, вязкоэластичности и усталостной прочности), (2) хорошая биосовместимость, (3) надежные адгезивные и запечатывающие свойства и (4) биodeградируемость. Гидрогели можно классифицировать на натуральные и синтетические полимерные гидрогели. Натуральные полимерные гидрогели обладают

высокой биосовместимостью и биологическими свойствами. Однако у них есть недостатки, такие как быстрая деградация, длительное время формирования геля и плохие механические характеристики. Механические и физико-химические свойства синтетических полимерных гидрогелей можно лучше контролировать. Но у них нет естественных мест для прикрепления клеток и они менее биосовместимы, что ограничивает их применение в тканевой инженерии. Цель этого исследования — создать смесь натуральных и синтетических полимерных гидрогелей, подходящих для восстановления дефектов мочевого пузыря, которая сочетает в себе преимущества обоих. С точки зрения восстановления мочевого пузыря, желатин и шелковый белок, которые являются важными компонентами внеклеточной матрицы ткани мочевого пузыря, были выбраны в качестве подходящих натуральных полимеров.

были синтезированы, оба обладая свойствами фото-сшивания и хорошей биосовместимостью. Однако, GelMA подвержен механическим повреждениям из-за своей гетерогенной плотности сшивания и обширного уровня запутанности, в то время как SilMA страдает от отсутствия клеточных адгезионных сайтов, тенденции к быстрому разложению и большого коэффициента набухания. Полоксамер Pluronic F127 (PEO 99 – PPO 65 – PEO 99) является одобренным FDA амфифильным блочным сополимером, а синтетический полимерный гидрогель F127DA образуется самосборкой F127 через гидрофобную ассоциацию. Гидрогель включает в себя мицеллярную структуру с гидрофобным полипропиленгликолем (PPO) в качестве ядра и гидрофильным полиэтиленгликолем (PEO) в качестве оболочки. Он имеет четко определенную структуру с небольшими вариациями от партии к партии и низким риском иммунного ответа со стороны человеческого организма. Однако, сеть гидрогеля F127 характеризуется низкой прочностью, высоким уровнем случайной молекулярной запутанности и гидрофобными взаимодействиями между слоями оболочки, что приводит к плохой стабильности и быстрому

разрушению сетевой структуры в водном растворе. Более того, отсутствие активных сайтов для клеточных взаимодействий не способствует росту клеток, что означает, что его способность к интеграции с окружающими тканями плоха. Показано, что введение ковалентных и нековалентных взаимодействий в сеть гидрогеля является эффективной стратегией для улучшения механических свойств гидрогеля. Например, Qi и др. подготовили гидрогель, смешивая кватернизированный хитозан с поли(этиленоксидом), законченным бензальдегидом, поли(пропиленоксидом) и поли(этиленоксидом). Связывание по базе Шиффа и сшивание мицелл PF127 в этой системе, как два динамических режима сшивания, привели к гидрогелю, который проявлял хорошую пластичность, сжимаемость и способность к самовосстановлению при многоцикловой деформации. В этом исследовании были разработаны композитные гидрогели, содержащие GelMA, SilMA и F127DA. GelMA и SilMA ковалентно сшиты фотоиницированными виниловыми двойными связями на их молекулярных цепях для генерации ковалентной полимерной сети, включающей два компонента. Фотоиницированные молекулы F127DA вызывают межмицеллярное сшивание, соседнее межмицеллярное сшивание оболочек и внутримицеллярное сшивание, что приводит к динамической нековалентной полимерной сети (Схема 1).



Scheme 1 Components of composite hydrogels, formation of hydrogels based on covalent crosslinking and physical micellization initiated by UV irradiation, and a schematic diagram of their application in bladder tissue defects.

Химические и физические свойства композитных гидрогелей были охарактеризованы, включая их специфическую химическую структуру, равновесный коэффициент набухания и разлагаемость. Для исследования проблем ремонта динамических мягких тканей в сложных механических условиях были сравнены биоадгезивные и запечатывающие свойства гидрогелей с использованием модели органа свиного мочевого пузыря. Биосовместимость гидрогелей также была исследована для проверки целесообразности их применения в строительстве и регенерации мягких тканей.

Экспериментальная часть

Материалы

Гелатин типа А, полученный из свиной кожи, был приобретен у Veyotime Biotechnology (Шанхай, Китай). Кокконы Bombyx mori были получены из Северо-Западной базы шелководства (Шаньси, Китай). Метакриловый ангидрид (МА) (чистота $\geq 94\%$) и глицидилметакрилат

(GMA) (чистота $\geq 97\%$) были приобретены у Aladdin Biochemical Technology (Шанхай, Китай). F127DA был приобретен у Engineering for Life (Сучжоу, Китай). Бромид лития (LiBr; чистота $\geq 99\%$) был приобретен у Innochem Technology (Пекин, Китай). Коллагеназа типа II была приобретена у Worthington Biochemical (Нью-Йорк).

Схема 1

Компоненты композитных гидрогелей, формирование гидрогелей на основе ковалентного сшивания и физической мицелляризации, инициированной УФ-облучением, и схематическая диаграмма их применения в дефектах ткани мочевого пузыря.

Джерси, США). Фетальная бычья сыворотка (FBS) была приобретена у Bovogen Biologicals (Мельбурн, Австралия). Набор для подсчета клеток Kit-8 (ССК-8), модифицированная среда Дульбекко (DMEM), трипсин – ЭДТА, пенициллин – стрептомицин и наборы для оценки жизнеспособности/цитотоксичности живых/мертвых клеток были приобретены у Thermo Fisher Scientific (Массачусетс, США). Все реактивы использовались без дополнительной очистки.

GelMA был приготовлен в соответствии с соответствующей литературой. 22 – 24 Кратко, 10 г желатина типа А (полученного из свиной кожи) были взвешены и добавлены в 100 мл фосфатно-солевого буфера (PBS) при 50 °С для приготовления 10% (м/об) однородного раствора. Затем 1 мл МА добавляли капельно в раствор желатина и полностью реагировали в реакционном сосуде, покрытом алюминиевой фольгой, при 50 °С в течение 3 часов. После завершения реакции полученный раствор был перенесен в диализный мешок (MWCO: 8 – 14 кДа) и диализирован с деионизированной водой в течение примерно одной недели. В течение этого периода потребовалась замена воды трижды для удаления нереагировавшего МА и других побочных продуктов. Наконец, диализный раствор был заморожен на 10 часов и лиофилизирован с помощью лиофилизатора в течение примерно 5 дней. Полученные образцы хранились

в холодильнике при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до дальнейшего использования. Химическая структура GelMA была определена с помощью инфракрасной спектроскопии Фурье (FTIR, Thermo Scientific Nicolet iS20) и ядерно-магнитного резонанса ($^1\text{H NMR}$, Bruker Avance III HD 500 МГц).

