

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

На правах рукописи



ГОРЕНИНСКИЙ СЕМЕН ИГОРЕВИЧ

**НОВЫЕ МЕТОДЫ ПОВЕРХНОСТНОГО И ОБЪЕМНОГО
МОДИФИЦИРОВАНИЯ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ
БИОРАЗЛАГАЕМЫХ ПОЛИЭФИРОВ ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ
ПРИМЕНЕНИЙ**

Специальность: 05.11.17 – Приборы, системы и изделия медицинского назначения

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель:
Доктор химических наук, профессор
Филимонов Виктор Дмитриевич

Томск – 2020

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	6
Глава 1 Литературный обзор.....	12
1.1 Использование скаффолдов на основе биоразлагаемых полимеров в медицине	12
1.1.1 Биоразлагаемые волокнистые скаффолды для целевой доставки лекарственных средств	12
1.1.2 Биоразлагаемые волокнистые скаффолды в регенеративной медицине	13
1.2 Поли(ε-капролактон) и поли(молочная кислота).....	14
1.3 Методы формования скаффолдов на основе биоразлагаемых полиэфиров	17
1.3.1 Электроформование.....	17
1.3.2 Формование под действием центробежной силы.....	17
1.3.3 Аэродинамическое формование	18
1.3.4 Фазовое разделение	18
1.3.5 Прядильная технология с контролируемыми параметрами.....	18
1.3.6 Методы модифицирования скаффолдов на основе биоразлагаемых полиэфиров	20
1.3.7 Методы поверхностного модифицирования	20
1.3.8 Методы модифицирования в объеме	23
Глава 2 Экспериментальная часть	25
Глава 3. Поверхностное модифицирование с использованием обработки смесью хорошего и плохого растворителей.....	35
3.1 Поверхностное модифицирование пленок из поли(молочной кислоты) ..	35
3.1.1 Выбор системы «хороший/плохой растворитель»	36
3.1.2 Подбор условий проведения модифицирования	36

3.1.3	Качественная и количественная оценка результатов модифицирования пленок из поли(молочной кислоты)	39
3.2	Получение скаффолдов на основе поли(ε-капролактона) и поли(молочной кислоты), содержащих иод на поверхности волокон, с использованием метода «хороший/плохой растворитель»	47
3.2.1	Подбор состава системы «хороший/плохой растворитель»	48
3.2.2	Изучение динамики нанесения иода на поверхность волокон	53
3.3	Физико-химические свойства скаффолдов, содержащих иод на поверхности волокон	54
3.3.1	Морфология скаффолдов, содержащих иод на поверхности волокон	54
3.3.2	Механические свойства скаффолдов, содержащих иод на поверхности волокон	57
3.4	Антибактериальные свойства скаффолдов, содержащих иод на поверхности волокон	57
3.5	Получение скаффолдов на основе поли(молочной кислоты), содержащих желатин на поверхности волокон, с использованием метода «хороший/плохой растворитель»	60
3.6	Физико-химические свойства скаффолдов, содержащих желатин на поверхности волокон	62
3.6.1	Морфология скаффолдов, содержащих желатин на поверхности волокон	62
3.6.2	Гидрофильность скаффолдов, содержащих желатин на поверхности волокон	64
3.6.3	Механические свойства скаффолдов, содержащих желатин на поверхности волокон	64
3.7	Исследование биосовместимости скаффолдов, содержащих желатин на поверхности волокон	65
3.8	Краткие выводы по главе 3	66

Глава 4. Получение композитных материалов, модифицированных в объеме	68
4.1 Получение скаффолдов на основе поли(ϵ -капролактона), содержащих L-аргинин	68
4.2 Физико-химические свойства скаффолдов, содержащих L-аргинин	69
4.2.1 Изучение влияния концентрации L-аргинина в прядильном растворе на морфологию полученных скаффолдов	69
4.2.2 Механические свойства скаффолдов с различным содержанием L-аргинина	70
4.3 Исследование биосовместимости скаффолдов, содержащих L-аргинин, in vitro	71
4.4 Получение скаффолдов на основе поли(ϵ -капролактона) и поливинилпирролидона с использованием гексафторизопропанола в качестве общего растворителя	72
4.4.1 Изучение влияния соотношения поли(ϵ -капролактона) и поливинилпирролидона в прядильном растворе на морфологию полученных материалов	75
4.5 Физико-химические свойства скаффолдов на основе поли(ϵ -капролактона) и поливинилпирролидона	76
4.5.1 Механические свойства скаффолдов с различным соотношением поли(ϵ -капролактона) и поливинилпирролидона	76
4.5.2 Изучение стабильности полученных материалов в водной среде	78
4.6 Исследование биосовместимости скаффолдов на основе поли(ϵ -капролактона) и поливинилпирролидона	81
4.6.1 Клеточные исследования in vitro	81
4.6.2 Краткие выводы по главе 4	82
ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ	84
Список литературы	85
Приложение А Акт об использовании результатов диссертационной работы	97
Приложение Б Акт внедрения в научную деятельность результатов	

диссертационной работы	99
Приложение В Акт внедрения в научную деятельность результатов диссертационной работы	100
Приложение Г Акт внедрения в учебном процессе результатов диссертационной работы.....	101
Приложение Д Патент на изобретение	102

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Регенеративная и персонализированная медицина является трендом последние десятилетия. Данные направления медицинской науки предполагают восстановление поврежденных, или утраченных тканей человека, а также индивидуальное (а, значит, более эффективное) использование терапевтических препаратов и материалов. Использование современных методов и подходов регенеративной и персонализированной медицины позволяет не только увеличить эффективность лечения, но и преодолеть возможные физиологические и социальные проблемы, с которыми сталкивается пациент.

