

**ИММОБИЛИЗАЦИЯ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА PLLA СКАФФОЛДАХ,
ОБРАБОТАННЫХ ПЛАЗМОЙ АТМОСФЕРНОГО ДАВЛЕНИЯ**

Э.В.Киблер, В.Л. Кудрявцева, М.В.Журавлев

Научный руководитель: доцент, к.ф-м.н. С.И.Твердохлебов

Национальный исследовательский Томский политехнический университет,

Россия, г.Томск, пр. Ленина, 30, 634050

E-mail: kibler.elina@mail.ru

**ATMOSPHERIC PRESSURE PLASMA ASSISTED IMMOBILIZATION OF HYALURONIC
ACID ON PLLA SCAFFOLDS**

E.V.Kibler, V.L.Kudryavtseva, M.V. Zhuravlev

Scientific Supervisor: ass. prof., Dr. S.I.Tverdokhlebov

Tomsk Polytechnic University, Russia, Tomsk, Lenin str., 30, 634050

E-mail: kibler.elina@mail.ru

***Abstract.** The effect of atmospheric pressure plasma treatment on properties of polylactic acid (PLLA) scaffolds after saturation in hyaluronic acid was investigated. Modification of scaffolds was performed in the system for the formation of self-sustained volume discharge with following parameters: pulse repetition frequency - 500 Hz, pulse voltage - 20 kV, pulse duration - 120 ns, pulse energy - 0.3 J. Properties of the scaffolds were examined by means of wettability analysis, ¹H NMR analysis and scanning electron microscopy. It was shown that treatment of scaffolds does not change surface morphology, significantly increasing hydrophilicity of scaffolds and allows immobilizing of hyaluronic acid on the surface due to intensive formation of free radicals on the surface.*

В тканевой инженерии интенсивно развивается новый подход к восстановлению функций поражённых органов и тканей человека с применением полимерных материалов. Важная роль при этом подходе отводится скаффолдам - искусственным носителям живых клеток, имитирующих естественные внеклеточные скаффолды организма [1]. Для улучшения биосовместимости с клетками поверхность скаффолда модифицируют [2].

Большинство полимеров, применяемых для изготовления скаффолдов, гидрофобны, что снижает жизнеспособность клеток. Управляемая гидрофилизация поверхностей скаффолда является одним из необходимых условий модифицирования. На сегодняшний день существует множество способов гидрофилизации полимерных поверхностей. Одним из них является обработка поверхности неравновесной газоразрядной плазмой [3]. Плазменная обработка изменяет поверхностную энергию полимера и, как следствие, приводит к улучшению смачиваемости и стимулирует образование свободных радикалов [4].

В целях улучшения совместимости скаффолда с живыми тканями поверхность материала сшивают с биоактивными молекулами полимеров. Одним из таких полимеров, ускоряющих процесс регенерации и обладающих высокой гидрофильностью, является гиалуроновая кислота (ГК) [5].

Целью настоящей работы является: изучение свойств скаффолда из полимолочной кислоты, модифицированных в плазме атмосферного давления (ПАД) с последующей обработкой гиалуроновой кислотой.

Для формирования нетканых материалов использовали 4 % раствор поли-L-молочной кислоты PL38 (PURAC, Нидерланды) в хлороформе (ЭКРОС, Россия). Формирование нетканых материалов осуществляли методом электроспиннинга на установке NANON-01A® (МЕСС, Япония). В качестве сборочного коллектора использовали вращающийся цилиндр диаметром 100 мм, длиной 210 мм, при следующих технологических режимах: скорость подачи раствора 6 мл/час, напряжение 20 кВ, расстояние между иглой и коллектором 190 мм, частота вращения сборочного коллектора 50 об/мин. Для достижения кристаллизации материала скаффолды отжигали в вакууме при давлении 10 Па в течение 10 часов при температуре 90 °С.

Модифицирование скаффолдов в ПАД осуществлялось электродной системой с преионизатором. Для модифицирования образцов параметры установки были следующими: частота следования импульсов 500 Гц, напряжения импульса 20 кВ, длительность импульса 120 нс, энергия в импульсе 0,3 Дж, время облучения 10 минут.

Три группы образцов, модифицированных в ПАД, подверглись обработке в водном растворе ГК различной концентрации: 0,1%, 0,2% и 0,3% в течение 30 минут. Смачиваемость поверхности полученных образцов исследовали на установке «EasyDrop» (Krüss, Германия) методом «сидячей» капли (объем 3 мкл), помещенной на исследуемую поверхность, путем измерения краевого угла смачивания. Исследования морфологии поверхности скаффолдов до и после модифицирования проводили методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на приборе Quanta 400 FEG (FEI Company, США) с нанесением проводящего покрытия из золота. Исследование элементного состава проводили на ЯМР-Фурье спектрометре «AVANCE AV 300» (Bruker, Германия) при 300 МГц в растворах ДМСО.

Воздействие плазмы атмосферного давления приводит к резкому уменьшению угла смачиваемости как полярной, так и не полярной жидкостями, что объясняется активным образованием свободных радикалов на поверхности полимерного материала вследствие обработки плазмой.