SilMA был приготовлен в соответствии с протоколом, описанным в литературе. 25 Кратко, коконы были нарезаны и добавлены в кипящий раствор $0,05\text{ M Na}_2\text{CO}_3$. Через 45 минут дегумированные коконы были удалены, промыты до чистоты с серицином и Na_2CO_3 , приготовленным с деионизированной водой, и высушены в сушильной печи при $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Затем 5 г дегумированных шелковых белковых волокон были добавлены в 25 мл $9,3\text{ M}$ раствора LiBr и растворены при $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, пока шелковые белковые волокна больше не могли быть наблюдаемы невооруженным глазом. Затем волокна были перенесены на нагреваемую магнитную мешалку, и 2 мл GMA добавляли капельно с постоянным перемешиванием при $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 3 часов, чтобы полностью реакция GMA с шелковым белком. Наконец, полученный раствор был диализирован (MWCO: 8 – 14 кДа) в течение одной недели и затем лиофилизирован в течение 5 дней. Полученные образцы хранились в холодильнике при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до дальнейшего использования. Химическая структура SilMA была определена с помощью FTIR и $^1\text{H NMR}$.

Гидрогели были разделены на три группы: GS, GF и GSF. Для раствора предшественника гидрогеля GS лиофилизированные GelMA и SilMA были растворены в растворе PBS при $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, после чего добавлялся фотоинициатор литий-триметилбензоилфосфинат (LAP). Финальный предшественник гидрогеля состоял из 5% (м/об) GelMA и 10% (м/об) SilMA. Раствор предшественника гидрогеля GF, который был приготовлен так же, как и для GS, содержал 5% (м/об) GelMA и 5% (м/об) F127DA. Для раствора предшественника гидрогеля GSF GelMA и SilMA сначала были предварительно смешаны в установленных пропорциях, после чего добавлялся F127DA до его растворения, с конечной концентрацией 5% (м/об) GelMA, 10% (м/об) SilMA и 5% (м/об) F127DA. Концентрация

фотоинициаторов LAP в растворах предшественников гидрогеля всех трех групп составила 0,25% (м/об). Наконец, предшественники гидрогеля были облучены УФ-светом (405 нм, 100 мВт см⁻², 90 с), чтобы получить образец композитного гидрогеля.

Образцы гидрогеля из трех групп были заморожены при – 20 °С в течение 24 часов, после чего они были немедленно перенесены в лиофилизатор и лиофилизированы в течение 48 часов. Морфология и внутренняя структура лиофилизированных образцов были исследованы с помощью сканирующей электронной микроскопии (SEM) (Zeiss Gemini 300, Германия) после распыления сечений образцов золотыми частицами.

$$\text{Коэффициент набухания} = ((W_i - W_d) / W_d) \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{Коэффициент деградации} = ((W_0 - W_t) / W_0) \times 100\% \quad (2)$$

Реологические свойства измерялись с помощью реометра MCR 302 (Anton Paar, Австрия). Сначала был проведен тест на кинематическую вязкость (ротационный режим, 37 °С), и скорость сдвига измерялась в диапазоне 0,1 – 1000/с. Инъекционная способность растворов предшественников гидрогеля характеризовалась в соответствии с логарифмическим изменением скорости сдвига. Затем сшитые гидрогели были нарезаны на небольшие диски (диаметр = 20 мм, высота = 2 мм), и кривые зависимости модуля от частоты были измерены с помощью частотного сканирования (осцилляционный режим, 37 °С, постоянная деформация 1%) в диапазоне 0,1 – 100 Гц.

Испытания на прочность на растяжение проводились с использованием универсального механического испытательного устройства, оснащенного датчиком натяжения на 1 кН. Образцы гидрогеля из каждой группы были подготовлены в форме гантели (длина измерительной части = 12 мм, ширина измерительной части = 2 мм, толщина измерительной части = 2,5 мм) с использованием формы из политетрафторэтилена и растянуты до разрушения со скоростью 5 мм/мин. Прочность на растяжение определялась как максимальное напряжение при

разрушении, модуль Юнга определялся по наклону кривой напряжение-деформация, а прочность на разрушение рассчитывалась по площади, заключенной между кривой напряжение-деформация. Испытания на сжатие (с использованием того же механического испытательного устройства) проводились на цилиндрических образцах (диаметр = 12 мм, высота = 5 мм) образцов гидрогеля из каждой группы со скоростью 3 мм/мин. Модуль сжатия определялся по наклону кривой напряжение-деформация, соответствующей диапазону деформации 20-30%. Испытание на цикле нагружения-разгрузки проводилось при максимальной деформации 70%, и сжатие и нагрузка фиксировались в течение пяти циклов. Потеря энергии была получена из площади под кривой для 5-го цикла следующим образом:

Потеря энергии = ((площадь под кривой нагрузки - площадь под кривой разгрузки) / площадь под кривой нагрузки) × 100% (3)

Испытания на растяжение и сжатие проводились в тройном экземпляре для всех образцов гидрогеля из каждой группы, и среднее значение использовалось в расчетах.

Для оценки биосовместимости гидрогелей образцы гидрогеля из каждой группы были подготовлены, как описано выше, и после стерилизации ультрафиолетовым светом были погружены в DMEM (содержащий 10% FBS и 10 Ед/мл пенициллин-стрептомицин) на 24 часа при 37 °С. Полученные экстракты гидрогеля были отфильтрованы (0,22 мкм), чтобы удалить биологические загрязнения. Жизнеспособность клеток затем наблюдалась с использованием набора для цитотоксичности live/dead, окрашиванием с помощью калцеина АМ и бромидом этидия гомодимера-1 на 1, 3 и 5 дни, и визуализировалась с помощью флуоресцентного микроскопа. Для дальнейшего количественного анализа пролиферация стволовых клеток, полученных из жировой ткани (ADSC), оценивалась с использованием метода ССК-8. Кратко, ADSC были инокулированы в 96-луночные пластины и инкубированы (37 °С, 5% CO₂, 24 часа) для получения монослоя клеток. На следующем этапе инкубации питательная среда была

заменена на экстракты гидрогеля. Экстракты удалялись из культуры на 1, 3 и 5 дни, добавлялся реагент ССК-8, и пролиферация клеток рассчитывалась путем измерения абсорбции раствора при 450 нм с использованием считывателя микропластин. Для экспериментов по царапанию клеток фибробласты L929 были посеяны в 6-луночные пластины и культивировались. Как только слияние клеток было завершено, кончик пипетки на 200 мкл использовался для царапания клеток перпендикулярно дну лунок. Затем 100 мкл раствора предшественника гидрогеля и безсывороточной среды были смешаны и добавлены в лунки, после чего проводилась инкубация (37 °С, 5% CO₂) в течение 12 и 24 часов. После этого клетки были сфотографированы с использованием микроскопа. Площадь миграции рассчитывалась с использованием программного обеспечения ImageJ (версия 1.52).

