

УДК 678.5

БИОДЕГРАДИРУЕМЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ МИКРОЧАСТИЦЫ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ**Т.С. Демина^{1,2}, Т.А. Акопова², П.С. Тимашев¹**¹ Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия² Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва, Россия

Одной из широко используемых в медицине форм материалов являются нано / микроразмерные частицы, которые применяют в качестве систем адресной доставки, матриц для прикрепления / роста клеток или мультифункциональных материалов, выполняющих обе вышеуказанные функции. Изначально полимерные микрочастицы использовали в качестве подложек с большой площадью поверхности для культивирования субстрат-зависимых клеток *in vitro*, но в рамках современной концепции регенеративной медицины полимерные микрочастицы рассматриваются в качестве биорезорбируемых матриц для тканевой инженерии, которые могут быть наполнены биологически активными компонентами / лекарствами [1–4]. Возможность регулировать архитектуру частиц на микро-/наноразмерном уровне, а также контролировать их физико-химические свойства позволяет использовать их в качестве микроотделов, которые можно вводить неинвазивно и заполнять дефекты сложной формы. Применение микроотделов в качестве мультифункциональных клеточных микроносителей основано на малоинвазивном имплантировании *in vivo* в поврежденные участки тканей клеток, прикрепленных к поверхности микроотделов, что позволяет осуществить направленную мультипликацию клеток *in vitro* в биореакторе и обеспечить их доставку в поврежденные участки тканей. Микроносители обладают целым рядом преимуществ перед остальными средствами доставки клеток. Во-первых, их размер (~ 100–250 мкм) и способность к суспендированию в водных средах позволяет вводить их в поврежденные участки тканей инъекционно. Во-вторых, можно комбинировать различные линии клеток. В-третьих, они могут одновременно служить средствами доставки биоактивных компонентов, высвобождающихся в процессе деградации полимера. Еще одним очень перспективным направлением использования полимерных микроотделов является получение на их основе биodeградируемых трехмерных матриц с заданной архитектурой с помощью различных методов, в т. ч. аддитивных технологий [4–7].

Состав и структура микроотделов для применения в тканевой инженерии должны соответствовать традиционному ряду требований, предъявляемых к матрицам для тканевой инженерии [8]. В качестве основного компонента микроотделов в подавляющем большинстве случаев используют биodeградируемые сложные полиэфиры (полилактид, поликапролактон и их сополимеры), которые имеют долгую историю успешного применения в медицине [9–12]. Одним из наиболее популярных методов получения микроотделов из полиэфиров является метод испарения растворителей из эмульсий масло / вода [13–16]. Суть метода заключается в эмульгировании дисперсной «масляной» фазы, состоящей из раствора полимера в несмешивающемся с водой растворителе (как правило, хлороформ, дихлорметан и т. д.), в дисперсионной водной среде, которая содержит эмульгатор для стабилизации границы раздела фаз масло / вода. В процессе длительного перемешивания растворитель из дисперсной фазы испаряется и эмульсия превращается в суспензию твердых микроотделов в воде. Популярность этого метода основана на его относительной простоте и возможности варьировать условия формирования микроотделов (соотношение фаз, концентрацию полимера, скорость / режим перемешивания и т. д.). Более того, возможность варьировать состав фаз позволяет получать микроотделов сложной морфологии с заданными структурой и свойствами.

Цель работы – обобщение экспериментальных данных по различным подходам к регулированию структуры и свойств биodeградируемых микроотделов в процессе их формирования методом испарения растворителя из эмульсий масло / вода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали полилактид (ПЛА) с молекулярной массой (ММ) 100 кДа (Natureworks 4043D) и 160 кДа (Sigma-Aldrich); поликапролактон (ПКЛ) с ММ 67 кДа; сополимеры хитозана, синтезированными методом твердофазного реакционного смешения [17–21]; нанокристаллические хитин и целлюлозу [22,23], а также ряд коммерчески доступных полисахаридов и их производных.