В большинстве случаев, регенеративная медицина предполагает использование имплантируемых изделий, разработка новых материалов для которых активно ведется. В частности, широкое распространение получили волокнистые скаффолды, изготовленные из биоразлагаемых полимеров и композиционных материалов на их основе. Подобные структуры позволяют создать условия, необходимые для роста и распространения клеток восстанавливаемой ткани. Биоразлагаемые полимеры (такие, как поли(молочная кислота) и поли(ϵ -капролактон)) обладают высокой биосовместимостью, а также способны замещаться в организме человека собственными здоровыми тканями, что устраняет необходимость повторных операций по удалению имплантируемого изделия. Метод электроспиннинга (электроформования) является одним из наиболее распространенных подходов для получения волокнистых полимерных скаффолдов. Основным его преимуществом является возможность изменения свойств получаемых материалов посредством варьирования параметров формования (подаваемого напряжения, скорости подачи прядильного раствора, типа коллектора). Скаффолды, полученные методом электроформования, обладают высокой пористостью, что делает их отличным материалом, симулирующим внеклеточный матрикс (ВКМ).

Несмотря на перспективность и широкие возможности применения скаффолдов на основе биоразлагаемых полимеров, часто данные материалы не

обладают свойствами, необходимыми для конкретного применения (механическими характеристиками, гидрофильностью, биологической активностью, и так далее). С целью придания биоразлагаемым полимерам необходимых свойств используют ряд физических и химических методов модифицирования. Однако при этом остаются важные проблемы, не имеющие на данный момент общих решений.

В частности, многие органические и неорганические соединения (например, иод) несовместимы с биоразлагаемыми полимерами, что приводит к ухудшению механических свойств композитных материалов, наполненных такими модификаторами. В таких случаях, решением проблемы могут выступить методы, позволяющие закрепить молекулы модификатора только в поверхностных слоях полимера, не затрагивая основной объем изделия и не ухудшая его механических характеристик. Еще одним часто встречающимся затруднением в разработке и получении наполненных полимерных композитов является отсутствие общего растворителя полимера и модификатора. Например, аминокислоты обычно нерастворимы в растворителях, способных растворять поли(молочную кислоту) или поли(ϵ -капролактон). По этой причине, композиты указанных биоразлагаемых полимеров и аминокислот встречаются редко и их свойства малоизучены. Отсюда актуальной проблемой является поиск общих растворителей полимеров и модификаторов.

В связи с обозначенными вопросами в области разработки и получения биоразлагаемых композитных материалов, данное исследование направлено на разработку новых методов как поверхностного, так и объемного модифицирования поли(молочной кислоты) и поли(ϵ -капролактона) для получения новых композитных биоразлагаемых материалов.

Актуальность выбранного направления подтверждается выполнением исследований, представленных в настоящей работе, при финансовой поддержке Федеральной Целевой Программы «Разработка композитных имплантатов для реконструктивно-восстановительной хирургии черепно-лицевой области у больных травматологического и онкологического профиля», тема № 0.1388.2014 и

проектов РФФИ № 16-33-00528 мол_а «Разработка фундаментальных подходов к созданию биоразлагаемых материалов, способных влиять на клетки иммунитета человека» и № 19-43-703020 р_мол_а «Композитные биоразлагаемые материалы для контролируемой доставки цитостатических препаратов на основе поли(ε-капролактона) и поливинилпирролидона». Научная работа соискателя поддержана стипендией Правительства РФ в 2019 и 2020 годах.

Цель исследования состоит в разработке новых и альтернативных методов поверхностного и объемного модифицирования материалов на основе биоразлагаемых полиэфиров.

Для достижения поставленной цели, необходимо решить следующие задачи:

1 Разработка способа поверхностного модифицирования изделий из поли(молочной кислоты) и поли(ε-капролактона), включающего обработку поверхности полимера смесью «хороший/плохой растворитель», сорбцию модифицирующего агента в поверхностном слое изделия и стадию сушки. Иммобилизация на поверхности изделий из поли(молочной кислоты) и поли(ε-капролактона) иода и желатина с использованием предложенного способа. Исследование физико-химических, механических и биологических свойств полученных материалов.

2 Поиск общего растворителя для поли(ε-капролактона) и L-аргинина. Разработка и получение материалов на основе данных компонентов. Исследование физико-химических, механических и биологических свойств полученных материалов.

3 Поиск общего растворителя для поли(ε-капролактона) и поливинилпирролидона. Разработка и получение материалов на основе данных компонентов. Исследование физико-химических, механических и биологических свойств полученных материалов.

4 Определение возможных областей применения полученных материалов в медицине.

