

УДК 66.047

БИОДЕГРАДИРУЕМЫЕ МНОГОКОМПОНЕНТНЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ МАТЕРИАЛЫ**З.И. Хайбуллин^{1,2}, А.С. Курьянова³, Т.С. Демина^{1,2,3}, П.С. Тимашев³, Т.А. Аكوпова¹**¹ *Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова, Москва, Россия*² *Московский авиационный институт, Москва, Россия*³ *Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия***ВВЕДЕНИЕ**

В настоящее время одним из ключевых факторов, сдерживающих широкое применение полимерных материалов для тканевой инженерии в клинической практике, является сложность создания биodeградируемых матриксов, которые могли бы не только выступать в качестве временных подложек для адгезии и роста клеток, но и способствовать регенерации ткани / органа, сохраняющего свой функционал [1, 2]. Такой материал должен удовлетворять целому ряду требований как с точки зрения морфологии и свойств, так и технологичности переработки полимера в материал, который во многих случаях должен быть индивидуальным для каждого конкретного пациента. При создании биорезорбируемых полимерных материалов с заданными свойствами необходимо комбинировать полимеры разной природы, т. к. при использовании только одного типа практически невозможно получить материал, который был бы биосовместимым, биоактивным, обладал заданной скоростью биорезорбции, деформационно-прочностными характеристиками, четко заданной архитектоникой и т. д. Но в случае комбинирования разных полимеров в процессе создания на их основе композиционного материала возникает ряд технологических трудностей, что лимитирует как возможность регулирования их структуры / морфологии для каждого конкретного пациента, так и затрудняет их промышленное производства и, соответственно, трансляцию принципов тканевой инженерии в широкую клиническую практику. Альтернативным подходом к комбинированию разных полимеров является синтез сополимеров на их основе, т. е. комбинирование на макромолекулярном уровне, что может быть достаточно сложным с синтетической точки зрения, но открывает широкие перспективы в технологии создания различных форм материалов и регулирования их структуры/свойств.

Биоразлагаемые сложные полиэфиры (полилактид, полилактид-со-гликолид, поликапролактон и т. д.) зарекомендовали себя как надежные полимеры для создания широко спектра биорезорбируемых и биосовместимых материалов. [3,4]. Синтетические олиго-/полиэфиры обладают хорошими механическими свойствами и обеспечивают возможность получения сложных трехмерных структур с помощью ряда технологических подходов. В среде организма процесс гидролиза сложноэфирных связей этих полимеров протекает при наличии воды и содержащихся в биологических жидкостях ионов и ферментов, которые могут влиять на кинетику процесса биорезорбции. Продукты гидролиза выводятся, включаясь в метаболизм, а скорость гидролиза можно легко регулировать, изменяя химический состав и структуру полимера. Наиболее важными областями применения сложных полиэфиров являются: рассасывающиеся хирургические шовные нити, системы доставки лекарственных веществ, сердечно-сосудистые и ортопедические временные крепежные элементы, матриксы для тканевой инженерии и искусственных органов. Однако существенным недостатком полиэфиров является отсутствие специфических функциональных групп для прикрепления и роста клеток, что ограничивает эффективность материалов на их основе в качестве матриксов для тканевой инженерии. Полимеры природного происхождения, в т. ч. полисахариды и белки, обладают целым рядом биологических свойств и обеспечивают необходимую биосовместимость материалов [5–7]. К сожалению, природные полимеры достаточно трудно перерабатывать, и материалы на их основе характеризуются относительно низкими механическими характеристиками. Поскольку свойства синтетических и природных полимеров дополняют друг друга, их сочетание является одной из популярных тем биоматериаловедения, в т. ч. в области синтеза сополимеров на их основе [8,9]. Получение сополимеров с использованием традиционных растворных подходов требует применения нескольких стадий синтеза и различных дополнительных реагентов. В настоящей работе синтез сополимерной системы на основе природных и синтетических полимеров проводили методом твердофазного реакционного смешения, что позволило избежать использования растворителей и катализаторов, которые могут быть цитотоксичными, что небезопасно при создании материалов медицинского назначения [10, 11].

Цель работы – синтез сополимеров различных биodeградируемых полимеров природного (хитозан, желатин) и синтетического (поликапролактон, олиго / полиэфир) происхождения, а также исследование возможности получения различных биodeградируемых материалов на их основе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали полилактид (ПЛА) с молекулярной массой (ММ) 100 кДа, поликапролактон (ПКЛ) с ММ 67 кДа, олиго(L-лактид) с ММ 5 кДа, желатин, хитозан с ММ 80 кДа и степенью деацетилирования (СД) 0.89. Многокомпонентную систему на их основе получали с помощью механохимического подхода с использованием двухшнекового экструдера Berstorff, обладающего силовыми наборными элементами шнеков для сжатия и сдвигового деформирования компонентов ниже температуры плавления полиэфиров и без использования растворителей. Полученная система состояла из поликапролактона / полилактида / хитозана / олиголактида / желатина в соотношении 18/37/20/5/20 мас.% и была промаркирована как ППХОЖ [12]. Продукты реакции исследовали с помощью фракционного анализа в различных средах, ИК-спектromетрии, дифференциальной сканирующей калориметрии и динамического лазерного светорассеяния (ДЛС).

