

Павло ПРОКОПОВИЧ¹, студент

Костянтин ДЯДЮРА¹, д-р техн. наук, професор

Ігор ПРОКОПОВИЧ¹, д-р техн. наук, професор

Антон ПАНДА², д-р філософії, професор

Георгій МЕЛЬНИЧЕНКО¹, студент

¹ Національний університет «Одеська політехніка», м. Одеса, Україна, e-mail: pashaprokopovich@gmail.com; dyadyura.k.o@op.edu.ua; igor.prokopovich@gmail.com; erdonshmark@gmail.com

² Технічний університет у Кошице, Факультет технологій виробництва з місцем розташування в Пряшіві, м. Пряшів, Словаччина

3D-ДРУКОВАНІ КАРКАСИ ДЛЯ ТКАНИННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ З ВИКОРИСТАННЯМ ТЕРМОЧУТЛИВИХ ГІДРОГЕЛІВ НА ОСНОВІ БІОПОЛІМЕРНИХ СУМІШЕЙ

Анотація. У цьому дослідженні ми пропонуємо приготування гідрогелевих чорнил для 3D-друку, що складаються з синтетичних полімерів полі(капролактону) і полі(молочної кислоти), біополімеру хітозану та природного желатину. Можливість друку гідрогелевих чорнил була оптимізована шляхом зміни складу, екструзійного сопла та температури, тоді як цілісність 3D скаффолдів була забезпечена за допомогою переходу золь-гель. Підготовлені гідрогелі були утворені шляхом взаємодії між полімерами через водневі зв'язки. Крім того, отримані гідрогелі демонстрували залежну від температури поведінку набухання, а каркаси з PCL демонстрували нижчу здатність до набухання, ніж каркаси з PLA. Створені скаффолди продемонстрували нижчу швидкість гідролізу в імітованій рідині організму (SBF) при 25 °C порівняно з 37 °C.

Ключові слова: гідрогелеві чорнила, 3D скаффолди, PLA, PCL, позаклітинний матрикс (ECM), хітозан, колаген, желатин, альгінат

Актуальність дослідження

Попит на штучні матеріали для медичних застосувань стрімко зріс через обмежену доступність донорських тканин і органів для трансплантації, таких як кістки, хрящі, шкіра, кровоносні судини та м'язи. Скаффолди розробляються та виготовляються для полегшення успішної регенерації тканин. Вони призначені для створення пористих структур, придатних для клітинної адгезії, міграції, росту та диференціювання [1]. Звичайні методи виготовлення каркасів включають сублімаційне сушіння, мікро-наноімпринтинг, літографію та електроспінінг. Однак, незважаючи на те, що ці методи є простими та універсальними процесами для виготовлення мікро-/наноструктури або двовимірних (2D) мікро-/наноструктур, що імітують позаклітинний матрикс (ECM), побудова реалістичних макромасштабних тривимірних (3D) структур з контрольованими мікро-/нанопаттернами та однорідною 3D-геометрією пор, включаючи керовану та точну пористість, а також стабільності, залишається складним [2]. За останні два десятиліття тривимірний друк отримав швидкий технологічний розвиток. Він широко використовується в тканинній інженерії та регенеративній медицині для розробки складних тканинних замінників, які відновлюють функцію пошкоджених тканин. Екструзійний 3D-друк використовує шприц і поршневу систему для дозування гідрогелю через сопла, які можуть створювати стабільні 3D-структури з використанням високов'язких гідрогелів. Проте створювати конструкції з високою механічною стійкістю та хорошою здатністю до друку є складним завданням [3]. Вимоги до гідрогелю для 3D-біодруку ідеальних тканин: висока пористість, швидке гелеутворення, збереження форми та відсутність імуногенності. Різноманітність природних і синтетичних полімерів використовувалися для виготовлення 3D-друкованих каркасів для тканинної інженерії [4]. Полі(капролактон) (PCL) або полі(молочна кислота) (PLA) використовувалися для виготовлення надрукованих на 3D-принтері каркасів тканинної інженерії з рівномірно розподіленими, добре сформованими взаємопов'язаними пористими структурами з високою міцністю кронштейна [5]. Хоча синтетичні біологічно розкладані полімери мають добру механічну міцність, тим самим долаючи попередні обмеження на форму, розмір і структурну цілісність, вони мають низьку біосумісність [3]. З цієї причини синтетичні полімерні гідрогелі для 3D-друку поєднуються з біологічно активними речовинами, такими як наногідроксіапатит, біоскло [6, 7] та біологічні агенти, а також природні полімери, такі як хітозан (CS) [8], колаген [9], желатин (гель) [10] і альгінат [11], для покращення цитосумісності, біосумісності, здатність до біологічного розкладання та біоактивність каркасів.