Научная новизна. В работе впервые:

1. Предложен и осуществлен метод поверхностного модифицирования изделий, на основе поли(молочной кислоты) и поли(ε-капролактона), основанный на предварительной обработке смесью «хороший/плохой растворитель» и позволяющий впервые иммобилизовать иод и желатин на поверхности пленок и скаффолдов.

2. 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропанол (ГФИП) предложен в качестве общего растворителя поли(ε-капролактона) и L-аргинина, позволяющего впервые получить волокнистые скаффолды на основе поли(ε-капролактона) с добавлением L-аргинина.

3. Предложен новый метод получения скаффолдов на основе поли(ε-капролактона) и поливинилпирролидона с применением ГФИП в качестве общего растворителя.

Практическая значимость работы. Материалы, разработанные в рамках данной работы, имеют широкий диапазон применений в медицине:

1) Скаффолды и пленки из поли(молочной кислоты) и поли(ε-капролактона) с иодом, закрепленным на поверхности волокон, обладают бактериостатической и антибактериальной активностью, что делает их перспективными материалами для перевязки, хирургических нитей и фильтров.

2) Скаффолды из поли(молочной кислоты) с иммобилизованным желатином, обеспечивают улучшенную биосовместимость. Полученные материалы могут быть использованы в регенеративной медицине хрящевой ткани и тканей кровеносных сосудов (на основании Акта об использовании результатов диссертационной работы в ФБГУ «НМИЦ ТО имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава России от 09.10.2020, Акта внедрения в научную деятельность ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России от 16.10.2020).

3) Скаффолды на основе поли(ε-капролактона), содержащие L-аргинин, являющийся естественным источником оксида азота (II), перспективны в разработке сосудистый графтов (на основании Акта внедрения в научную деятельность ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России от 16.10.2020).

4) Сcafфолды на основе поли(ϵ -капролактона) и поливинилпирролидона могут быть использованы в качестве систем целевой доставки широкого ряда биологически активных веществ с контролируемым выходом.

Научные положения, выносимые на защиту:

Метод «хороший/плохой растворитель», позволяющий закрепить модифицирующий агент в поверхностных слоях изделий из поли(молочной кислоты) и поли(ϵ -капролактона). С применением предложенного метода, впервые получены материалы, содержащие иод, обладающие антибактериальной и бактериостатической активностью. На примере желатина, показана возможность иммобилизации белковых молекул для увеличения биосовместимости.

Метод получения композитных материалов на основе поли(ϵ -капролактона) и L-аргинина, предусматривающий использование ГФИП в качестве общего растворителя. Концентрация L-аргинина в композитном материале, обеспечивающая наилучшую биосовместимость, в диапазоне 0,5-1 % масс.

Метод получения волокнистых скаффолдов на основе поли(ϵ -капролактона) и поливинилпирролидона с использованием ГФИП в качестве общего растворителя. Добавление поливинилпирролидона в прядильный раствор привело к улучшению смачиваемости полученных материалов и росту их прочности.

Апробация работы. Основные результаты докладывались и обсуждались на следующих конференциях: «Высокие технологии в современной науке и технике» (Россия, г. Томск, 2016, 2017), «Молекулы и системы для диагностики и адресной терапии» (МСДТ2017) (Россия, г. Томск, 2017), 5th International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials (Португалия, г. Лиссабон, 2017). Основные результаты диссертационной работы внедрены в научный и учебный процесс ведущих медицинских центров России (на основании Акта об использовании результатов диссертационной работы в ФБГУ «НМИЦ ТО имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава России от 09.10.2020, Акта внедрения в научную деятельность ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России от 16.10.2020, Акта внедрения в учебную деятельность ФГБУ «НМИЦ им. В.А.

Алмазова» Минздрава России).

Публикации. Результаты работы представлены в 4 научных публикациях, входящих в базы данных Scopus и Web of Science, из которых 2 – в журналах Q1 и Q2, 1 патент Российской Федерации.

Личный вклад автора заключается в анализе литературных данных по теме исследования, в постановке цели и задач работы, планировании и проведении экспериментальных исследований, а также анализе полученных данных, формулировке выводов и положений, выносимых на защиту, подготовке публикаций и докладов по теме работы.

Структура и объём научно-квалификационной работы. Диссертация состоит из введения и четырех глав, заключения и основных выводов, изложенных на 102 страницах машинописного текста, включая 31 рисунок, 15 таблиц, список использованной литературы, включающий 106 наименований, и 5 приложений.

ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Использование скаффолдов на основе биоразлагаемых полимеров в медицине

Благодаря возможности получения широкого спектра материалов с различной структурой и свойствами посредством подбора параметров формования, метод электроспиннинга используется для получения волокнистых структур в различных областях медицины, включая целевую доставку лекарственных средств, биосенсоры, тканевую инженерию и регенеративную медицину.

1.1.1 Биоразлагаемые волокнистые скаффолды для целевой доставки лекарственных средств

Благодаря широкому выбору материалов и простоте загрузки терапевтического агента, для целевой доставки лекарственных средств используется широкий ряд систем на основе биоразлагаемых волокнистых скаффолдов, полученных методом электроспиннинга [1].