Микрочастицы из ППХОЖ и его смесей с ПЛА получали методом испарения растворителя из эмульсии масло / вода по методике, описанной в [13,14]. Раствор сополимера ППХОЖ или его смеси с ПЛА в смеси растворителей дихлорметан / ацетон (9/1 об./об.) использовали в качестве дисперсной фазы, а в качестве дисперсионной среды выступала дистиллированная вода. Дисперсную фазу эмульгировали в дисперсионной среде при 700 об/мин до полного испарения растворителей из дисперсной фазы. Образовавшиеся твердые микрочастицы промывали, фракционировали по размерам и сушили под вакуумом из замороженного состояния. Общий выход изготовленных микрочастиц рассчитывали как отношение массы полученных микрочастиц к общему количеству смеси сополимера с полилактидом, растворенного в дисперсной фазе для каждой системы.

Пленочные материалы получали из 1 мас.% раствора ППХОЖ в хлороформе методом полива на стеклянную чашку Петри и сушили в беспылевом шкафу при комнатной температуре. Нетканые материалы из ППХОЖ получали методом электроформования (ЭФ) на установке ESR100D NanoNC (Корея) из стабильных фракций сополимера ППХОЖ в хлороформе. Все параметры обработки были предварительно оптимизированы для получения бездефектных волокнистых материалов толщиной 100–120 мкм [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные ИК-спектроскопии указывают на образование привитых сополимеров в процессе механохимической обработки реакционной смеси. Наиболее вероятным каналом реакции является аминолиз сложноэфирных связей олиго/полиэфиров аминogруппами хитозана. Фракционный анализ ППХОЖ показал, что прививка на хитозан / желатин фрагментов сложных олиго / полиэфиров приводит к снижению их растворимости в водных средах, что, однако, компенсируется их способностью образовывать ультратонкие дисперсии в хлорсодержащих растворителях, что для исходных полисахаридов/белков нехарактерно. Согласно данным ДЛС анализу ППХОЖ в хлороформе образует стабильные растворы со средним размером макромолекулярных ассоциатов приблизительно 550 нм, а также фракцию ассоциатов с субмикронным размером (рис. 1).

Амфифильные свойства ППХОЖ обеспечивают возможность использовать их для получения «самостабилизирующихся» микрочастиц методом испарения растворителя из эмульсий масло / вода. В зависимости от соотношения сополимер ППХОЖ/гомополимер ПЛА в дисперсной фазе выход микрочастиц варьировался от 36 до 46 мас.%, что ниже значений, полученных при использовании других привитых сополимеров хитозана с олиго / полиэфирами [13,14]. Способность сополимера стабилизировать границу раздела фаз в процессе получения микрочастиц зависит от миграции гидрофильных фрагментов на границу раздела фаз и, вероятно, затруднено достаточно длинными привитыми фрагментами ПКЛ и ПЛА в случае сополимера ППХОЖ. Наибольший выход микрочастиц был характерен для системы, состоящей из 70 мас.% ПЛА и 30 мас.% ППХОЖ в дисперсной фазе. Полученные микрочастицы имели средний размер ~ 400 мкм и сферическую форму (рис. 2). Полимерные биodeградируемые микрочастицы, в т. ч. из ППХОЖ, а также его смеси с ПЛА, могут использоваться в качестве биodeградируемых клеточных многофункциональных микроносителей, а также в качестве исходного материала для создания трехмерных материалов на их основе с помощью различных методов, в т. ч. аддитивных технологий [15–18].

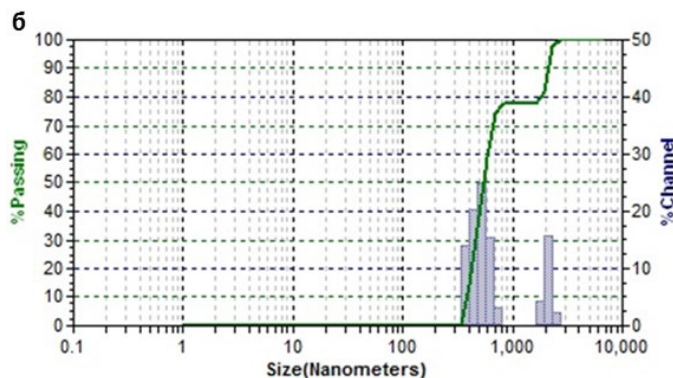


Рис. 1. Фото стабильной дисперсии ППХОЖ в CHCl_3 (а); гистограмма распределения макромолекулярных ассоциатов в 0.2 мас.% растворе ППХОЖ в CHCl_3 по данным ДЛС (б)

Возможность получать микрочастицы из амфифильных сополимеров позволяет избежать использования дополнительных эмульгаторов в дисперсионной среде в процессе их формирования, а также обогатить их поверхность биоактивными природными полимерами, что важно для прикрепления/роста клеток как на поверхности микрочастиц, так и материалов на их основе.

