

УДК 547.992.3

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ
КАРБОКСИМЕТИЛЦЕЛЛЮЗЫ, ПОЛУЧЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
НОВЫХ СШИВАЮЩИХ АГЕНТОВ**

Венжик А. Н., Николаев Д. А., Романова И. В.

АО «Медтехнопроект», Москва, Российская Федерация
E-mail: a.venzhik@medtp.ru

В различных областях медицины широко используются биополимерные материалы на основе карбоксиметилцеллюзы (КМЦ). В зависимости от медицинского назначения и терапевтических целей требуется регулирование степени биодеградации имплантируемых биополимеров за счет синтеза поперечно-сшитых гелей с использованием сшивающих агентов. В данной работе была исследована цитотоксичность поперечно-сшитых гелей КМЦ с новыми сшивающими агентами, полипропиленгликольдиглицидиловым эфиром (ППГДЭ) и триметафосфатом натрия (ТМФ). Полученные данные свидетельствуют, что использование сшивающего агента на основе ППГДЭ позволяет получить раствор с существенно меньшей токсичностью по сравнению с остальными сшивающими агентами в 2–16 раз. В то же время важно подчеркнуть, что токсичность сохраняется, поэтому для медицинского применения требуется процесс диализа. Таким образом, ППГДЭ и ТМФ можно рассматривать как потенциальные сшивающие агенты для биополимеров медицинского применения.

Ключевые слова: карбоксиметилцеллюза, сшитый гель, имплантируемые материалы, химическое сшивание полимеров, биополимерные составы.

ВВЕДЕНИЕ

Карбоксиметилцеллюза (КМЦ), также известная как целлюлозная камедь, производится путем химического синтеза природной целлюлозы с хлоруксусной кислотой. Многофункциональность этого продукта делает его подходящим для использования в качестве ключевого промежуточного продукта или ингредиента во многих областях: в качестве связующего, загущающего, стабилизирующего, эмульгирующего, суспендирующего, клеющего вещества и покрытия. Широкое применение карбоксиметилцеллюзы обусловлено ее свойствами: являясь биополимером, карбоксиметилцеллюза обладает такими качествами, как биосовместимость, неиммуногенность, гипоаллергенность и биодоступность; в то же время, благодаря наличию большого количества гидроксильных и карбоксильных групп, между полимерными цепями карбоксиметилцеллюзы образуются различные химические и физические взаимодействий (водородные связи, ионные связи, электростатическое взаимодействие, силы Ван-дер-Ваальса), что и обуславливает формирование гелеобразной структуры, напрямую зависящей от

концентрации карбоксиметилцеллюлозы, длины полимерных цепей, степени замещения и наличию ионов металлов [1].

Однако в зависимости от медицинского назначения и терапевтических целей требуется регулирование степени биодеградации имплантируемых биополимеров. Для того, чтобы регулировать степень биодеградации карбоксиметилцеллюлозы в тканях организма, зачастую используют химические методы модификации, а именно сшивающие агенты, которые образуют ковалентные связи между полимерными цепями карбоксиметилцеллюлозы. Такая модификация существенно уменьшает скорость биодеградации, так как поперечно-сшитые производные биополимера менее склонны к гидролизному распаду, в то же время повышая механические свойства материала, что увеличивает продолжительность полезного эффекта от их применения.

Наиболее широко используемыми сшивающими агентами для биополимеров в медицине являются сшивающие агенты на основе замещенных эпоксидных соединений (включающих 1,4-бутандиолдиглицидиловый эфир (БДДЭ) (рис. 1); полиэтиленгликольдиглицидиловый эфир (ПЭГДЭ) (рис. 2); полипропиленгликольдиглицидиловый эфир (ППГДЭ) (рис. 3). Так как реакция идет в щелочной среде, то она преимущественно протекает через остаточные гидроксильные группы, являющимися более нуклеофильными по сравнению с карбоксильными группами.

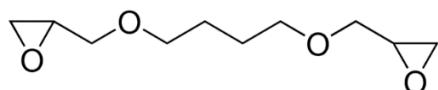


Рис. 1. Структурная формула 1,4-бутандиолдиглицидилового эфира (БДДЭ).