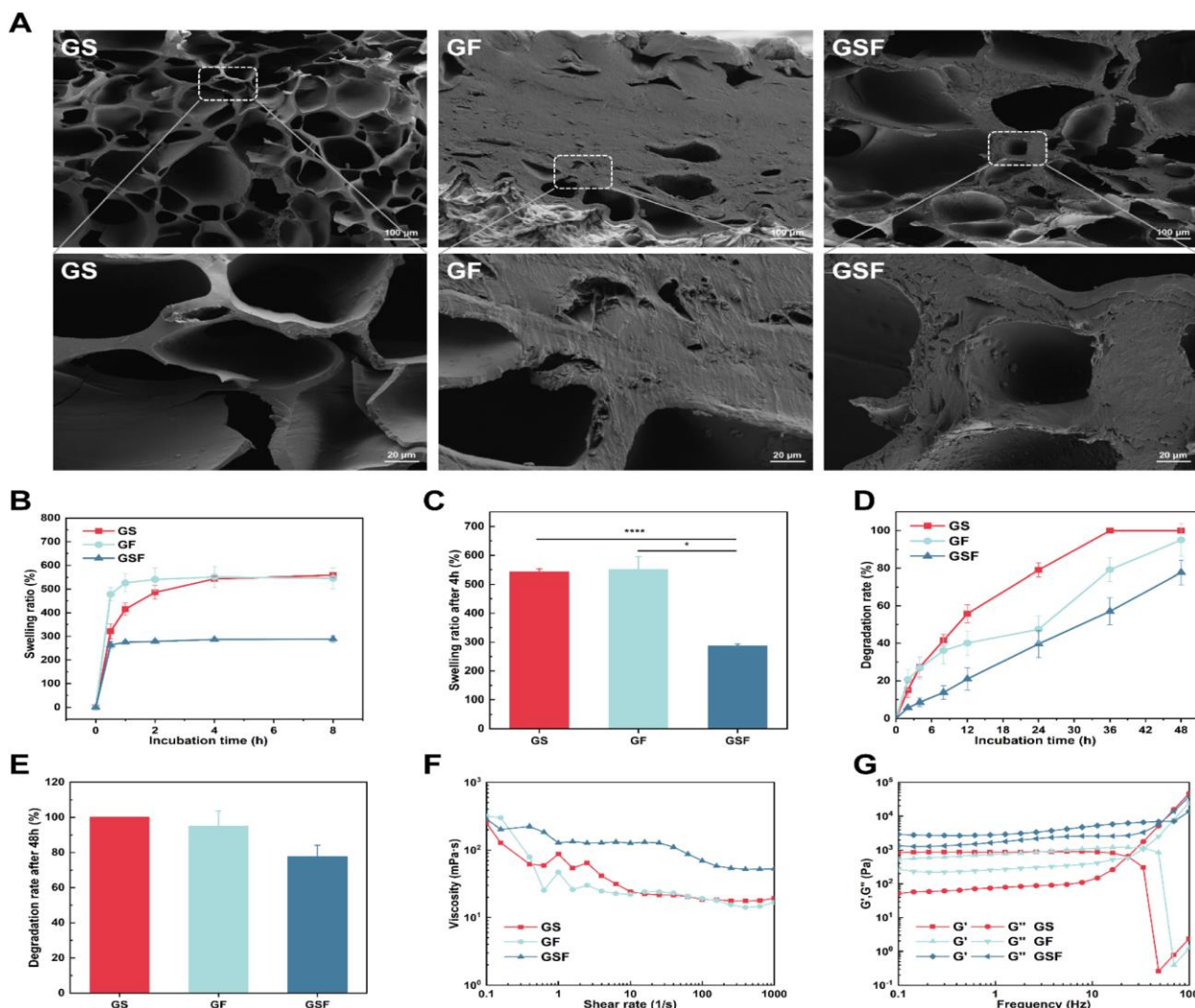


Fig. 1 Correlation characterisation of the GS, GF, and GSF hydrogels: (A) SEM images and partially enlarged SEM images of hydrogel morphology, (B) time-dependent swelling curve of hydrogels in PBS (pH = 7.4) at 37 °C, (C) swelling rate of hydrogels after 4 h incubation, (D) time-dependent degradation curve of hydrogels in PBS containing type II collagenase at 37 °C, (E) degradation rate of hydrogels after 48 hours incubation, (F) variation curve of viscosity of hydrogel with shear rate at 37 °C, (G) variation curve of viscoelasticity of hydrogel with frequency at 37 °C and constant strain of%.

$$\text{Скорость миграции} = ((W0h - Wnh) / W0h) \times 100\% \quad (4)$$

W0h - это начальная площадь до миграции клеток, а Wnh - это пустая площадь, подсчитанная в данный момент времени. Все испытания повторялись трижды.

Тест на сдвиг в нахлест проводился на основе стандартного метода испытания для определения прочностных свойств адгезивов для тканей в нахлест при натяжной нагрузке (согласно ASTM F2255-05). Кратко, свежие свиные мочевые пузырьки были нарезаны на прямоугольники размером 12,5 мм × 35 мм и погружены в PBS. Раствор предшественника гидрогеля (250 мкл) был инъецирован на увлажненные прямоугольники свиного мочевого пузыря, и слайды, покрытые желатином, были помещены на гидрогель с перекрывающейся площадью 12,5 мм × 20 мм. Перекрывающаяся площадь подвергалась воздействию ультрафиолетового света в течение 90 секунд и оставлялась при комнатной температуре на 15 минут перед проведением теста на сдвиг в нахлест со скоростью растяжения 60 мм/мин. Адгезионные свойства гидрогелей оценивались на основе их максимальной прочности на сдвиг в точке разделения.