Микрочастицы получали методом испарения растворителя из эмульсии масло / вода по методике, описанной в [18, 19]. Раствор полиэфира, их смесей или сополимеров с олиго / полиэфирами в смеси растворителей дихлорметан / ацетон (9/1 об./об.) использовали в качестве дисперсной фазы. В качестве дисперсионной среды выступала или дистиллированная вода или растворы полисахаридов (в т. ч. их производных и сополимеров) или водные дисперсии нанокристаллических полисахаридов. Диспергирование фаз в соотношении 10/90 (масло / вода) осуществляли на верхнеприводной мешалке при контролируемой температуре до полного испарения растворителей из дисперсной фазы. Получившиеся микрочастицы промывали, фракционировали по размерам на наборе сит, сушили лиофильно. Микрочастицы характеризовали с точки зрения их выхода, распределения микрочастиц по размерам; морфологию оценивали с помощью сканирующего электронного микроскопа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основной путь регулирования структуры и свойств микрочастиц в процессе их получения из эмульсий лежит в рамках оптимизации состава фаз. Варьирование состава дисперсионной «водной» среды в основном связано с модифицированием состава / морфологии поверхности. Даже при использовании классических поверхностно-активных веществ (например, поливиниловый спирт) на поверхности микрочастиц остается эмульгатор [24], что может быть неблагоприятным для дальнейшего их использования в качестве клеточных микроносителей. С другой стороны, оптимизация эмульгатора позволяет обогатить поверхность получаемых микрочастиц целевыми компонентами. В этом случае важна способность такого компонента стабилизировать границу раздела фаз. Природные макромолекулы (полисахариды, белки и т. д.), присутствие которых на поверхности микрочастиц из синтетических полиэфиров могло бы увеличить их биосовместимость, как правило, не могут обеспечить эффективную стабилизацию эмульсий в процессе формирования микрочастиц, поэтому целесообразно использовать их производные / сополимеры. Ранее было показано, что прививка на хитозан коротких цепей олиголактида позволяет получить амфифильные макромолекулы, которые обеспечивают высокий выход микрочастиц и наличие на их поверхности фрагментов хитозана, что положительно влияет на адгезию и рост клеток [20, 21, 25]. В качестве эмульгатора в дисперсионной среде также можно использовать наночастицы, которые также способны стабилизировать границу раздела фаз и позволяют получать микрочастицы со структурой ядро / оболочка [26, 27]. В случае полисахаридов наиболее простым вариантом их наноразмерных форм являются нанокристаллы, полученные селективным кислотным гидролизом аморфных областей нативных полисахаридов, что приводит к получению нанокристаллов игольчатой формы [26]. Нанокристаллические полисахариды эффективно стабилизируют границу раздела фаз в процессе получения микрочастиц из полилактида, но в отличие от микрочастиц, стабилизируемых макромолекулярными эмульгаторами, их поверхность имеет довольно неоднородную морфологию [22, 23]. Модифицирование структуры / свойств только поверхностного слоя важно для обеспечения адгезии клеток на поверхность микрочастиц, а также с точки зрения дальнейшего формирования на их основе трехмерных материалов, в т. ч. с помощью метода поверхностно-селективного лазерного спекания.

Более сложный вариант модифицирования заключается в варьировании состава дисперсной «масляной» фазы, что приводит к регулированию структуры/свойств объема микрочастиц. В простейшем варианте возможно получение микрочастиц из смеси различных полиэфиров (например, полилактида с поликапролактоном), что, однако, приводит к их фазовому разделению в процессе испарения растворителя и в любом случае требует использования эмульгатора в дисперсионной среде. Модифицирование химической структуры полимера, растворенного в дисперсной фазе, должно быть направлено на придание ему амфифильных свойств и способности к «самостабилизации» при получении микрочастиц без применения дополнительных эмульгаторов в дисперсионной среде. Наиболее перспективным вариантом комбинирования полимеров для использования в дисперсной фазе является сополимеризация сложных полиэфиров с различными полисахаридами [18–20, 28]. Варьирование химической структуры (молекулярная масса основной цепи; количество, степень полимеризации и природа привитых боковых фрагментов) позволяет получать микрочастицы различной морфологии (микрокапсулы, макропористые), которые могут эффективно служить в качестве клеточных микроносителей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, для успешного применения полимерных микрочастиц в качестве клеточных микроносителей необходимо регулировать их структуру и свойства, что возможно в рамках модифицирования состава фаз при их получении методом испарения растворителей из эмульсий масло / вода. При модифицировании состава дисперсионной «водной» среды можно регулировать структуру / свойства поверхности, а варьирование химической структуры полимера в дисперсной фазе открывает возможности для получения микрочастиц с заданными структурой / свойствами объема.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента (МК-1974.2019.3).