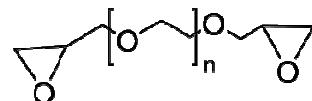


Рис. 2. Структурная формула полиэтиленгликольдиглицидилового эфира (ПЭГДЭ).

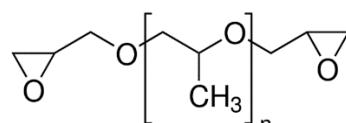


Рис. 3. Структурная формула полипропиленгликольдиглицидилового эфира (ППГДЭ).

Данная группа модифицирующих сшивающих агентов широко применяется при производстве интранадермальных филлеров и имплантатов на основе гиалуроновой кислоты; в частности, на протяжении 15 лет клинического

использования 1,4-бутандиолдиглицидилового эфира была подтверждена клиническая безопасность при соблюдении остаточного содержания менее 1 ppm [2]. Помимо этого, вследствие большого количества веществ из группы замещенных эпоксидов, их использование вследствие разной молекулярной массы, структуры и реакционной способности позволяет создавать продукты с различной степенью биодеградации, что важно для различных сфер применения.

Использование полиэтиленгликольдиглицидилового эфира в качестве сшивающего агента для карбоксиметилцеллюлозы с целью использования в медицинских изделиях описано в патенте [1, 3]. Также на данный момент на коммерческом рынке присутствует интрандермальный имплантат на основе модифицированной карбоксиметилцеллюлозы путем реакции с 1,4-бутандиолдиглицидиловым эфиром [4, 5]. Аналогов с использованием полипропиленгликольдиглицидилового эфира не было обнаружено. Именно поэтому важно исследовать цитотоксичность гелей на основе нового сшивающего агента и сравнить с цитотоксичностью уже известных БДДЭ и ПЭГДЭ.

Сшивающий агент на основе триметафосфата натрия (ТМФ) (рис. 4) широко используется в пищевой промышленности для поперечного сшивания молекул крахмала и гуаровой камеди [6]. Согласно [7], ТМФ отличается низкой токсичностью и отсутствием побочных эффектов на здоровье человека. Вследствие его реакционной способности сшивать гидроксильные группы, возможно его использование для сшивания молекул КМЦ. Однако в литературе не встречается исследований цитотоксичности поперечно-сшитого ТМФ молекул КМЦ.

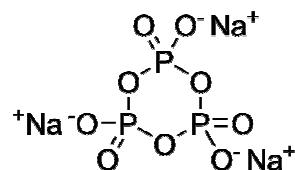


Рис. 4. Структурная формула триметафосфата натрия (ТМФ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для создания гелей использовались следующие материалы: карбоксиметилцеллюлоза марки Секол 2000 (СР Kelco), полиэтиленгликольдиглицидиловый эфир (Sigma-Aldrich), 1,4-бутандиол диглицидиловый эфир (Sigma-Aldrich), полипропиленгликоль диглицидиловый эфир (Sigma-Aldrich), триметафосфат натрия (Sigma-Aldrich), фосфатно-солевой буфер таблетки (ПанЭко), вода для инъекций (Гротекс).

Образцы гелей с использованием оксирановых сшивающих агентов были подготовлены в соответствии со следующей методикой. Для изготовления сшитого геля 2 г КМЦ растворяли в 25 мл 1 % растворе гидроксида натрия, добавляли 0,11 г БДДЭ, 0,28 г ПЭГДЭ или 0,21 г ППГДЭ и перемешивали в течении 12 часов при 25 градусах Цельсия. После этого полученный гель нейтрализовали раствором соляной кислоты до нейтрального значения водородного показателя pH и довели до

расчетного значения концентрации КМЦ. Диализ не проводился, так как он снижает и уравнивает токсичность всех гелей, таким образом не позволяя сделать вывод о токсичности конкретного сшивающего агента.

Образец геля с использованием ТМФ был приготовлен в соответствии с [7] с изменениями. Для изготовления сшитого геля 2 г КМЦ растворяли в 25 мл 1 % растворе гидроксида натрия, добавляли 0,17 г сшивающего агента и перемешивали в течении 12 часов при 25 градусах Цельсия. После этого полученный гель нейтрализовали раствором соляной кислоты до нейтрального значения водородного показателя pH и довели до расчетного значения концентрации КМЦ. Диализ не проводился, так как он снижает и уравнивает токсичность всех гелей, таким образом не позволяя сделать вывод о токсичности конкретного сшивающего агента.