Для подобных систем доставки характерен двухэтапный характер профиля выхода лекарственного средства, включающий “burst” стадию, в которой наблюдается резкое повышение концентрации лекарственного средства в месте имплантации, и дальнейшее поддержание концентрации на постоянном уровне [2]. В качестве примера, можно рассмотреть скаффолды на основе водорастворимого полимера поли(этиленоксида) (ПЭО) и водонерастворимого полимера поли(молочной кислоты) (ПМК), загруженные цитостатическим препаратом Доксорубицин и предложенные для локальной противораковой терапии. Скаффолды с соотношением полимеров 10/90 позволили достичь высокой концентрации Доксорубина и поддержать её в течение

продолжительного времени при имплантации скаффолдов на поверхности опухоли [3].

Перспективным считается направление разработки биоразлагаемых полимерных систем доставки, чувствительных ко внешним (свет, магнитное поле, температура [4,5]) и внутренним (pH среды, активность ферментов [6]), позволяющих доставлять лекарственные средства по мере необходимости [7]. Группой Xie разработаны pH-чувствительные скаффолды на основе поли(ϵ -капролактона). При низких значениях pH (6,5-7,2), свойственных для раковых опухолей, из полученных материалов высвобождалось количество Доксорубина, достаточное для гибели большего количества раковых клеток, чем при естественном pH тканей (7,4) [8].

Также, композитные скаффолды на основе гидрофобного и гидрофильного полимеров позволили добиться продолжительного высвобождения различных лекарственных средств [9]. В данном случае, гидрофобный полимер (поли(ϵ -капролактон)) выступал в роли барьерного слоя, препятствующего смачиванию и растворению внутреннего слоя волокон (на основе сополимера глицерин моностеарата и ϵ -капролактона), содержащего препарат для химиотерапии SN-38. Создание гидрофобного поверхностного слоя позволило добиться высвобождения загруженного препарата в течение 50 дней.

1.1.2 Биоразлагаемые волокнистые скаффолды в регенеративной медицине

Регенеративная медицина предусматривает восстановление утраченных, или поврежденных органов и тканей с использованием трех элементов: клеток, скаффолда, выступающего в качестве основы их роста и сигнальных молекул [10]. Скаффолды, применяемые в регенеративной медицине должны обладать необходимыми механическими характеристиками, высокой биосовместимостью и сроками деградации, сопоставимыми со скоростью восстановления тканей организма. Синтетические полиэфиры, среди которых – поли(молочная кислота), поли(ϵ -капролактон) и их сополимеры, нашли широкое применение в данной

области благодаря своим механическим характеристикам. В то же время, синтетические полимеры часто обладают неудовлетворительной биосовместимостью. В этом случае, возникает необходимость получения композитных скаффолдов, в состав которых входят природные полимеры (коллаген, желатин, хитозан), обладающие высокой биосовместимостью, но низкими прочностными характеристиками [11]. Так, скаффолды на основе поли(ϵ -капролактона) и желатина, полученные группой Zhang [12], не только обладали высокой биосовместимостью, что проявлялось в лучшей адгезии клеток, но и оказались перспективным материалом для восстановления тканей, поскольку стромальные клетки костного мозга мигрировали и в объем скаффолда.

Для регенеративной медицины кожных покровов, группой Fu предложен материал на основе смеси желатина и поли(ϵ -капролактона) с упорядоченными отверстиями, предназначенный для резндотелизации ран и формирования новых кровеносных сосудов [13]. Трехмерные скаффолды на основе желатина и поли(ϵ -капролактона) также предложены, как перспективный материал для восстановления хрящевой ткани [14].

Таким образом, композитные скаффолды на основе биоразлагаемых полиэфиров являются перспективными материалами для целевой доставки лекарственных средств и регенеративной медицины, предоставляя широкие возможности для контролируемого высвобождения терапевтических агентов (в том числе, под действием внешних физических и биологических факторов) и создания основы для роста новых тканей [1].

1.2 Поли(ϵ -капролактон) и поли(молочная кислота)

Поли(ϵ -капролактон) является одним из наиболее распространенных биоразлагаемых нетоксичных полимеров [15]. Основным методом его получения является полимеризация ϵ -капролактона с раскрытием цикла, которая может проходить по анионному, катионному, координационному, либо свободнорадикальному механизмам [16]. Катализаторами данных реакций

выступают октоат олова, либо алкоксиды алюминия [17]. Варьирование таких условий полимеризации, как температура и продолжительность, тип и количество катализатора и количество мономера, позволяет получить полимер с различной молекулярной массой, что, в свою очередь, означает широкий диапазон механических свойств и скорости деградации полимера [17].

При комнатной температуре и температуре человеческого тела, поли(ϵ -капролактон) является поликристаллическим полимером, его температура стеклования составляет -60°C , температура плавления – 60°C [18,19].

По сравнению с прочими биоразлагаемыми полимерами (например, полилактидами) поли(ϵ -капролактон) имеет более долгое время деградации (2-3 года), что связано с меньшим количеством сложноэфирных связей в его структуре (Рисунок 1) и высокой гидрофобностью полимера [20,21].