Свежая ткань свиного мочевого пузыря использовалась в качестве биологической ткани для измерения прочности адгезии на закрытие раны гидрогелей. Увлажненная ткань свиного мочевого пузыря (20 мм × 50 мм) была разрезана в центре, чтобы смоделировать поврежденную рану. Затем

раствор предшественника гидрогеля (150 мкл) был инъецирован в середину разреза. Левые и правые адгезионные области были эквивалентны друг другу, а площадь соединения составила 4×20 мм. После облучения геля ультрафиолетовым светом и оставления его при $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 15 минут, два куска ткани были раздвинуты в направлении сдвига со скоростью 60 мм/мин, пока гидрогель полностью не отсоединился. Прочность адгезии на закрытие раны рассчитывалась по следующей формуле:

$$\text{Прочность адгезии на закрытие раны} = 2F / S \quad (5)$$

F - это максимальное напряжение, а S - это адгезионная площадь гидрогеля.

Модель устройства для разрыва была разработана на основе стандартного метода испытания на прочность закрытия раны хирургических адгезивов и герметиков (ASTM F2458-05) и 3D напечатана из металла. Свежая ткань мочевого пузыря была нарезана на круглые срезы, зафиксирована на измерительном устройстве, и в центре ткани с помощью хирургических ножниц был создан круговой дефект (диаметр = 2 мм). Раствор предшественника гидрогеля (50 мкл) был инъецирован в круговой дефект и подвергнут воздействию ультрафиолетового света для сшивания. Наконеч, тестовый газ был перфузироваан в мочевой пузырь с постоянной скоростью, и разрывное давление фиксировалось с использованием датчика давления. Разрывное давление было максимальным давлением непосредственно перед падением давления.

Сначала в изолированном свином мочевом пузыре был сделан разрывной разрез (диаметр = 3 мм) с помощью хирургических ножниц, а затем раствор предшественника гидрогеля (100 мкл) был инъецирован в 10906 | RSC Adv.

Разрез и запечатан с помощью источника УФ-света, используемого для индукции сшивания. Чистая вода была введена в мочевой пузырь для наблюдения за эффектом герметизации гидрогеля. Впоследствии тестовый газ был введен в мочевой пузырь с постоянной скоростью с использованием

шприцевого насоса, и значения давления разрыва были зафиксированы с помощью датчика давления. Свинцовые ткани, использованные во всех вышеупомянутых экс-виво экспериментах, были собраны от утилизированных животных на бойнях.

$P < 0.001$ и **** $P < 0.0001$).

Результаты и обсуждение

Синтез и характеристика гидрогелей Чтобы подготовить образцы композитного гидрогеля с инъекционными и биоадгезивными свойствами, GelMA был синтезирован с использованием желатина типа А, полученного из свиной кожи, и МА. FTIR и ^1H NMR были использованы для подтверждения реакции модификации желатина с МА. Спектр FTIR GelMA (Рис. S1A †) содержал пики на 1628 (амид I), 1538 (амид II) и 1480 cm^{-1} (амид III), что связано с колебаниями растяжения связи $\text{C}=\text{O}$, изгибом связи $\text{N}-\text{H}$ и изгибом в плоскости связей $\text{C}-\text{N}$ и $\text{N}-\text{H}$ в химической структуре соответственно. Положение пика амида осталось неизменным после модификации МА, но интенсивность пика в области амида I увеличилась, что связано с колебанием напряжения связи $\text{C}=\text{C}$ группы метакрилата. Двойные пики GelMA, которые были вызваны алкенильной двойной связью ($\text{C}=\text{C}$) метакрилатных групп, конъюгированных с желатином, могли быть четко наблюдаемы на 5.43 и 5.67 ppm спектра ^1H -NMR (Рис. S1B †). Результаты показали, что GelMA был успешно синтезирован, и была введена двойная связь. Синтезированный SilMA был аналогично проверен с использованием FTIR и ^1H NMR (Рис. S2A и B, † соответственно). Спектр FTIR содержал пики на 1642 (амид I), 1511 (амид II) и 1232 cm^{-1} (амид III) для шелкового фиброина и SilMA. Растяжение $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ в группе алкоголя, после открытия эпоксидной группы GMA, привело к более слабому пику на 1293 cm^{-1} . В отличие от этого, небольшие изменения на 950 и 1112 cm^{-1} связаны с колебанием $\text{C}-\text{H}_2$ и растяжением метакрилатных виниловых групп соответственно. В сравнении со спектром ^1H NMR шелкового фиброина, спектр ^1H NMR SilMA показал характерное резонирование виниловой

группы метакрилата на 6.13 и 5.69 ppm, а также метильной группы GMA на 1.89 ppm. В заключение, результаты демонстрируют, что GMA успешно модифицировал винил на молекулах шелкового фиброина.

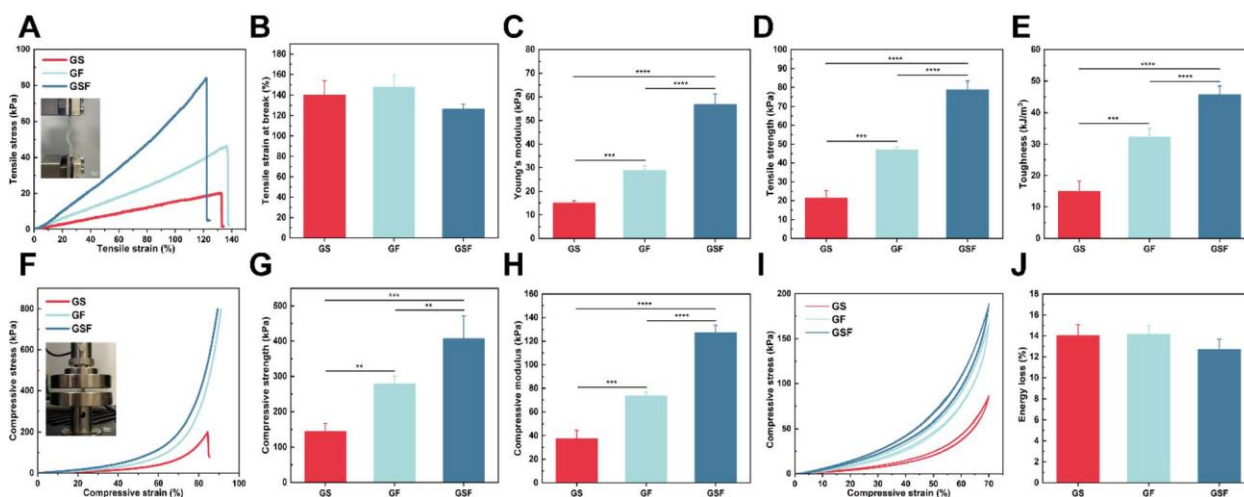


Fig. 2 Mechanical properties of the GS, GF, and GSF hydrogels: (A) representative tensile stress–strain curves of hydrogels, (B) tensile strain at break, (C) Young's modulus, (D) tensile strength, (E) toughness, (F) representative compressive stress–strain curves of hydrogels, (G) compressive strength (the compression strain is set to 80%), (H) compressive modulus, (I) representative compressive cyclic loading-unloading curves, (J) energy loss of the 5th cycle of hydrogels.