Таким образом, были подготовлены следующие образцы: Образец 1 (сшитый с использованием БДДЭ), Образец 2 (сшитый с использованием ПЭГДЭ), Образец 3 (сшитый с использованием ППГДЭ) и Образец 4 (сшитый с использованием ТМФ).

Определение цитотоксичности проводили с использованием МТТ-теста на линиях клеток фибробластов мыши L929 и колоректального рака мыши Colon26. Данные линии клеток выращивали в среде RPMI-1640 с добавлением 10 % фетальной сыворотки теленка (FCS), пенициллина, стрептамицина, глютамина (все – PanEco, Российская Федерация). Клетки снимали с планшетов раствором 0,05 % трипсина-ЭДТА (PanEco, Российская Федерация), определяли концентрацию. Цитотоксическое действие препаратов оценивалась с помощью реактива 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромида (MTT, Sigma Aldrich, США) согласно методике, описанной в [8]. Различные разведения гелей (от 10 до 5120) готовили в культуральной среде. Клетки вносили по 5 тыс/лунку. В качестве контроля служили необработанные клетки. Планшеты инкубировали в течение 72 ч. За последние 6 ч в каждую лунку добавляли МТТ (5 мг/мл) в объеме 10 мкл. После инкубации культурную среду удаляли и в каждую лунку добавляли 100 мкл диметилсульфоксида. Планшеты инкубировали при встряхивании в течение 15 мин для растворения образовавшегося формазана. Оптическая плотность считывалась на спектрофотометре Titertek (Великобритания) при 540 Нм. Результаты анализировались в пакете Excel (Microsoft). По кривым титрования рассчитана цитотоксическая концентрация, дающая 50% максимального токсического эффекта (IC50). Данные приведены в виде индекса цитотоксичности (II), определенного по формуле (1):

$$II = 1 - \frac{OD_{exp}}{OD_{cont}} \quad (1)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ниже представлена схема реакции карбоксиметилцеллюлозы со сшивающими агентами: БДДЭ (рис. 5), ПЭГДЭ (рис. 6), ППГДЭ (рис. 7) и ТМФ (рис. 8). Во всех случаях реакция проводилась в щелочной среде.

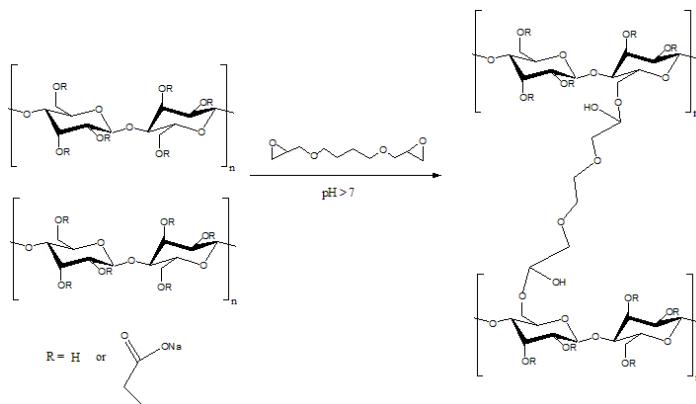


Рис. 5. Схема реакции КМЦ и 1,4-бутандиолдиглицидилового эфира (БДДЭ).

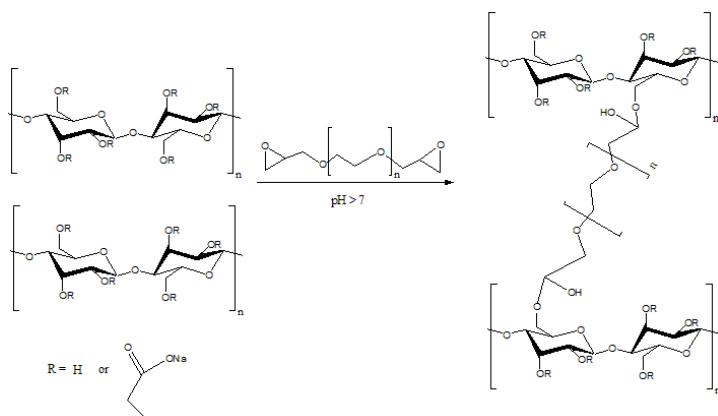


Рис. 6. Схема реакции КМЦ и полиэтиленгликольдиглицидилового эфира (ПЭГДЭ).