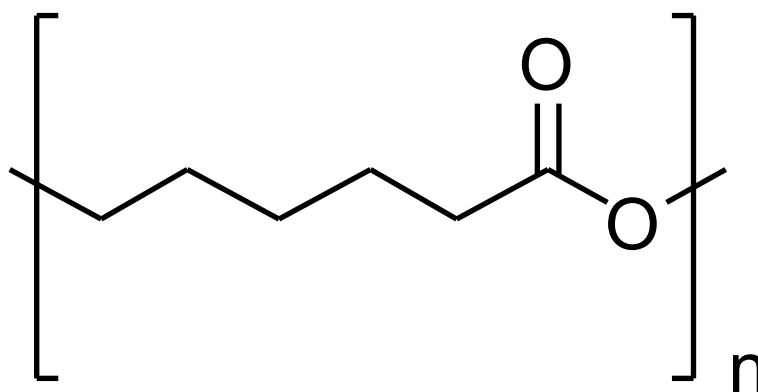


Рисунок 1 – Структурная формула поли(ϵ -капролактона)

Благодаря высокому времени деградации, удовлетворительной биосовместимости, а также отличным механическим характеристикам [22] и отличной совместимости с лекарственными препаратами [23], поли(ϵ -капролактон) стал перспективным материалом для медицинских применений, что подтверждается тем фактом, что ряд изделий на его основе одобрен Управлением по надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) к использованию на людях [24].

Поли(молочная кислота) (Рисунок 2)– это полиэфир, являющийся наиболее широко используемым биоразлагаемым полимером [25].

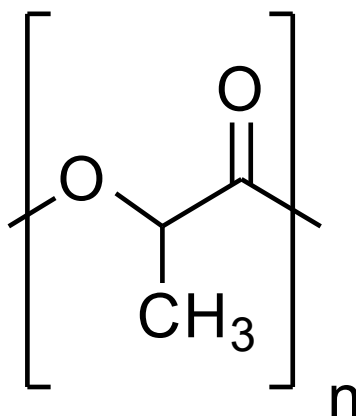


Рисунок 2 – Структурная формула поли(молочной кислоты)

В связи с тем, что молочная кислота является оптически активным соединением, поли(молочная кислота) может существовать в трех формах: поли(L-молочная кислота), поли(D,L-молочная кислота) и поли(D-молочная кислота)[26]. В зависимости от соотношения энантиомеров в макромолекуле, поли(молочная кислота) может кристаллизоваться в виде α , β и γ форм. α структура является наиболее стабильной и имеет температуру плавления в районе 185°C [27]. Также, поли(L-молочная кислота) обладает лучшими механическими свойствами по сравнению с поли(D-молочной кислотой), часто являющейся аморфным полимером [28]. Кроме того, поли(D,L-молочная кислота) обладает более высокой скоростью деградации по сравнению с поли(L-молочной кислотой).

На сегодняшний день, благодаря высокой механической прочности, биосовместимости и широкому диапазону возможностей обработки, поли(молочная кислота) одобрена FDA в качестве материала биомедицинских изделий [29].

Однако применение поли(молочной кислоты) ограничено отсутствием у полимера собственной биологической активности, а в ряде случаев – возможности воспалительной реакции на имплантат [30].

1.3 Методы формирования скаффолдов на основе биоразлагаемых полиэфиров

1.3.1 Электроформование

В процессе электроформования, волокна полимера формируются под действием электрического напряжения, подаваемого между иглой, через которую подают полимерный раствор, и заземленным коллектором [31]. Под действием мощного электрического поля, капля полимерного раствора, формирующаяся на игле, вытягивается и, когда отталкивающие электрические силы преодолевают силу натяжения, из вершины сформировавшегося конуса вытягиваются тонкие струи полимерного раствора. По пути струи к коллектору, растворитель испаряется и формируются тонкие полимерные волокна [32].

Волокнистые материалы, полученные в процессе электроспиннинга, способны симулировать строение внеклеточного матрикса, что обеспечивает адсорбцию и распознавание белковых молекул [33]. Морфологию получаемых материалов возможно контролировать в широком диапазоне посредством изменения таких параметров, как: вязкость прядильного раствора, подаваемое напряжение, расстояние от кончика иглы до коллектора, скорость подачи раствора, температура и влажность внешней среды, подаваемое напряжение [34–36].

1.3.2 Формование под действием центробежной силы

Формование под действием центробежной силы было предложено в качестве альтернативы электроформованию, как метод, менее требовательный к проводимости прядильного раствора [37]. Система для формования волокон под действием центробежной силы представляет собой резервуар с раствором, или расплавом полимера, с отверстиями малого диаметра, подключенный к мотору, развивающему скорость от 3000 до 20000 об./мин, и окруженный коллектором [37,38]. При вращении, когда центробежная сила превышает капиллярные, из отверстий в резервуаре вырывается струя полимерного раствора (или расплава).

При движении струи по спиральной траектории, растворитель испаряется и оставшееся волокно собирается на коллекторе [37,39]. Основным преимуществом данного типа формования является большая скорость [40,41].