Анализы SEM Замороженный и высушенный гидрогель GF был сформирован в твердый блок, и SEM показал, что микроструктура имеет плотную укладку без значительной пористой структуры, что может быть связано с гидрофобной областью в молекуле F127DA, которая препятствует образованию кристаллов льда во время замораживания и не способствует образованию пористых структур (Рис. 1A). Внутренние диаметры пор гидрогелей GS и GSF находились в диапазоне 28.04 – 256.57 и 47.43 – 307.54 мкм соответственно (Рис. S3 †). Пористая структура обеспечивает канал для обмена кислородом, углекислым газом и питательными веществами и создает подходящую микроокружение для клеточной адгезии, пролиферации, дифференцировки и ремоделирования тканей.

Коэффициент набухания и тесты на деградацию. Набухание и деградация гидрогелей могут непосредственно влиять на процессы восстановления и регенерации тканей. Высоко набухшая форма гидрогеля (после абсорбции воды) может вызвать напряжение на интерфейсе ткань – гидрогель, что может привести к деламинации и отслаиванию адгезивного геля. Постоянное набухание мочевого пузыря, вызванное мочой, создает проблему как для поврежденного мочевого пузыря (который имеет нарушенные механические свойства), так и для оптимального функционирования биосcaffold'ов, которые используются в клинической практике для восстановления мочевого пузыря. Результаты теста на коэффициент набухания показали, что гидрогели GS, GF и GSF достигли базового равновесия набухания через 4 часа (Рис. 1B). Коэффициент равновесного набухания гидрогеля GSF (287%) был значительно ниже, чем у двух других гидрогелей, что может быть связано с более высокой плотностью сшивания его сетевой структуры гидрогеля (Рис. 1C). Таким образом, гидрогель GSF с низким коэффициентом набухания продемонстрировал лучшее сохранение формы и был более подходящим для восстановления и регенерации после травмы мочевого пузыря. Подходящие свойства деградации обеспечивают достаточное пространство для миграции и пролиферации клеток и достаточную площадь для роста новой ткани. В текущем исследовании мы провели *in vitro* тест на ферментативную деградацию с использованием коллагеназы типа II. Все гидрогели продемонстрировали биодеградацию с течением времени; однако гидрогель GS имел самый быстрый темп деградации и был полностью деградирован через 36 часов. Темп деградации гидрогеля GSF был самым медленным, при этом 22.3% гидрогеля оставалось недеградированным через 48 часов (Рис. 1D и E). Из результатов видно, что полностью натуральные гидрогели деградировали быстрее всего в присутствии коллагеназы, в то время как темп деградации гидрогелей, введенных с наномицеллами, был относительно медленным. Подходящий темп

деградации должен соответствовать темпу регенерации тканей в организме. Композитные гидрогели продемонстрировали настраиваемую биodeградируемость, и оптимальный темп деградации необходимо подтвердить в последующих исследованиях на животных.

Реологические свойства Реологические тесты были проведены на каждой из трех групп гидрогелей для исследования их инъекционной способности и viscoelasticных свойств. Сдвиговое разжижение является характерным параметром для определения инъекционной способности. Рис. 1F показывает, что предшествующие жидкости гидрогеля демонстрируют текучесть и также характеристики сдвигового разжижения под действием сдвиговой силы. Это указывает на то, что все три группы предшественников гидрогеля могут быть инъецированы в

Произвольно сформированные дефектные участки для обеспечения эффективной адгезии для не плоских сложногеометрических ран. Вискоэластичность является универсальной характеристикой многих тканей и внеклеточных матриц и влияет на функцию и поведение клеток во время регенерации; мочевого пузыря сам по себе имеет viscoelasticкие характеристики. Как показано в тесте сканирования осцилляционной частоты (Рис. 1G), модуль хранения энергии G' был выше, чем модуль потерь энергии G'' для всех гидрогелей в определенном диапазоне частот, демонстрируя характеристики, подобные твердым телам, и формируя стабильную сетевую структуру. Среди них гидрогель GSF имел самый высокий G' , что указывает на то, что он обладал относительно более сильными механическими свойствами.

Механические свойства

Мочевой пузырь имеет механические свойства (т.е. базовая жесткость и гибкость) и стабильность, позволяя ему противостоять механическим

Рис. 1 Корреляционная характеристика гидрогелей GS, GF и GSF: (A) изображения SEM и частично увеличенные изображения SEM морфологии

гидрогеля, (B) временная кривая набухания гидрогелей в PBS (pH = 7.4) при 37 °C, (C) скорость набухания гидрогелей после 4 часов инкубации, (D) временная кривая деградации гидрогелей в PBS, содержащем коллагеназу типа II, при 37 °C, (E) скорость деградации гидрогелей после 48 часов инкубации, (F) кривая изменения вязкости гидрогеля с учетом скорости сдвига при 37 °C, (G) кривая изменения вискоэластичности гидрогеля с частотой при 37 °C и постоянной деформации %.