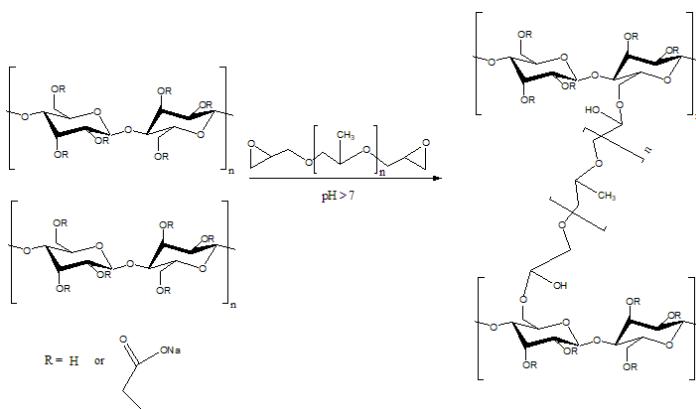


Рис. 7. Схема реакции КМЦ и полипропиленгликольдиглицидилового эфира (ППГДЭ).

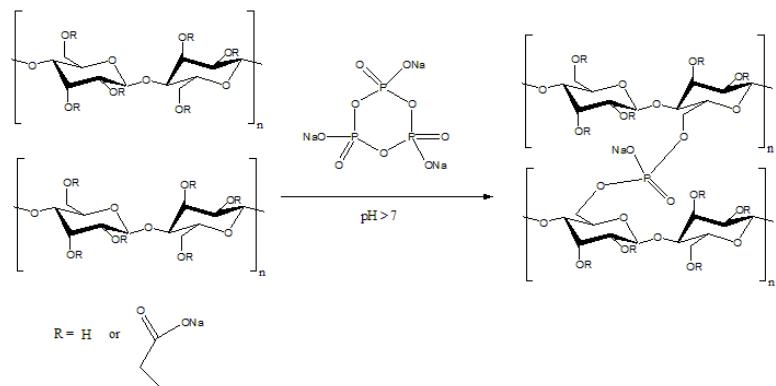


Рис. 8. Схема реакции КМЦ и триметафосфата натрия (ТМФ).

Результаты МТТ-теста полученных составов поперечно-сшитой КМЦ представлены в табл. 1–2.

Таблица 1.
Значение индекса ингибирования для образцов 1–4 различного разведения на клетках линии L929

Образец	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	IC50
1	0,76	0,62	0,55	0,45	0,37	0,23	0,09	0,05	-0,04	0,04	160
2	0,72	0,59	0,46	0,36	0,25	0,18	0,11	0,07	0,07	-0,05	80
3	0,33	0,25	0,21	0,11	0,09	0,08	0,04	0,03	0,03	0,02	10
4	0,52	0,40	0,29	0,20	0,09	0,08	0,01	0,03	-0,04	0,13	40

Таблица 2.
Значение индекса ингибирования для образцов 1–4 различного разведения на клетках линии L929

Образец	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	IC50
1	0,83	0,57	0,46	0,29	0,22	0,14	0,09	0,01	0,06	-0,09	40
2	0,66	0,50	0,45	0,37	0,22	0,13	0,00	0,02	-0,04	-0,01	80
3	0,53	0,37	0,25	0,12	0,02	0,00	0,02	0,01	0,00	0,03	20
4	0,88	0,77	0,58	0,39	0,26	0,15	0,04	-0,04	-0,02	0,00	40