Мета дослідження полягає в тому, щоб скористатися синергетичними властивостями синтетичних і природних полімерів для отримання термочутливого гідрогелю, який можна використовувати для виробництва 3D-друкованих каркасів для регенерації тканин. Зокрема, були досліджені різні співвідношення PCL або PLA, PI, CS і гелю, а також визначено оптимальні співвідношення для найкращої здатності до друку та однорідності. Надруковані на 3D-принтері каркаси були вивчені на предмет їх морфології та хімічної структури, а також біологічних властивостей *in vitro*.

Основні матеріали досліджень

Реологічні властивості гідрогелю визначають його здатність до 3D-друку та дозволяють йому витікати через невелику голівку сопла [12, 13]. Для екструзійних біопринтерів перевагою є біочорнила з в'язкістю від 300 до 30000 мПа·с. Гідрогелі з в'язкістю нижче 300 мПа·с більше підходять для розмазування замість друку. Коли в'язкість перевищує 30000 мПа·с, для екструзії біочорнила з сопла потрібен високий тиск, і, крім того, процес екструзії стане нестабільним [2, 4]. Спочатку гель і CS розчиняли в 6 мл 2% водного розчину оцтової кислоти при магнітному перемішуванні при 60 °C до повної гомогенізації. У той же час PCL і PI розчиняли в 4 мл DCM при магнітному перемішуванні протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Потім два розчини змішували при механічному перемішуванні протягом 15 хвилин при 25 °C. Склад кожного полімеру в кінцевих гідрогелях PCL:PI:CS:Gel (PC-PI-CG) та їх короткі назви представлені в таблиці 1. Подібним чином також були виготовлені гідрогелі PLA:PI:CS:Gel (PL-PI-CG).

Таблиця 1

Склад та короткі назви протестованих біочорнил PC-PI-CG і PL-PI-CG

Назва (позначення)	Склад (вміст %)				
	PCL	PLA	PI	CS	Gel
PC 2.5-PI2.5-CG	10	–	10	4	2
PC 3.75-PI2.5-CG	15	–	10	4	2
PC 5-PI2.5-CG	20	–	10	4	2
PC 2.5-PI3.75-CG	10	–	15	4	2
PC 3.75-PI3.75-CG	15	–	15	4	2
PC 5-PI3.75-CG	20	–	15	4	2
PC 2.5-PI5-CG	10	–	20	4	2
PC 3.75-PI5-CG	15	–	20	4	2
PC 5-PI5-CG	20	–	20	4	2
PL 2.5-PI2.5-CG	–	10	10	4	2
PL 3.75-PI2.5-CG	–	15	10	4	2
PL 5-PI2.5-CG	–	20	10	4	2
PL 2.5-PI3.75-CG	–	10	15	4	2
PL 3.75-PI3.75-CG	–	15	15	4	2
PL 5-PI3.75-CG	–	20	15	4	2
PL 2.5-PI5-CG	–	10	20	4	2
PL 3.75-PI5-CG	–	15	20	4	2
PL 5-PI5-CG	–	20	20	4	2