Силы и частые деформации, которым он подвергается. 37 Композитный гидрогель также должен обладать хорошими прочностными свойствами, чтобы соответствовать циклическим требованиям хранения и опорожнения мочи мочевого пузыря. В этом исследовании были проведены испытания на растяжение гидрогелей. Кривые деформации – напряжения на рис. 2A показывают, что добавление как SilMA, так и F127DA улучшило хрупкость GelMA. Деформации на растяжение 139,7 и 147,6% непосредственно перед точкой разрыва были достигнуты для гидрогелей GS и GF соответственно (рис. 2B). Взаимопроникающая сеть и диссипативные единицы значительно увеличили прочность на растяжение с 21,4 кПа до 78,7 кПа, придавая соответствующую деформацию на растяжение (126,3%) (рис. 2D). Модуль Юнга гидрогелей GS и GF составил 15 и 29 кПа соответственно. Модуль Юнга гидрогеля GSF достиг 56,9 кПа благодаря увеличению плотности сшитой сети (рис. 2C). Кроме того, прочность на разрыв гидрогелей GS, GF и GSF составила 15,01, 32,25 и 45,67 кДж м – 3 соответственно (рис. 2E). Эти экспериментальные результаты были лучше, чем у гидрогельных материалов, ранее использованных в исследованиях по инженерии тканей мочевого пузыря. 38,39 Также было продемонстрировано, что добавление мицелл SilMA и F127DA в соответствующих концентрациях придает гидрогелям отличную прочность на растяжение и прочность на разрыв. Известно, что положение мочевого пузыря меняется в зависимости от позы тела. Когда мочевой пузырь сталкивается с неожиданными ситуациями, такими как удар, он, как

несущий мягкий ткань, должен противостоять давлению, оказываемому окружающими тканями, чтобы предотвратить разрыв органа. Из кривых напряжения – деформации испытания на сжатие (рис. 2F) очевидно, что введенная наномицеллярная сеть F127DA является ключом к повышению сопротивления сжатию. Во время сжатия при установленной максимальной деформации как гидрогели GF, так и GSF не показали повреждений разрыва. В отличие от этого, гидрогель GS обычно разрывался, когда деформация при сжатии достигала примерно 86%. При 80% деформации сжатия гидрогель GSF продемонстрировал наивысшую прочность на сжатие (рис. 2G). По сравнению с другими двумя гидрогелями, сжимаемый модуль гидрогелей GSF увеличился с 37,6 до 127,1 кПа (рис. 2H). Вышеуказанные результаты указывают на то, что эти сети сшивания, включая межмицеллярное сшивание, межмицеллярное сшивание оболочек, внутримицеллярное сшивание и ковалентное сшивание, синергетически усиливают сжимаемые свойства гидрогеля. Гидрогели продемонстрировали улучшенную прочность при сохранении своей первоначальной гибкости. Впоследствии были проведены испытания на циклическое сжатие и разгрузку. Благодаря обратимому характеру гидрофобной ассоциации восстановленный гидрогель показал кривую напряжения – деформации, аналогичную таковой у оригинального гидрогеля в течение пяти циклов загрузки-разгрузки с приложенной деформацией 70% (рис. 2I). Это доказывает, что структура может быть восстановлена после конформационной деформации. Другими словами, композитный гидрогель продемонстрировал отличное сопротивление усталости и самовосстановление (рис. 2J).

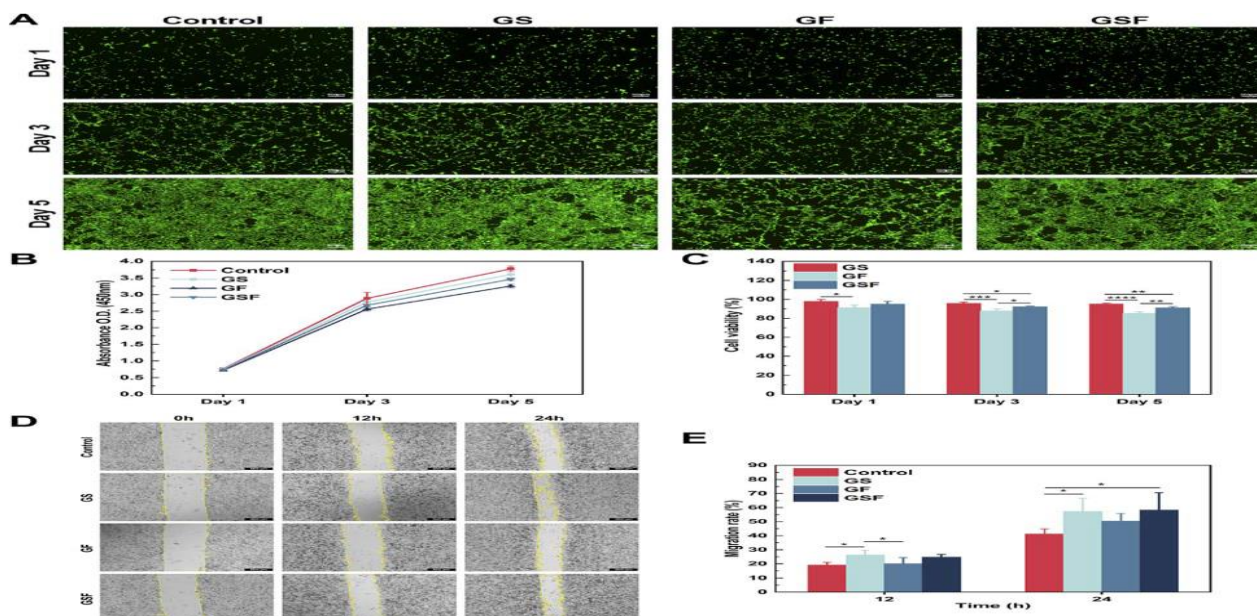


Fig. 3 Biocompatibility evaluation of the GS, GF, and GSF hydrogels: (A) live/dead staining fluorescence images of ADSCs cells in hydrogel abstracts after 1, 3, and 5 days of incubation, (B) growth profile of ADSCs cells in hydrogel abstracts, (C) viability quantification of ADSCs cells in hydrogel extracts after 1, 3, and 5 days of incubation, (D) images of migration of L929 fibroblasts to the scratched area after hydrogel treatment, (E) migration rate of L929 fibroblasts after hydrogel treatment.