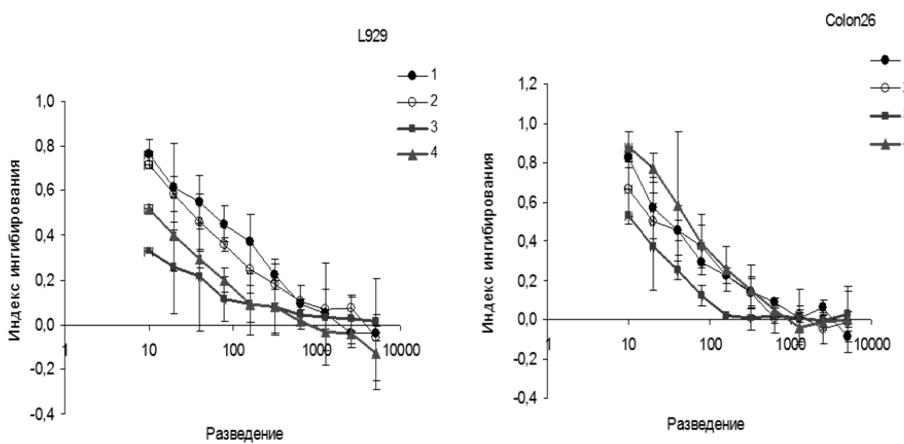


Рис. 9. Анализ пролиферации клеток L929 (слева) и Colon26 (справа) в присутствии Образцов 1–4. Данные приведены в виде индекса цитотоксичности (Π), определенного по формуле (1).

Как видно из рис. 9 и табл. 1–2, цитотоксичность наблюдается для всех сшивающих агентов, так как цитотоксическая концентрация IC50 выше 0 для всех образцов, то есть все образцы в своей исходной концентрации являются токсичными. Это связано с тем, что сшивающие агенты с одной стороны являются токсичными вследствие высокой реакционной способности – своего основного свойства; с другой стороны, продукты реакций непрореагировавшего сшивающего агента являются токсичными. При этом, как отмечается в литературе, не совсем ясна степень токсичности побочных продуктов [9, 10]. Это связано с возможностью образования разных соединений, а также во многом степенью присоединения сшивающего агента к молекулам биополимера, что напрямую влияет на количество остаточного сшивающего агента. Таким образом, избранный в данной статье метод сравнения сшитых гелей путем проведения анализа на цитотоксичность позволяет пренебречь точным химическим составом возможных побочных продуктов реакции в растворе сшивающего агента и КМЦ, а также в целом определить степень токсичности разных агентов.

Использование сшивающего агента на основе ППГДЭ (образец 3) позволяет получить раствор с существенно меньшей токсичностью по сравнению с остальными сшивающими агентами в 2–16 раз. Это может быть связано с двумя причинами: во-первых, ППГДЭ более реакционноспособен по сравнению с остальными сшивающими агентами, таким образом происходит большая степень сшивки между ним и молекулами КМЦ, что приводит к меньшему содержанию остаточного количества сшивающего агента в растворе; во-вторых, продукт гидролиза остаточного ППГДЭ в растворе менее токсичен по сравнению с другими сшивающими агентами.

Однако, при приготовлении данных гелей был исключен диализ. Именно он, что подтверждается данным исследованием, снижает цитотоксичность гелей с

использованием сшивающих агентов на основе БДДЭ и ПЭГДЭ. Несмотря на пониженную токсичность ППГДЭ, гель с ним также требует дополнительной очистки. Таким образом, данный факт подтверждает важность диализа как процесса очистки при производстве сшитых гелей биополимеров для медицинского применения. В то же время, чем ниже токсичность сшивающего агента, тем меньше рисков возникновения побочных эффектов у пациентов, даже несмотря на использование диализа. Таким образом, использование ППГДЭ с точки зрения цитотоксичности более предпочтительно, по сравнению с остальными сшивающими агентами. Необходимо провести дополнительные исследования, направленные на сравнение реологических свойств гелей, полученных с использованием ППГДЭ, с гелями, полученными с использованием иных сшивающих агентов.