Отримані гідрогелі переносили в екструзійні картриджі та центрифугували при 4000 об/хв протягом 10 хв для видалення бульбашок повітря. STL-файл каркасу сітчастої моделі використовувався для 3D-друку. Оцінку придатності для друку та в'язкості проводили з використанням вологих зразків (вологі структури та гідрогелеві чорнила відповідно), тоді як характеристика та біологічна оцінка структур, надрукованих на 3D, проводилися на висушених зразках. Протокол сушіння для 3D-друкованих шаффолдів включав послідовні кроки: початкове розміщення при кімнатній температурі на 48 годин для сприяння поступовому випаровуванню розчинника, а потім висушування в печі при 40 °C протягом 17 годин. Згодом зразки залишили при кімнатній температурі ще на 72 години, щоб забезпечити повне усунення залишків розчинників.

Результати

Було виявлено, що в'язкість термочутливих гідрогелів визначалася двома факторами: їхнім складом і, головним чином, співвідношенням PCL:PI або PLA:PI, оскільки їх сукупна концентрація була вищою, ніж CS і гель, і температурою, при якій вони були екструдовані (рис. 1).

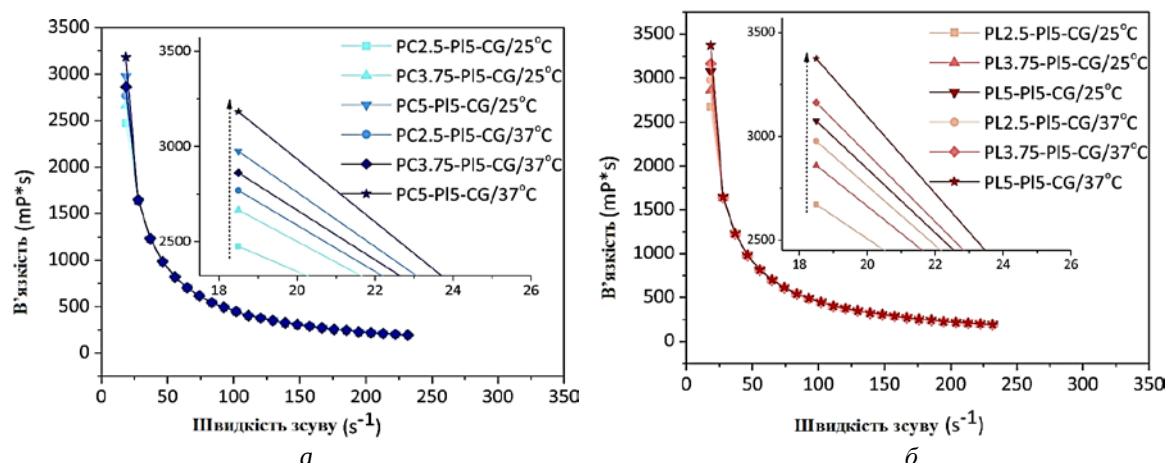


Рис. 1. Випробування на в'язкість гідрогелів PC-PI-CG і b PL-PI-CG при 25 °C і 37 °C