Биосовместимость гидрогелей и тест на заживление ран

Выживание и пролиферация клеток имеют решающее значение для восстановления и регенерации тканей. Для оценки биосовместимости гидрогелей использовались окрашивание живых/мертвых клеток и тесты ССК-8 для исследования влияния гидрогелей на жизнеспособность клеток и пролиферацию ADSC. Рис. 3А показывает флуоресцентные изображения живых и мертвых клеток, культивируемых в среде гидрогеля в течение 1, 3 и 5 дней для каждой из трех групп гидрогелей. По сравнению с контрольной группой добавление SilMA в GelMA не оказало влияния на жизнеспособность клеток и действительно продемонстрировало эффект, способствующий росту клеток. Хотя F127DA является одобренным FDA наноматериалом с хорошими биодескриптивными свойствами, результаты показали, что он оказал незначительное ингибирующее действие на

пролиферацию клеток; следовательно, пролиферация клеток в гидрогелях GF и GSF была немного ниже, чем в гидрогеле GS. Последующий тест ССК-8 также показал, что

Рис. 2 Механические свойства гидрогелей GS, GF и GSF: (A) репрезентативные кривые растяжения гидрогелей, (B) деформация на растяжение при разрыве, (C) модуль Юнга, (D) прочность на растяжение, (E) прочность на разрыв, (F) репрезентативные кривые сжимающего напряжения – деформации гидрогелей, (G) прочность на сжатие (деформация при сжатии установлена на 80%), (H) сжимаемый модуль, (I) репрезентативные кривые циклической загрузки-разгрузки при сжатии, (J) потеря энергии 5-го цикла гидрогелей.

Гидрогели всех трех групп способствовали пролиферации клеток (Рис. 3B), и жизнеспособность клеток поддерживалась выше 80% в течение 5 дней (Рис. 3C). Согласно тесту ISO 10993-5:2009 для биологической оценки медицинских изделий, относительная добавленная стоимость биомедицинских материалов к клеткам должна быть не менее 70%, что означает, что гидрогели всех трех групп обладают хорошей биосовместимостью и, следовательно, могут обеспечить благоприятную среду для роста клеток.

Кроме того, были проведены эксперименты по царапанию клеток с использованием смеси раствора предшественника гидрогеля и безсерумной среды для оценки потенциального содействия миграции клеток гидрогелями, используя фибробласты L929. Результаты показали, что фибробласты L929 мигрировали от края царапины к пустой области с течением времени (Рис. 3D). Как гидрогели GS, так и GSF индуцировали более высокие скорости миграции, чем контрольная группа и гидрогель GF, как на 12, так и на 24 часах наблюдения, вероятно, потому что белковый компонент гидрогеля привлек больше клеток (Рис. 3E). Это может улучшить интегрированную регенерацию между материалами каркаса и тканями *in vivo*.

Свойства адгезии тканей *in vitro*: тест на сдвиг внахлест

Адгезивные свойства гидрогелей необходимы для восстановления разрывов тканей. Как показано на Рис. S3, гидрогели могут связываться с основными органами, включая печень, легкие и почки, без смещения, вызванного гравитацией. Тесты на сдвиг внахлест были проведены на гидрогелях всех трех групп с использованием отрезков ткани мочевого пузыря, чтобы подтвердить их потенциальную способность к использованию при восстановлении поврежденной ткани мочевого пузыря (Рис. 4А – D). Контактная поверхность представляла собой слайд, покрытый желатином, который может недостаточно воспроизводить адгезию в реальных сценариях. Тем не менее, окончательные результаты показали, что гидрогели тем не менее продемонстрировали адгезивные свойства, равные или лучшие, чем у коммерчески доступного герметика на основе фибрина.

Свойства адгезии тканей *in vitro*: тест на закрытие раны

Рис. 4Е показывает схему теста на закрытие раны *in vitro*, который включает в себя испытание на растяжение, проводимое после инъекции гидрогеля в среднюю область длинной полосы разорванной ткани мочевого пузыря. Кривая силы закрытия раны по сравнению с перемещением показана на Рис. 4G. Отказ адгезии происходит, когда гидрогель отсоединяется от ткани мочевого пузыря. Сила закрытия рассчитывалась на основе максимального напряжения и адгезивной площади гидрогеля. Результаты на Рис. 4Н показывают, что силы закрытия гидрогелей GS и GF были схожи и составили 15.32 и 16.08 кПа соответственно. Сила закрытия гидрогеля GSF увеличилась до 31.42 кПа, что примерно на 95% выше, чем у других двух групп. Сила адгезивных свойств определяется адгезией поверхности и сильной когезией. Первая обеспечивает стабильность связывающего интерфейса и предотвращает отслаивание. Вторая может поддерживать структурную стабильность гидрогеля и сопротивляться разрушению при больших перемещениях.

С одной стороны, сильные адгезивные свойства гидрогеля GSF обусловлены ковалентной сеткой перекрестного связывания и механизмом диссипации энергии, предоставляемым F127DA. Оба они укрепляют гидрогель с точки зрения его механических свойств, чтобы достичь более высокой когезивной прочности. С другой стороны, водородные связи, возникающие между GelMA и поверхностью богатых амином биологических тканей, а также ковалентное связывание амин – MA и тиол – MA групп. Необычная последовательность аминокислот, конформационный переход от случайного завитка к β -слою и межмолекулярные силы Ван дер Ваальса в структуре SilMA также усилили адгезию. Наконец, водородные связи, которые свободный сегмент PEO в F127DA может образовывать с белковыми субстратами, и гидрофобные взаимодействия, предоставляемые сегментом PPO с клеточной мембраной, способствуют адгезивным свойствам гидрогеля.

Тест на разрывное давление *in vitro*

Гидрогели, которые прочно связываются с тканями, могут дополнять или даже заменять швы и скобы. Разрывное давление является ключевым показателем для оценки герметичности гидрогелей для восстановления мочевого пузыря. Чтобы количественно оценить разрывное давление, мы разработали и построили испытательное устройство (Рис. 5А) с использованием 3D-печатного металла, ссылаясь на стандартный метод испытания на прочность закрытия раны тканей и герметиков (ASTM F2458-05). Разрывной надрез был...

Рис. 3 Оценка биосовместимости гидрогелей GS, GF и GSF: (А) флуоресцентные изображения живых/мертвых окрашенных клеток ADSCs в экстрактах гидрогеля после 1, 3 и 5 дней инкубации, (В) профиль роста клеток ADSCs в экстрактах гидрогеля, (С) количественная оценка жизнеспособности клеток ADSCs в экстрактах гидрогеля после 1, 3 и 5 дней инкубации, (D) изображения миграции фибробластов L929 к поврежденной

области после обработки гидрогелем, (E) скорость миграции фибробластов L929 после обработки гидрогелем.

Рис. 4 Оценка биоадгезивных свойств гидрогелей GS, GF и GSF: (A) схемный диаграмма *in vitro* теста на сдвиг в наложении, (B) изображение оценки сдвига в наложении *in vitro*, (C) кривая изменения силы сдвига – смещения гидрогелей, (D) прочность адгезии в режиме сдвиговой нагрузки, (E) схемный диаграмма теста на закрытие раны, (F) изображение оценки закрытия раны, (G) кривая изменения силы – смещения теста на закрытие раны, (H) прочность адгезии закрытия раны.