ЛИТЕРАТУРА

1. Hernández R.M., Orive G., Murua A., Pedraz J.L. Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery // *Adv. Drug Deliv. Rev.* Elsevier B.V., 2010. Vol. 62, № 7–8. P. 711–730.
2. Li B., Wang X., Wang Y., Gou W., et al. Past, present, and future of microcarrier-based tissue engineering // *J. Orthop. Transl.* Elsevier Taiwan LLC and the, 2015. Vol. 3, № 2. P. 51–57.
3. Chen X.Y., Chen J.Y., Tong X.M., Mei J.G., et al. Recent advances in the use of microcarriers for cell cultures and their ex vivo and in vivo applications // *Biotechnol. Lett.* Springer Netherlands, 2019. Vol. 42, № 1. P. 1–10.
4. Neto M.D., Oliveira M.B., Mano J.F. Microparticles in Contact with Cells: From Carriers to Multifunctional Tissue Modulators // *Trends Biotechnol.* Elsevier Ltd, 2019. Vol. 37, № 9. P. 1011–1028.
5. Zhou W.Y., et al. Selective laser sintering of tissue engineering scaffolds using poly(L-Lactide) microspheres // *Key Eng. Mater.* 2007. Vol. 334–335 II. P. 1225–1228.
6. Zhou W.Y., et al. Selective laser sintering of porous tissue engineering scaffolds from poly(l-lactide)/carbonated hydroxyapatite nanocomposite microspheres // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2008. Vol. 19, № 7. P. 2535–2540.
7. Antonov E.N., Krotova L.I., Minaev N. V., Minaeva S.A., et al. Surface-selective laser sintering of thermolabile polymer particles using water as heating sensitizer // *Quantum Electron.* 2015. Vol. 45, № 11. P. 1023–1028.
8. O'Brien F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering // *Mater. Today.* Elsevier Ltd, 2011. Vol. 14, № 3. P. 88–95.
9. Sawalha H., Schroën K., Boom R. Biodegradable polymeric microcapsules: Preparation and properties // *Chem. Eng. J.* Elsevier B.V., 2011. Vol. 169, № 1–3. P. 1–10.
10. Gritsch L., et al. Polylactide-based materials science strategies to improve tissue-material interface without the use of growth factors or other biological molecules // *Mater. Sci. Eng. C.* Elsevier, 2019. Vol. 94, № August 2018. P. 1083–1101.
11. Madhavan Nampoothiri K., Nair N.R., John R.P. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research // *Bioresour. Technol.* Elsevier Ltd, 2010. Vol. 101, № 22. P. 8493–8501.
12. Molavi F., Barzegar-Jalali M., Hamishehkar H. Polyester based polymeric nano and microparticles for pharmaceutical purposes: A review on formulation approaches // *J. Control. Release.* Elsevier, 2020. Vol. 320, № October 2019. P. 265–282.
13. Rosca I.D., Watari F., Uo M. Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation // *J. Control. Release.* 2004. Vol. 99, № 2. P. 271–280.
14. Campos E., Branquinho J., Carreira A.S., Carvalho A., et al. Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications // *Eur. Polym. J.* Elsevier Ltd, 2013. Vol. 49, № 8. P. 2005–2021.
15. O'Donnell P.B., McGinity J.W. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1997. Vol. 28, № 1. P. 25–42.
16. Bee S.T.L., Hamid Z.A.A., Mariatti M., Yahaya B.H., et al. Approaches to Improve Therapeutic Efficacy of Biodegradable PLA/PLGA Microspheres: A Review // *Polym. Rev.* Taylor & Francis, 2018. Vol. 58, № 3. P. 495–536.
17. Demina T.S., Kuryanova A.S., Bikmulina P.Y., Aksanova N.A., et al. Multicomponent Non-Woven Fibrous Mats with Balanced Processing and Functional Properties // *Polymers (Basel).* 2020. Vol. 12, № 9. P. 1911.
18. Demina T.S., Drozdova M.G., Sevrin C., Compère P., et al. Biodegradable cell microcarriers based on chitosan/polyester graft-copolymers // *Molecules.* 2020. Vol. 25, № 8.
19. Demina T.S., Sevrin C., Kapchiekue C., Akopova T.A., et al. Chitosan-g-Polyester Microspheres: Effect of Length and Composition of Grafted Chains // *Macromol. Mater. Eng.* 2019. Vol. 304, № 10. P. 1900203.
20. Demina T.S., et al. Polylactide-based microspheres prepared using solid-state copolymerized chitosan and d, l – lactide // *Mater. Sci. Eng. C.* 2016. Vol. 59. P. 333–338.
21. Demina T.S., Birdibekova A.V., Svidchenko E.A., Ivanov P.L., et al. Solid-State Synthesis of Water-Soluble Chitosan-g-Hydroxyethyl Cellulose Copolymers // *Polymers (Basel).* 2020. Vol. 12, № 3. P. 611.
22. Sotnikova Y.S., Demina T.S.S., Istomin A.V.V., Goncharuk G.P.P., et al. Application of micro – and nanocrystalline cellulose // *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 2018. Vol. 347, № 1. P. 012006.
23. Demina T.S., Sotnikova Y.S., Istomin A.V., Grandfils C., et al. Preparation of Poly(L, L-Lactide) Microparticles via Pickering Emulsions Using Chitin Nanocrystals // *Adv. Mater. Sci. Eng.* 2018. Vol. 2018. P. 1–8.
24. Sahoo S.K., et al. Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake // *J. Control. Release.* 2002. Vol. 82, № 1. P. 105–114.
25. Privalova A., Markvicheva E., Sevrin C., Drozdova M., et al. Biodegradable polyester-based microcarriers with modified surface tailored for tissue engineering // *J. Biomed. Mater. Res. – Part A.* 2015. Vol. 103, № 3. P. 939–948.
26. Calabrese V., Courtenay J.C., Edler K.J., Scott J.L. Pickering emulsions stabilized by naturally derived or biodegradable particles // *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* Elsevier B.V., 2018. Vol. 12, № Figure 1. P. 83–90.
27. Wei Z., Wang C., Zou S., Liu H., et al. Chitosan nanoparticles as particular emulsifier for preparation of novel pH-responsive Pickering emulsions and PLGA microcapsules // *Polymer (Guildf).* Elsevier Ltd, 2012. Vol. 53, № 6. P. 1229–1235.
28. Yang L., Zhang J., He J., Zhang J., et al. Fabrication, hydrolysis and cell cultivation of microspheres from cellulose-graft-poly(l-lactide) copolymers // *RSC Adv. Royal Society of Chemistry*, 2016. Vol. 6, № 21. P. 17617–17623.