Сниженная растворимость в водных средах и способность образовывать дисперсии в апротонных органических растворителях позволяет получать обогащенные природными компонентами и стабильные в воде материалы из ППХОЖ с помощью и других методов. На рисунке 3 приведены микрофотографии пленки и микроволокнистого нетканого материала из ППХОЖ, полученные из его дисперсий в хлороформе с помощью метода полива и электроформования, соответственно. Метод электроформования в настоящее время является одним из наиболее эффективных технологий создания нетканых материалов из микро- и нановолокон и позволяет получать высокопористые материалы, которые имитируют оригинальный внеклеточный матрикс. Сходство физической структуры волокна с внеклеточным матриксом обеспечивается за счет нанометрового диаметра волокон и их пористой поверхности. Полученные из ППХОЖ нетканые микроволокнистые материалы показали цитосовместимость по отношению к мезенхимальным стромальным клеткам человека и способность поддерживать их адгезию и рост в процессе культивирования *in vitro* [12].

Пленочные и нетканые материалы можно получить и из немодифицированного хитозана и желатина, но только из водных растворителей, что требует их дальнейшего перевода в нерастворимую форму с помощью, например, сшивающих агентов, что не всегда безопасно для дальнейшего применения в биомедицине. Способность ППХОЖ образовывать стабильные дисперсии в апротонных хлорсодержащих растворителях позволяет формовать материалы, которые не требуют дальнейшей пост-обработки.

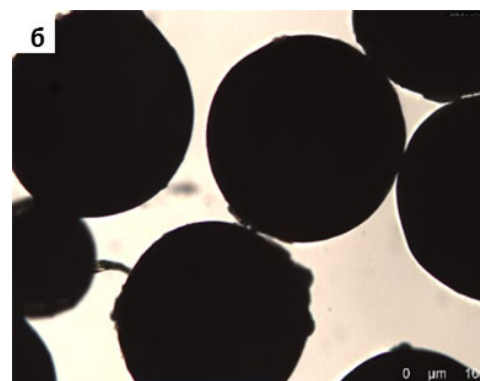
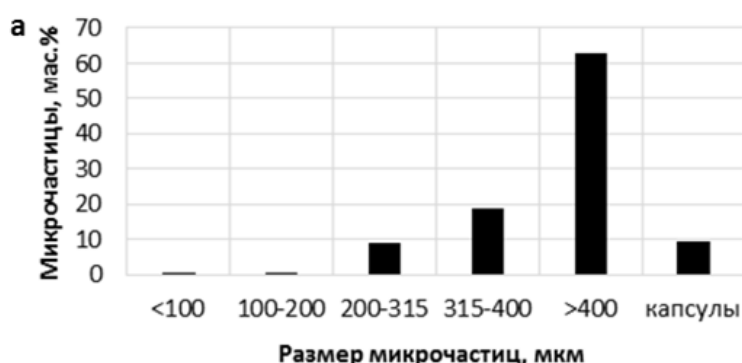


Рис. 2 Гистограмма распределения микрочастиц ПЛА/ППХОЖ по размерам (а) и микрофотография полученных микрочастиц (б)

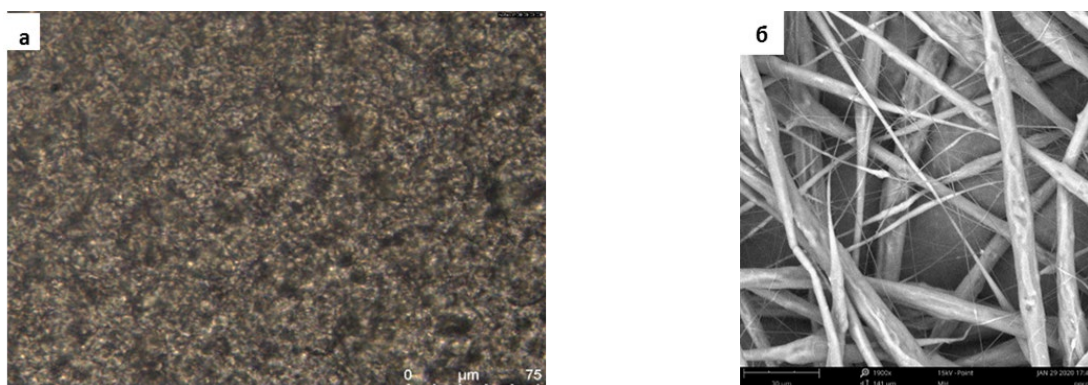


Рис. 3. Микрофотографии пленки (а) и нетканых микроволокнистых материалов (б), полученных, соответственно, методом полива и электроформования из дисперсии ППХОЖ в хлороформе