Токсичность геля, приготовленного с ТМФ, сравнима с токсичностью гелей, сшитых с использованием традиционных ПЭГДЭ и БДДЭ. Несмотря на то, что в литературе отмечается более низкая токсичность ТМФ, данное исследование это не продемонстрировало [6, 7]. Это может быть связано со слабой реакционной способностью и, соответственно, низкой степенью сшивки КМЦ вследствии стерических затруднений: молекула ТМФ имеет наименьшую молекулярную длину среди остальных сшивающих агентов, вследствии чего более вероятным сшиванием будет внутримолекулярное, а не межмолекулярное, что будет способствовать меньшей площади контакта для остальных молекул сшивающего агента. В то же время, возможно за счет изменений условий протекания реакции возможно повысить степень сшивки и, таким образом, снизить токсичность изделия. Несмотря на это, ТМФ может рассматриваться как потенциальный сшивающий агент с точки зрения цитотоксичности, так как имеет схожую цитотоксичность с БДДЭ и ПЭГДЭ, которые активно используются в настоящее время.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Исследована цитотоксичность поперечно-сшитых гелей КМЦ с использованием следующих сшивающих агентов: БДДЭ, ПЭГДЭ, ППГДЭ, ТМФ. Исходя из полученных результатов, цитотоксичность ППГДЭ ниже в 2–16 раз по сравнению с другими гелями; цитотоксичность ТМФ сравнима с показателями ПЭГДЭ и БДДЭ, однако без процесса диализа такие гели остаются токсичными.
2. Доказана важность диализа для производства любых поперечно-сшитых гелей, так как данный процесс позволяет снизить токсичность до приемлемого уровня. Без проведения диализа такие гели остаются токсичными.
3. Полученные данные по цитотоксичности позволяют рассматривать ППГДЭ и ТМФ как новые, перспективные сшивающие агенты для использования в растворах биополимеров медицинского назначения.

Список литературы

1. US Pat. 9,682,167 B2: МПК A61L 27/20, A61L 27/54. Carboxymethylcellulose polyethylene glycol compositions for medical uses / Samuel J. Falcone, Richard A. Berg; заявитель и патентообладатель Fziomed, Inc. – № 15/189,496; заявл. 22.06.2016; опубл. 20.06.2017.

2. Kablik J. Comparative physical properties of hyaluronic acid dermal fillers / J Kablik, G. D. Monheit, L. Yu [et al.] // Dermatologic Surgery. – 2009. – Vol. 35. – P. 302–312.
3. Hiroyuki K. Characterization and properties of carboxymethyl cellulose hydrogels crosslinked by polyethylene glycol / K. Hiroyuki // Carbohydrate Polymers. – 2014. – Vol. 106. – P. 84–93.
4. Leonardis M. New-generation filler based on cross-linked carboxymethylcellulose: study of 350 patients with 3-year follow-up / M. Leonardis, A. Palange // Clin Interv Aging. – 2015. – Vol. 10. – P. 147–155.
5. Leonardis M. Use of cross-linked carboxymethyl cellulose for soft-tissue augmentation: preliminary clinical studies / M. Leonardis, A. Palange, R. F. V. Dornelles [et al.] // Clinical Interventions in Aging. – 2010. – Vol. 5. – P. 317–322.
6. Sgorla D. Development and characterization of crosslinked hyaluronic acid polymeric films for use in coating processes / D. Sgorla, A. Almeida, C. Azevedo [et al.] // Int J Pharm. – 2016 – Vol. 511, No 1. – P. 380–389.
7. Dulong V. Hyaluronan-based hydrogels particles prepared by crosslinking with trisodium trimetaphosphate. Synthesis and characterization / V. Dulong, S. Lack, D. Le Cerf [et al.] // Carbohydrate Polymers – 2004 – Vol. 57, No 1. – P. 1–6.
8. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays / T. Mosmann // J. Immunol. Methods – 1983. – Vol. 65. – P. 55–63.
9. Guarise C. HA-based dermal filler: downstream process comparison, impurity quantitation by validated HPLC-MS analysis, and in vivo residence time study / C. Guarise, C. Barbera, M. Pavan [et al.] // J Appl Biomater Funct Mater. – 2019. – Vol. 17, No 3. – P. 1–9.
10. De Boulle K. A review of the metabolism of 1,4-butanediol diglycidyl ether-crosslinked hyaluronic acid dermal fillers / K. De Boulle, R. Glogau, T. Kono [et al.] // Dermatol Surg. – 2013. – Vol. 39, No 12. – P. 1758–1766.

CYTOTOXICITY STUDY OF CARBOXYMETHYL CELLULOSE HYDROGELS OBTAINED WITH THE USE OF A NEW CROSSLINKERS

Venzhik A. N., Nikolaev D. A., Romanova I. V.