Як і очікувалося, в'язкість зросла за рахунок збільшення вмісту PCL або PLA в гідрогелях PC-PI-CG і PL-PI-CG. PLA-вмісні гідрогелі мали більшу в'язкість, ніж PCL-вмісні. Крім того, при підвищенні температури від 25 до 37 °C в'язкість гідрогелів збільшилася через присутність PI, оскільки він зазнає фазового переходу з рідини в гель при 37 °C. Золь-гель перехід, при підвищенні температури, пояснюється явищем міцелювання. PI має центральний гідрофобний блок PPO і два гідрофільних PEO з обох сторін. Гідрофобний PPO блок зневоднюється, підвищуючи температуру від 25 до 37 °C в результаті утворення сферичних міцел. Форматовані міцели складаються із зневодненого ядра PPO та зовнішньої оболонки з гідратованих набряклих ланцюгів PEO. За міцелюванням слід процес гелеутворення, що призводить до концентрованих гелів. У результаті отримані гідрогелі з високою концентрацією PI (20 мас.%) мали дещо нижчу в'язкість при кімнатній температурі (25 °C), ніж при температурі тіла (37 °C), де утворювався гель. Ця невелика різниця у в'язкості сильно впливає на здатність до друку гідрогелів, як обговорюється нижче. Це підтверджується літературними даними, де повідомлялося, що препарати з концентрацією PI 15...30 мас.% є рідкими при кімнатній температурі, а при температурі тіла переходять у форму гелю. Однак у цій роботі гідрогелі PC-PI-CG і PL-PI-CG не можуть бути рідкими при кімнатній температурі через наявність полімерів CS і гелю, які діють спільно в утворенні гідрогелю; Зокрема, макромолекули CS утворюють гелі в кислому середовищі внаслідок електростатичного відштовхування його позитивно заряджених аміногруп. Крім того, негативно заряджені групи макромолекул гелю в розчинах взаємодіють з позитивно зарядженими аміногрупами КС, утворюючи в'язкий гідрогель. Результати оцінки в'язкості свідчать про те, що всі гідрогелі PC-PI-CG і PL-PI-CG підходять для друку складних 3D-структур.

Висновки

Здатність матеріалу підтримувати клітинну адгезію є досить важливою властивістю для сприяння розвитку тканин у місцях імплантації, а також для доставки репаративних клітин у місцях рани для матеріалів, які служать носіями клітин. У цій роботі були виготовлені нові гідрогелеві чорнила, що складаються з синтетичних (PCL і PLA) і природних гелевих і CS полімерів. Крім того, PI використовувався для змішування гідрофобних і гідрофільних полімерів завдяки його амфіфільному характеру, а також завдяки хорошій здатності до друку. Зокрема, гідрогелі PCL-PI-CS-Gel і PLA-PI-CS-Gel були виготовлені з дев'ятьма різними композиціями. Можливість друку гідрогелів досліджували шляхом зміни розміру екструзійного сопла (G20 і G22) і температури (25 °C і 37 °C), і було виявлено, що PCL-PI-chitosan-gelatin 15-20-4-2% мас. (PC3.75-PI5-CG) і PLA-PI-CS-Gel 10-20-4-2% мас. (PL2.5-PI5-CG) мав найкращу придатність для друку, даючи однорідні каркаси. Однак було доведено, що золь-гелева природа PI відіграла вирішальну роль у процесі друку, оскільки гідрогелі друкували з високою точністю при 25 °C завдяки своїй формі рідина-гідрогель, але надрукована сітчаста модель продемонструвала хороше збереження форми при 37 °C завдяки своїй формі гелю. Аналіз FTIR показав взаємодію між компонентами гідрогелю через водневі зв'язки. Крім того, гідрогелі демонстрували температурно-залежну поведінку набухання та гідролізу у водному середовищі, що, ймовірно, було викликано локальним міцелюванням PI із підвищенням температури. Здатність до набухан-

ня також зменшилася, і втрата маси відбувалася набагато швидше при вищій температурі. Дослідження клітин *in vitro* довели, що підготовлені на 3D-друку пористі каркаси не були цитотоксичними та сприяли клітинній адгезії та диференціації. Такі термочутливі та розкладані гідрогелі PI можуть бути потенційно використані для застосування в тканинній інженерії. Щоб оцінити здатність скелета PC3.75-PI5-CG підтримувати прикріплення клітин, було проведено аналіз адгезії клітин кристалічним фіолетовим. Скаффолд PC3.75-PI5-CG мав чудові адгезивні властивості, оскільки адгезія клітин до каркасу була значно більшою порівняно з пластиковою поверхнею планшета для культури клітин. Отримавши цей важливий результат, а також для підтвердження та подальшої оцінки адгезивної здатності каркасу, було також проведено порівняння після покриття пластикової поверхні планшета з культурою широко вивченим адгезивним пептидом, послідовністю трьох амінокислот, аргінін-гліцин-аспартат (RGD).