Таким образом, методом твердофазного синтеза была получена многокомпонентная сополимерная система на основе сложных олиго-/полиэфиров и полимеров природного происхождения. Результаты фракционного анализа показали, что полученный сополимер частично теряет растворимость в водных средах, но приобретает способность образовывать дисперсии в хлорсодержащих растворах. Сочетание гидрофильных и липофильных фрагментов обеспечивает амфифильные свойства ППХОЖ и возможность формировать из них микрочастицы, стабилизирующиеся без введения дополнительных эмульгаторов. Ультратонкие стабильные дисперсии ППХОЖ можно также использовать для изготовления пленок или более сложных материалов в виде волокнистых нетканых материалов, полученных электроформованием. Наряду с технологичностью, материалы из ППХОЖ обладают цитосовместимостью к мезенхимальным стромальным клеткам человека и могут быть использованы в качестве матриксов для регенеративной медицины.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18–29–17050) в части получения и исследования нетканых материалов и гранта Президента (МК-1974.2019.3) в части формирования и исследования сферических микрочастиц

ЛИТЕРАТУРА

1. O'Brien F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering // Mater. Today. Elsevier Ltd, 2011. Vol. 14, № 3. P. 88–95.
2. Hunsberger J.G., Shupe T., Atala A. An Industry-Driven Roadmap for Manufacturing in Regenerative Medicine // Stem Cells Transl. Med. 2018. Vol. 7, № 8. P. 564–568.
3. 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.
4. Poh P.S.P., et al. Polylactides in additive biomanufacturing // Adv. Drug Deliv. Rev. Elsevier B.V., 2016. Vol. 107. P. 228–246.
5. Anitha A., et al. Chitin and chitosan in selected biomedical applications // Prog. Polym. Sci. Elsevier Ltd, 2014. Vol. 39, № 9. P. 1644–1667.
6. Ahsan S.M., Thomas M., Reddy K.K., Sooraparaju S.G., et al. Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering // Int. J. Biol. Macromol. Elsevier B.V., 2018. Vol. 110. P. 97–109.
7. Asghari F., Samiei M., Adibkia K., Akbarzadeh A., et al. Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review // Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol. 2017. Vol. 45, № 2. P. 185–192.
8. Liu Y., Tian F., Hu K.A. Synthesis and characterization of a brush-like copolymer of polylactide grafted onto chitosan // Carbohydr. Res. 2004. Vol. 339, № 4. P. 845–851.
9. Li G., Zhuang Y., Mu Q., Wang M., et al. Preparation, characterization and aggregation behavior of amphiphilic chitosan derivative having poly (l-lactic acid) side chains // Carbohydr. Polym. 2008. Vol. 72, № 1. P. 60–66.
10. Akopova T.A., Zelenetskii A.N., Ozerin A.N. Solid state synthesis and modification of chitosan // Focus on Chitosan Research. 2011. 223–253 p.
11. James S.L., Adams C.J., Bolm C., Braga D., et al. Mechanochemistry: opportunities for new and cleaner synthesis // Chem. Soc. Rev. 2012. Vol. 41, № 1. P. 413–447.
12. Demina T.S., Kuryanova A.S., Bikmulina P.Y., Aksenova N.A., et al. Multicomponent Non-Woven Fibrous Mats with Balanced Processing and Functional Properties // Polymers (Basel). 2020. Vol. 12, № 9. P. 1911.
13. Demina T.S., et al. Biodegradable cell microcarriers based on chitosan/polyester graft-copolymers // Molecules. 2020. Vol. 25, № 8.
14. Demina T.S., et al. Chitosan-g-Polyester Microspheres: Effect of Length and Composition of Grafted Chains // Macromol. Mater. Eng. 2019. Vol. 304, № 10. P. 1900203.
15. Li B., 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.
16. Chen X.Y., 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.
17. Jiang T., Abdel-Fattah W.I., Laurencin C.T. In vitro evaluation of chitosan/poly(lactic acid-glycolic acid) sintered microsphere scaffolds for bone tissue engineering // Biomaterials. 2006. Vol. 27, № 28. P. 4894–4903.
18. 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.