1.3.3 Аэродинамическое формование

Ещё одним альтернативным методом является аэродинамическое формование. Данный метод предусматривает формование полимерных волокон из раствора полимера под действием сжатого газа [42]. Система для аэродинамического формования представляет собой два канала: через внутренний подается раствор полимера, через внешний – газ под давлением [43]. По сравнению с методом электроформования, метод аэродинамического формования также обладает большей скоростью и не требует сложного оборудования [43,44]. В то же время, аэродинамическое формование не позволяет получить длинные единичные волокна.

1.3.4 Фазовое разделение

Фазовое разделение основано на переводе раствора полимера в две фазы: фазу, насыщенную полимером, и фазу, содержащую малое количество полимера [42]. Для этого, раствор полимера охлаждают, либо добавляю растворитель, в котором полимер не растворяется [45]. Полученные материалы могут обладать пористостью до 98,5% и диаметром волокон 50-500 нм [46]. Температура процесса и растворитель позволяют в значительной степени варьировать свойства полученного материала [42]. Данный метод позволяет получить трехмерные скаффолды с диаметром волокон, меньшим, чем у скаффолдов, полученных методом электроформования [45].

1.3.5 Прядильная технология с контролируемыми параметрами

Применимость перечисленных технологий ограничена отсутствием

возможности формирования упорядоченных волокон [47]. Поэтому, была предложена альтернативная технология прядения с контролируемыми параметрами (STEP), обеспечивающая формирование скаффолдов с необходимым диаметром волокон, промежутками между волокнами и ориентацией волокон [48,49]. В данной технологии, без применения высоковольтного источника, полимерные волокна формируются из капли раствора полимера. Подложку подводят к капле полимера до контакта, затем перемещают в горизонтальном направлении до контакта со второй каплей. Данный метод позволяет создать скаффолды с заданной геометрией [50].

Сравнение вышеперечисленных технологий получения скаффолдов представлено в таблице 1.

Таблица 1 – Сравнение существующих технологий получения скаффолдов

Технология	Преимущества	Недостатки
Электро-формование	- контролируемая пористость материалов - большая длина волокон - волокна малого диаметра (от 2 нм до нескольких микрометров)	- малая производительность - чувствительность к проводимости раствора
Формование под действием центробежной силы	- более высокая производительность - меньшие энергозатраты - возможность работы с широким рядом растворителей и расплавами полимеров	- менее равномерное распределение диаметра волокон
Аэродинамическое формование	- более прост в использовании по сравнению с электроформованием - возможность нанесения покрытий на изделия плоской и сложной формы приблизительно в 10 раз быстрее, чем при электроформовании - простота используемого оборудования	- формирование узлов в структуре скаффолда

Продолжение таблицы 1

Фазовое разделение	- получение трехмерных скаффолдов необходимой формы - высокая пористость скаффолдов - не требует использования специального оборудования	- сложность контроля диаметра волокон - ограниченный выбор полимеров
Прядильная технология с контроли- ру-емыми параметра- ми	- контролируемый диаметр волокон - контролируемая пористость - длинные одиночные волокна	- сложность получения волокон диаметром более 100 нм

1.3.6 Методы модифицирования скаффолдов на основе биоразлагаемых полиэфиров

Для придания скаффолдам на основе биоразлагаемых полиэфиров необходимых механических, физико-химических и биологических свойств, предложено множество методов модифицирования [51]. Условно, существующие методы можно разделить на методы поверхностного и объемного модифицирования.

1.3.7 Методы поверхностного модифицирования

1.3.7.1 Плазменная обработка

Плазменная обработка является одним из наиболее распространенных методов поверхностного модифицирования полимерных скаффолдов [52]. Использование различных рабочих газов и плазмы различной энергии, позволяет изменить поверхностные свойства материалов в широком диапазоне за счет

формирования различных функциональных групп и барьерных слоев на их поверхности. В то же время, существенным недостатком плазменных методов является неравномерность модифицирования вследствие ограниченного проникновения плазмы в объем скаффолда [53].

Основным эффектом, наблюдаемым при плазменной обработке, является рост гидрофильности материала. Так, группой Dolci показано падение краевого угла смачивания водой скаффолдов из поли(молочной кислоты) со 120° до 20° при обработке низкотемпературной атмосферной плазмой в течение 60 секунд [54]. В то же время, плазменная обработка часто связана с потерей материалом прочностных характеристик и образованием дефектов волокон.

Формирование новых функциональных групп в процессе плазменной обработки приводит к улучшению жизнеспособности клеток на поверхности скаффолдов [55,56]. Так, при сравнении скаффолдов на основе поли(ε-капролатона), обработанных плазмой кислорода, с композитными скаффолдами на основе поли(ε-капролактона) и коллагена, на скаффолдах из поли(ε-капролактона) наблюдалась лучшая адгезия клеток Шванна [57]. Кроме того, плазменная обработка дает возможность иммобилизации полимеров природного происхождения. В работе [58] обработка атмосферной плазмой была использована для нанесения гиалуроновой кислоты на поверхность скаффолдов из поли(молочной кислоты). Нанесение гиалуроновой кислоты позволило улучшить гидрофильность и биосовместимость полученных материалов.