Образцы, обработанные водным раствором ГК, показывают большие углы смачиваемости, а следовательно, меньшую гидрофильность по сравнению с образцом, модифицированным в ПАД и не обработанным раствором ГК, для которого наблюдается полная смачиваемость, из-за чего можно предположить, что свободные радикалы, образовавшиеся на поверхности материала, частично образовали связи с ГК.

При сравнении углов смачиваемости для модифицированных плазмой скаффолдов, обработанных раствором ГК с концентрацией 0,1%, 0,2% и 0,3%, было замечено, что скаффолд, покрытый ГК с концентрацией 0,2%, имеет наиболее низкое значение угла смачиваемости полярной жидкостью. При этом наименьшим углом смачиваемости неполярной жидкостью обладает скаффолд, покрытый ГК с концентрацией 0,3%. Следовательно, данные режимы приводят к наиболее выраженной гидрофильности образца в сравнении с образцом, обработанным раствором ГК с концентрацией 0,1%. Увеличение гидрофильности поверхности объясняется тем, что ГК обладает выраженными гидрофильными свойствами, и обработка скаффолда гиалуроновой кислотой улучшает его смачиваемость.

Для оценки влияния плазмы атмосферного давления на размеры волокон скаффолдов были построены гистограммы распределения по диаметрам волокон до и после модифицирования. Из сопоставления средних диаметров волокон всех пяти групп образцов видно, что при модифицировании поверхностей скаффолдов в ПАД и при обработке их ГК морфология скаффолдов остается неизменной.

На рис. 1 представлены спектры ЯМР H^1 двух образцов: образца, обработанного гиалуроновой кислотой с концентрацией 0,1% и образца контрольной группы. Следы ГК лучше всего видны на спектре образца, обработанного ГК с концентрацией 0,1%. Сигналы, соответствующие ГК, можно наблюдать в области 2-2,5 и 4-4,5 ppm. Частично сигналы совпали с сигналом растворителя (ДМСО) ($\delta = 2,6$ ppm).

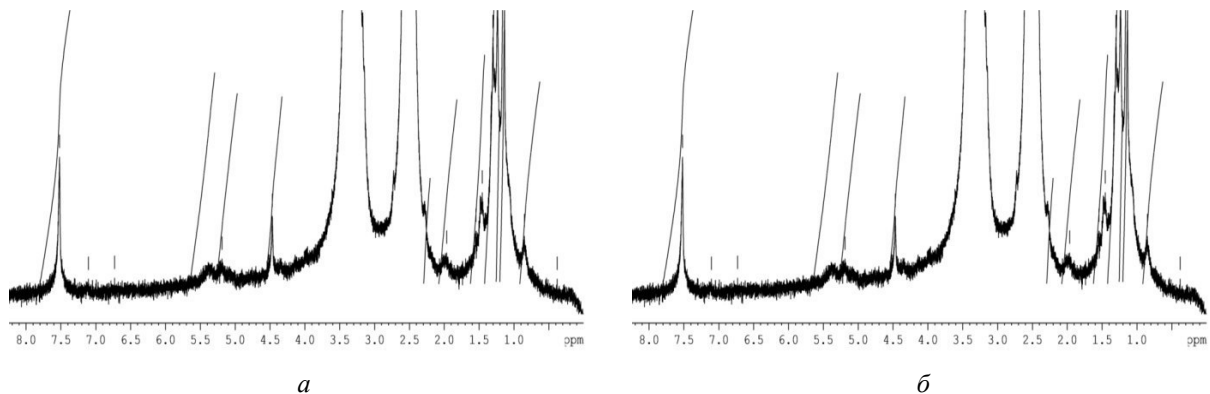


Рис.1. Спектры ЯМР H^1 а) образца контрольной группы и

б) образца, обработанного гиалуроновой кислотой с концентрацией 0,1%. Сигналы, соответствующие гиалуроновой кислоте, находятся в областях 2-2,5 ppm и 4-4,5 ppm

В работе было показано, что модифицирование поверхности скаффолдов полимолочной кислоты плазмой атмосферного давления приводит к резкому увеличению смачиваемости поверхности, обуславливаемое образованием свободных радикальных связей на поверхности образца. Также, данный способ модифицирования не приводит к изменению морфологии поверхности скаффолда. Вследствие образования свободных радикальных связей присоединение молекул гиалуроновой кислоты возможно, о чем свидетельствуют спектры ЯМР H^1 .

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bhardwaj N., Kundu S.C. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique // *Biotechnology advances*. – 2010. – V. 28. – N. 3. – P. 325-347.
2. Chu P. K. et al. Plasma-surface modification of biomaterials // *Materials Science and Engineering: R: Reports*. – 2002. – Т. 36. – №. 5. – С. 143-206.
3. Desmet T. et al. Nonthermal plasma technology as a versatile strategy for polymeric biomaterials surface modification: a review // *Biomacromolecules*. – 2009. – Т. 10. – №. 9. – С. 2351-2378.
4. Медведев Д.Д. и др. Плазмообразующие полимерные среды для инерциального термоядерного синтеза и биоинженерии // *Вопросы атомной науки и техники. Сер. Термоядерный синтез*. – 2010. – Т. 1. – С. 22-31.
5. Сигаева Н.Н. и др. Химическая модификация гиалуроновой кислоты и ее применение в медицине // *Вестник Башкирского университета*. – 2012. – Т. 17. – №. 3. – С. 1220-1241.