Рис. 5 Оценка производительности герметизации *in vitro* гидрогелей GS, GF и GSF: (A) схемный диаграмма устройства для измерения давления разрыва *in vitro*, (B) изображение оценки давления разрыва свежего биоткани свиного мочевого пузыря, (C) значения давления разрыва, (D) модель разреза свиного мочевого пузыря: изображения, показывающие (D, a) свежий свиной мочевой пузырь, (D, b) поверхностная рана, созданная хирургическими ножницами, (D, c) показывающая утечку, (D, d) гидрогель, покрывающий рану, (D, e) фото-сшивание, (D, f) запечатанный мочевой пузырь, наблюдаемый после заполнения деионизированной водой; шкала = 10 мм, (E) давление разрыва после заполнения газом.

Созданный в тканях мочевого пузыря круглой формы, где раствор предшественника гидрогеля был введен в выемку и фотокроссирован. Когда запечатанный гидрогель был поврежден или снят, давление быстро упало. С использованием датчика давления, давление разрыва было зафиксировано как 20.98, 21.24 и 32.23 кПа для гидрогелей GS, GF и GSF соответственно (Рис. 5C). Гидрогель GSF, который может поддерживать высокую прочность межфазного соединения, не поддавался общему разрушению под давлением от отслаивания. Результаты этого теста согласуются с результатами испытаний на растяжение, прочность на разрушение и адгезию сдвига, что дополнительно подтверждает, что

адгезионные характеристики гидрогелей зависят не только от межфазной адгезии между гидрогелем и тканью, но и от когезии самого гидрогеля.

Тест на герметизацию органов *in vitro*

Герметизирующие свойства композитных гидрогелей были проверены с использованием изолированных свежих свиных мочевых пузырей для имитации ремонта поврежденного мочевого пузыря в реалистичном сценарии. Сначала мы создали разрывную выемку с помощью хирургических ножниц (Рис. 5Da – c) и подтвердили герметизирующие свойства примененных гидрогелей, введя деминерализованную воду в тестовый мочевой пузырь (Рис. 5Dd – f). Композитные гидрогели прилипали к тканям мочевого пузыря в условиях влажности, а также в различных динамических положениях (вертикальном, перевернутом и неплоском), где они противостояли эффектам гравитации. Впоследствии была проведена количественная оценка эффективной герметизации путем заполнения мочевого пузыря тестовым газом. Результаты (Рис. 5E) показывают, что композитные гидрогели влияли на максимальное давление, которое запечатанные мочевые пузыри могли выдержать. Давление разрыва для гидрогеля GS было относительно низким (~ 3.77 кПа), в то время как добавление F127DA увеличивало его давление разрыва на ~ 5.1 кПа, а добавление SilMA и F127DA дополнительно увеличивало значение давления разрыва на ~ 6.5 кПа. В литературе сообщается, что расположение мочевого пузыря имеет относительно стабильный диапазон низкого давления от 0 до 4 кПа. Поэтому гидрогели GF и GSF имеют подходящую структурную стабильность и могут полностью выдерживать колебания давления в пределах клинически приемлемого диапазона.

Заключение

В этом исследовании мы успешно подготовили композитный гидрогель (гидрогель GSF), состоящий из метакрилатного желатина (GelMA), метакрилатного шелкового фиброина (SilMA) и диакрилата

Плуроника F127 (PEO 99 – PPO 65 – PEO 99) (F127DA). Гидрогель обладает инъекционной способностью, а также механическими и биоадгезивными свойствами, которые подходят для его клинического использования, основываясь на динамическом органе мочевого пузыря. Гидрогель имеет сетчатую структуру, в которой GelMA и SilMA ковалентно сшиты, а F127DA физически соединен между и внутри мицелл. Это улучшает свойства на растяжение, сжатие, прочность и усталостную стойкость гидрогеля GSF, обеспечивая эффективную структурную поддержку для органа мочевого пузыря во время циклических изменений или больших нагрузок. Во время испытаний *in vitro* с моделью органа свиного мочевого пузыря композитный гидрогель мог быстро прилипать и закрывать щели или разрывы в тканях мочевого пузыря. Химическая модификация предшественника гидрогеля, применяемого инъектором, с помощью фотоинициации придает сшивающие свойства гидрогелю, который комбинируется с ковалентными, водородными и гидрофобными взаимодействиями гидрогеля с биологическими тканями. Кроме того, гидрогель GSF продемонстрировал низкую скорость набухания, хорошую биodeградируемость и отличную биосовместимость. Поэтому подготовленный композитный гидрогель GSF предоставляет новую опцию для материалов каркаса в области инженерии тканей мочевого пузыря и имеет большой потенциал для применения в безшовном ремонте и регенерации поврежденного мочевого пузыря.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 M. Horst, D. Eberli, R. Gobet and S. Salemi, *Front. Pediatr.*, 2019, 7, 91.
- 2 S. T. Bazargani, H. Djaladat, H. Ahmadi, G. Miranda, J. Cai, A. K. Schuckman and S. Daneshmand, *Eur. Urol. Focus*, 2018, 4, 889–894.
- 3 T. Drewa, J. Adamowicz and A. Sharma, *Nat. Rev. Urol.*, 2012, 9, 561–572.
- 4 O. Lam Van Ba, S. Aharony, O. Loutochin and J. Corcos, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2015, 82–83, 31–37.

- 5 F. Xu, C. Dawson, M. Lamb, E. Mueller, E. Stefanek, M. Akbari and T. Hoare, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2022, 10, 849831.
- 6 S. Korossis, F. Bolland, E. Ingham, J. Fisher, J. Kearney and J. Southgate, *Tissue Eng.*, 2006, 12, 635–644.
- 7 D. Eberli, L. F. Filho, A. Atala and J. J. Yoo, *Methods*, 2009, 47, 109–115.
- 8 F. Ajallouelian, G. Lemon, J. Hilborn, I. S. Chronakis and M. Fossum, *Nat. Rev. Urol.*, 2018, 15, 155–174.
- 9 M. Casarin, A. Morlacco and F. Dal Moro, *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, 23, 6360.
- 10 M. Hanczar, M. Moazen and R. Day, *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22, 12657.
- 11 Z. Bao, C. Xian, Q. Yuan, G. Liu and J. Wu, *Adv. Healthcare Mater.*, 2019, 8, e1900670.