1.3.7.2 Модифицирование поли(допамином)

Молекула допамина содержит в своем составе алкиламинные и катехиновые группы, благодаря чему он способен полимеризоваться при слабощелочном pH [59]. В процессе полимеризации, катехиновые группы окисляются до бензохинонов. Последующая циклизация первичного амина в 5,6-дигидроксииндол ведет к окислению и последующей самоконденсации в димеры и тримеры, которые конденсируются в тетрамеры и олигомеры. Полимеризация

катехинов на поверхности подложки ведет к их закреплению и функционализации поверхности [60]. В свою очередь, полученные покрытия могут реагировать с тиольными и аминными функциональными группами.

Модифицирование поли(допамином) успешно применено к скаффолдам из поли(молочной кислоты) и поли(ϵ -капролактона). Так, удалось снизить краевой угол смачивания водой скаффолдов из поли(ϵ -капролактона) с 92° до 0° . При этом, при сокультивировании модифицированных материалов с эндотелиальными клетками пупочной вены человека, они показали лучшую жизнеспособность и пролиферацию [61]. Также, модифицирование поли(допамином) использовано для последующей иммобилизации пептидов костного морфогенетического белка-7 на поверхности скаффолдов из поли(ϵ -капролактона), что улучшило пролиферацию мультипотентных мезенхимальных клеток [62].

1.7.3.3 Послойное модифицирование

Послойное модифицирование подразумевает поочередное нанесение полимеров, обладающих разноименными зарядами. Данный подход позволяет получить многослойные покрытия с регулируемой толщиной, пористостью, химической активностью и другими параметрами. Обычно, послойное модифицирование осуществляют за счет электростатических сил [63], однако также могут быть задействованы и водородные связи, ковалентное присоединение и гидрофобные взаимодействия [64].

Послойное модифицирование было использовано для нанесения ламинина и хитозана на скаффолды из поли(молочной кислоты) [65]. Волокна из поли(молочной кислоты) обрабатывали поли(этиленимином) для создания постоянного положительного заряда на их поверхности. Затем, на волокна поочередно наносили отрицательно заряженный ламинин и положительно заряженный хитозан. Осуществленное модифицирование улучшило рост невритов на поверхности скаффолдов.

1.3.8 Методы модифицирования в объеме

Однокомпонентные скаффолды часто не способны в полной мере заменить многокомпонентный внеклеточный матрикс, либо не обладают достаточным набором свойств для конкретного применения (например, слабой способностью к инфильтрации клеток, либо неудовлетворительными механическими характеристиками) [66]. На сегодняшний день, получен целый ряд скаффолдов, модифицированных в объеме, и обладающих необходимым набором физико-химических и биологических свойств. Таким образом, объемное модифицирование скаффолдов, полученных методом электроформования, стало важнейшим направлением в данной области [67].

Основным направлением объемного модифицирования биоразлагаемых полиэфиров является улучшение их гидрофильности, обеспечивающее лучшую адгезию клеток, повышение биосовместимости, и придание необходимых механических характеристик [67]. Скаффолды на основе поли(ϵ -капролактона) с добавлением поли(гликолевой кислоты) были получены из общего прядильного раствора в 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропаноле [68]. С ростом концентрации поли(гликолевой кислоты), наблюдался эффект упрочнения материалов и улучшения смачивания их поверхности водой. Скаффолды с различным содержанием поли(молочной кислоты) и поли(γ -бензил-L-глутамата) были получены из раствора в хлороформе. Добавление поли(γ -бензил-L-глутамата) в прядильный раствор привело к увеличению гидрофильности поверхности полученных материалов и улучшению их биосовместимости.

Также, возможно объемное модифицирование скаффолдов веществами естественного происхождения. Так, коллаген является часто используемым биологически активным агентом, увеличивающим биосовместимость конечного материала. Группой Fariba проведено сравнение скаффолдов из поли(ϵ -капролактона), скаффолдов из поли(ϵ -капролактона), покрытых коллагеном, и скаффолдов на основе поли(ϵ -капролактона) и коллагена. Скаффолды,

модифицированные коллагеном в объеме, демонстрировали наилучшее взаимодействие с клетками и механические характеристики.

ГЛАВА 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и реактивы

В исследовании использовались следующие полимеры: поли(ϵ -капролактон) (PCL, Mn 80000, Sigma), полимолочная кислота (PL 18, PL 38, PL 65, Corbion), желатин (Type B, Sigma), поливинилпирролидон (K-12, Sigma); растворители: дихлорметан (химически чистый, Реахим), трихлорметан (химически чистый, Реахим), этанол (химически чистый, Реахим), толуол (химически чистый, Реахим), 1,1,1,3,3,3-гексафторпропан-2-ол (химически чистый, P&M Invest). Также, при получении композиционных материалов использованы: иод кристаллический (чистый для анализа, Химреактивснаб), L-аргинин (98%, Sigma).

