

Didelio našumo trimačių mikrostruktūrizuotų karkasų lazerinis formavimas kremzlės regeneracijos tyrimams *in vitro* ir *in vivo*

High throughput laser fabrication of 3D microstructured scaffolds for cartilage regeneration studies *in vitro* and *in vivo*

Sima Rekštytė¹, Justinas Mačiulaitis^{2,3}, Romaldas Mačiulaitis², Mangirdas Malinauskas¹

¹Vilniaus universitetas, Fizikos fakultetas, Lazerinių tyrimų centras, Saulėtekio al. 10, 10223 Vilnius

²Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija, Fiziologijos ir farmakologijos institutas, A. Mickevičiaus g. 9, 44307 Kaunas

³Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija, Sporto institutas, Kalniečių g. 231, 50108 Kaunas
sima.rekstyte@gmail.com

Tiesioginis lazerinis rašymas polimerų pirmtakuose (TLR-PP) naudojant femtosekundinius lazerio impulsus yra plačiai taikomas būdas formuoti polimerinius mikrostruktūrizuotus karkasus, skirtus *in vitro* audinių inžinerijos tyrimams [1]. TLR-PP populiarumas yra nulemtas didele apdirbamų medžiagų įvairove, galimybe laisvai parinkti formuojamo darinio geometriją, matmenis bei kitus parametrus. Nepaisant viso to, šiuo metodu suformuoti karkasų tyrimai *in vivo* vis dar atliekami retai [2, 3]. Taip yra dėl ilgos makro-darinių (milimetrų dydžio, tinkamų valdyti chirurgui) formavimo trukmės, kuri yra nulemta pataškinio rašymo proceso bei yra ribojantis veiksnys atliekant tyrimus, kuriems reikalingas didelis kiekis tokių karkasų. Vis dėlto, spartus TLR-PP vystymas, ypač audinių inžinerijos srityje, leidžia tikėtis, kad greitai metu tai taps įprastu metodu gaminant konkrečiam pacientui pritaikytus mikrostruktūrizuotus karkasus.

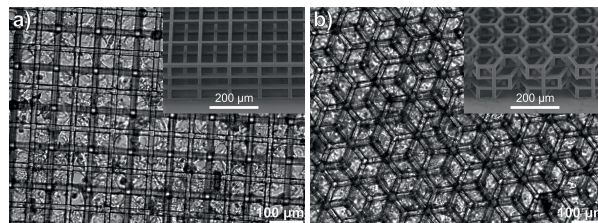
Šiame darbe mes pristatome naujausius kremzlės audinio regeneracijos rezultatus panaudojant polimerinius mikrostruktūrizuotus karkasus, suformuotus TLR-PP metodu. Pasirinktas hibridinis organinis-neorganinis polimero pirmtakas SZ2080 – optimali šiam taikymui medžiaga vertinant biosuitikumumą bei apdirbimo našumą ir patogumą. Darinių formavimas buvo vykdomas pasitelkus lazerinę sistemą, kurios spinduliuotės šaltinis yra femtosekundinis lazeris Pharos ($\nu=200$ kHz, $\tau=300$ fs, $\lambda=515$ nm). Fokusuoto lazerio pluošto padėtis polimero pirmtako tūryje keičiama naudojant sinchronizuotą galvanometrinių skenerių bei linijinių poslinkio stalų judėjimą. Tai leidžia išnaudoti abiejų pozicionavimo sistemų gerąsias savybes – atitinkamai spartą bei didelį apdirbimo plotą. Parodome, kad optimizavus formavimo parametrus bei darinio geometriją pernakta galima suformuoti kelias dešimtis $1,5 \times 1,5 \times 0,2$ mm³ dydžio karkasų, išlaikant 15 μ m struktūrinių elementų dydį. Toks našumas yra būtinas atliekant statistinius ląstelių augimo bei elgsenos trimačių karkasų aplinkoje tyrimus.

In vitro tyrimų metu stačiakampės bei heksagoninės porų formos polimeriniai mikrostruktūrizuoti karkasai buvo užsėti chondrocitais (1 pav.). Ląstelių morfologijos ir gyvybingumo nustatymui buvo vertinti histologiniai pjūviai ir skenuojančios elektroninės mikroskopijos (SEM) vaizdai. Nustatyta, kad ląstelės gyvybingos, geba prisitvirtinti prie karkaso vidinių struktūrų, formuo-

ti jungtis su kitomis ląstelėmis ir gaminti gausėjantį ekstraląstelinį matiksą. Atliekami tyrimai, siekiant nustatyti optimalią karkasų morfologiją analizuojant porų formos įtaką baltymų ekspresijai.

Heksagoninės poros formos karkasai buvo pirmą kartą panaudoti tyrimams gyvūno modelyje *in vivo* (implantuoti į triušio sąnario kremzlės defektą). Po 6 mėnesių atlikta apžiūra parodė, kad gydymo efektyvumo rezultatai naudojant mikrostruktūrizuotus polimerinius karkasus buvo reikšmingai geresni nei kontrolinėje (be gydymo) grupėje ir ne blogesni nei naudojant komercinę kolageninę membraną.

Toliau vykdomi tyrimai leisiantys išnaudoti unikalią TLR-PP suteikiamą galimybę varijuojant tvarkaus karkaso geometriją bei porėtumu tirti šių parametrų įtaką audinio formavimuisi.



1 pav. Stačiakampio (a) ir heksagoninio (b) tipo karkasų, apaugintų chondrocitais, optinio mikroskopo vaizdai (įklajose pateikti karkasų SEM vaizdai).

Reikšminiai žodžiai: trimačiai karkasai, tiesioginis lazerinis rašymas, hibridiniai polimerų pirmtakai, kremzlės audinio regeneracija

Literatūra

- [1] M.T. Raimondi, S.M. Eaton, M.M. Nava, M. Lagana, G. Cerullo, and R. Osellame, *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **10**, 56–66 (2012).
- [2] J. Mačiulaitis, M. Deveikytė, S. Rekštytė, M. Bratchikov, A. Darinskas, A. Šimbelytė, G. Daunoras, A. Laurinavičienė, A. Laurinavičius, R. Gudas, M. Malinauskas, and R. Mačiulaitis, *Biofabrication* **7**, 015015 (2015).
- [3] P. Timashev, D. Kuznetsova, A. Koroleva, N. Prodanets, A. Deiwick, Y. Piskun, K. Bardakova, N. Dzhoyashvili, S. Kostjuk, E. Zagaynova, Y. Rochev, B. Chichkov, and V. Bagratashvili, *Nanomedicine* **11**, 1041-1053 (2016).