LCC «Medtekhnoproyekt», Moscow, Russian Federation
E-mail: a.venzhik@medtp.ru

Biopolymer materials based on carboxymethyl cellulose (CMC) are widely used in various fields of medicine. The widespread use of carboxymethyl cellulose is due to its properties: being a biopolymer, carboxymethyl cellulose has such properties as biocompatibility, non-immunogenicity, hypoallergenicity and bioavailability. However, depending on the medical purpose and therapeutic goals, it is required to regulate the degree of biodegradation of the implanted biopolymers. To regulate the degree of biodegradation of carboxymethylcellulose in body tissues chemical modification methods are often used, viz. are used crosslinking agents forming covalent bonds between polymer chains of carboxymethylcellulose. In this work we investigated a new cross-linking agent, polypyropylene glycol diglycidyl ether (PPGDE), as a cross-linking agent for CMC, which was not previously used in medical, food or pharmaceutical industry. The most critical parameter for any cross-linking agent in medical materials is cytotoxicity, and a hydrogel with a new crosslinker was subjected to this study. For comparison crosslinking agents already used in the pharmaceutical and medical industry were taken: 1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDE); polyethylene glycol diglycidyl ether (PEGDE). The crosslinking

agent sodium trimetaphosphate (TMP) which is widely used in the food industry for the crosslinking of starch and guar gum molecules was also investigated. The data obtained indicate the use of a crosslinker PPGDE makes it possible to obtain a solution with 2–16 times lower toxicity compared to other cross-linking agents, while the use of a cross-linking agent based on TMP makes it possible to obtain a solution with comparable toxicity to BDDE and PEGDE. At the same time, it is important to emphasize that toxicity persists, therefore a dialysis process is required for medical device manufacturing. Thus the new crosslinking agents PPGDE and TMP can be considered as potential crosslinking agents for medical use biopolymers.

Keywords: carboxymethyl cellulose, cross-linked gel, implantable materials, polymers chemical crosslinking, biopolymer formulations.

References

1. US Pat. 9,682,167 B2: МПК A61L 27/20, A61L 27/54. Carboxymethylcellulose polyethylene glycol compositions for medical uses / Samuel J. Falcone, Richard A. Berg; заявитель и патентообладатель Fziomed, Inc. – № 15/189,496; заявл. 22.06.2016; опубл. 20.06.2017.
2. Kablik J., Monheit G. D., Yu L., Chang G., Gershkovich J. Comparative physical properties of hyaluronic acid dermal fillers, *Dermatologic surgery: official publication for American Society for Dermatologic Surgery*, **35**, 302 (2009).
3. Hiroyuki K. Characterization and properties of carboxymethyl cellulose hydrogels crosslinked by polyethylene glycol, *Carbohydrate Polymers*, **106**, 84 (2014).
4. Leonardis M., Palange A. New-generation filler based on cross-linked carboxymethylcellulose: study of 350 patients with 3-year follow-up, *Clinical Interventions in Aging*, **10**, 147 (2015).
5. Leonardis M., Palange A., Dornelles R. F. V., Hund F. Use of cross-linked carboxymethyl cellulose for soft-tissue augmentation: preliminary clinical studies, *Clinical Interventions in Aging*, **5**, 317 (2010).
6. Sgorla D., Almeida A., Azevedo C., Bunhak Й. J., Sarmento B., Cavalcanti O. A. Development and characterization of crosslinked hyaluronic acid polymeric films for use in coating processes, *Int J Pharm*, **511**(1), 380 (2016).
7. Dulong V., Lack S., Le Cerf D., Picton L., Vannier J. P., Muller G. Hyaluronan-based hydrogels particles prepared by crosslinking with trisodium trimetaphosphate. Synthesis and characterization, *Carbohydrate Polymers*, **57**(1), 1 (2004).
8. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, **65**, 55 (1983).
9. Guarise C., Barbera C., Pavan M., Panfilo S., Beninatto R., Galessi D. HA-based dermal filler: downstream process comparison, impurity quantitation by validated HPLC-MS analysis, and in vivo residence time study, *J Appl Biomater Funct Mater*, **17**(3), 1 (2019).
10. De Boulle K., Glogau R., Kono T., Nathan M., Tezel A., Roca-Martinez J. X., Paliwal S. Stroumpoulis D., A review of the metabolism of 1,4-butanediol diglycidyl ether-crosslinked hyaluronic acid dermal fillers, *Dermatol Surg*, **39**(12), 1758 (2013).