Література

1. Koumentakou, I., Michopoulou, A., Noordam, M.J. et al. 3D-printed scaffolds for tissue engineering applications using thermosensitive hydrogels based on biopolymer blends. *J Mater Sci*. 2024, 59, 9021–9041 (2024). <https://doi.org/10.1007/s10853-024-09707-0>.
2. Lazaridou M., Bikiaris D.N, Lamprou D.A. 3D bioprinted chitosan-based hydrogel scaffolds in tissue engineering and localised drug delivery. *Pharmaceutics*. 2022, 14:1978. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091978>.
3. Zou, H., Bao, Y., Xin, X. et al. Visible-light-responsive homologous heterostructure of oxynitrides constructed to boost charge separation and water splitting. *Sci. China Chem.* 2025, 68, 186–191. <https://doi.org/10.1007/s11426-024-2208-3>.
4. Ren, Z., Luo, S., Shi, X. et al. Efficient and stable organic solar cells enabled by a poly(carbazole phosphonic acid) hole transporter. *Sci. China Chem.* 2024, 67, 1941–1945. <https://doi.org/10.1007/s11426-024-2054-8>.
5. Gan, M.M., Zhang, Z.E., Zhang, Y.F. et al. Supramolecular polymer network constructed by a functionalized polyimidazolium salt derived from metal-carbene template approach. *Sci. China Chem.* 2024, 67, 1224–1228. <https://doi.org/10.1007/s11426-023-1872-5>.
6. Wang, Z., Liu, Y., Pang, W. et al. Polyolefin vitrimers bearing acetoacetate functionality. *Sci. China Chem.* 2024, 67, 3861–3867. <https://doi.org/10.1007/s11426-024-2070-3>.
7. Ma, X., Fu, Q., Chen, J. et al. Advancing all-polymer solar cells with solid additives. *Sci. China Mater.* 2024. <https://doi.org/10.1007/s40843-024-3191-4>.
8. Cheng, X., Chen, B., Zhang, L. et al. Exfoliated metal oxide ultrathin nanosheets with supported Pd nanoparticles enabling the one-pot reaction of phenol into caprolactam. *Sci. China Chem.* 2025. <https://doi.org/10.1007/s11426-024-2479-4>.
9. Wang, T., Zhang, Y., Wang, S. et al. A class of crystalline porous thermosetting polymers: scalable thermomolding synthesis and propylene purification. *Sci. China Chem.* 2025. <https://doi.org/10.1007/s11426-024-2484-7>.
10. Zhou, PK., Huang, Y., Yu, Z. et al. Thermally triggered topological polymerization in diacetylene-functionalized covalent organic framework toward enhanced memristive properties. *Sci. China Chem.* 2025. <https://doi.org/10.1007/s11426-024-2462-4>.
11. Ma, A., Wang, X., Xuan, S. et al. Accelerated heterogenous ring-opening polymerization towards well-defined helical poly(*N*-allyl alanine) with clickable side chains. *Sci. China Chem.* 2024, 67, 2056–2062. <https://doi.org/10.1007/s11426-023-1897-2>.
12. Zha, H., Cheng, L., Wang, Z. et al. Efficient synthesis of bottle-brush polymers enabled by selective photoactivation strategy in NIR-induced PET-RAFT polymerization. *Sci. China Chem.* 2024, 67, 2353–2361. <https://doi.org/10.1007/s11426-024-2010-6>.
13. Zhang, L., Huang, H., Sun, L. et al. Sequence-controlled dynamic covalent units enable decoupling of mechanical and self-healing performance of polymers. *Sci. China Chem.* 2025, 68, 745–753. <https://doi.org/10.1007/s11426-024-2209-8>.