Получение пленок из поли(молочной кислоты)

Пленки были получены из поли(молочной кислоты) PL 65 ($M_w=1646000$ г/моль, Corbion, Нидерланды). Навеску поли(молочной кислоты) растворяли в смеси дихлорметана и трихлорметана (Реахим, Россия) в объемном соотношении 40:60 для получения раствора концентрацией 1,7 % масс.. Раствор выдерживали в течение 12 часов до полного растворения полимера. Полимерные пленки получали посредством выливания 18 ± 1 г полученного раствора в чашку Петри и сушки в парах растворителя в течение 72 часов.

Модифицирование пленок из поли(молочной кислоты) в парах иода

Пленку из поли(молочной кислоты) размером 20×10 мм помещали в 10 мл смеси толуола и этанола (3/7, об.) (Реахим, Россия), или хлороформа и этилацетата (1/9, об.) (Реахим, Россия) на 10 минут. После этого, обработанный образец переносили в насыщенные пары иода на 30, 60, 180, 300, 420, 600, 1200 и

1800 секунд. Иод, не закрепленный на поверхности пленки, удаляли посредством промывания образца в этиловом спирте. Остаточные растворители удаляли при выдерживании образца в эксикаторе под вакуумом в течение 12 часов.

Модифицирование пленок из поли(молочной кислоты) в растворах иода

Пленку из поли(молочной кислоты) размером 20×10 мм помещали в 10 мл смеси толуола и этанола (3/7, об.) (Реахим, Россия), или хлороформа и этилацетата (1/9, об.) (Реахим, Россия) на 10 минут. После этого, обработанный образец переносили в насыщенный водно-спиртовой раствор иода ($C_{I_2}=6,5$ мг/мл) на 1, 6, 12 и 24 часа. Иод, незакрепленный на поверхности пленки, удаляли посредством промывания образца в этиловом спирте. Остаточные растворители удаляли при выдерживании образца в эксикаторе под вакуумом в течение 12 часов.

Приготовление прядильных растворов

Прядильные растворы для изготовления скаффолдов готовили во флаконах из темного стекла с пробкой и закручивающейся крышкой, объемом 100 мл. Для этого, на весах Radwag 310/C/2 (Radwag, Польша) взвешивали необходимое количество растворителя и других компонентов прядильного раствора и оставляли в темном месте на сутки до полного растворения.

Установка электроформования

Формование волокнистых скаффолдов проводили на установке NANON-01 (Месс, Япония). Основными параметрами электроформования, влияющими на свойства конечного материала являются: подаваемое напряжение, скорость подачи раствора, расстояние между коллектором и кончиком иглы, через который подается раствор полимера, скорость вращения коллектора, тип коллектора. В

таблице 2 приведены параметры формования материалов, полученных в рамках настоящего исследования.

Таблица 2 – Параметры формования скаффолдов

Материал	Концентрация раствора полимера, % масс.	Подаваемое напряжение, кВ	Скорость подачи раствора полимера, мл/ч	Тип и скорость вращения коллектора	Расстояние от коллектора до кончика иглы, через которую подается раствор, мм
Скаффолд из поли(молочной кислоты) PL18 (для поверхностного модифицирования)	7	23	6	Цилиндрический D=100 мм, 50 об./мин	110
Скаффолд из поли(молочной кислоты) PL38 (для поверхностного модифицирования)	3	27	6	Цилиндрический D=100 мм, 50 об./мин	150
Скаффолд из поли(ε-капролактона) (для поверхностного модифицирования)	9	20	6	Цилиндрический D=100 мм, 50 об./мин	190

Продолжение таблицы 2

Скаффолды из поли(ϵ -капролактона) с добавлением L-аргинина	7	20	2	Цилин-дрический, D=5 мм, 50 об./мин	150
Скаффолды из поли(ϵ -капролактона) с добавлением поливинилпирролидона	7	25	3	Цилин-дрический, D=10 мм, 50 об./мин	110

Методы исследования модифицированных пленок

Количество иода, нанесенного на поверхность пленок, определяли методом УФ-спектрофотометрии (Specord 250 Plus, Analytik Jena AG, Германия). Метод рентгенофлуоресцентного анализа (Quan`X EDXRF, Thermo Scientific, Германия) использовали для качественной оценки десорбции иода с поверхности образцов. Метод световой микроскопии (DM-111, Motic, Германия) использовали для изучения поверхности полученных пленок. Механические характеристики полученных материалов исследовали на установке Zwick Roell z2.5 (Zwick GmbH & Co. KG, Германия).

Исследование антибактериальной активности пленок из поли(молочной кислоты), модифицированных иодом

Антибактериальную активность пленок из поли(молочной кислоты) исследовали в соответствии с ISO 22196:2011 «Измерение антибактериальной активности на поверхности пластмасс и других непористых материалов».

Все среды и растворы были приготовлены по стандарту ISO 22196:2011. Для исследования использовали культуры *Escherichia Coli* концентрацией 6×10^5 КОЕ/мл.

Исследуемые образцы пленок нарезали на квадраты размером 50×50 мм, помещали на дно чашек Петри, помещали на образец 0,4 мл бактериальной суспензии и накрывали покровными пленками из полиэтилена размером 40×40 мм. Исследуемые образцы инкубировали при 37°C и постоянной влажности 90% в течение 24 часов. Результаты эксперимента оценивали сразу после нанесения бактериальной суспензии (0 часов) и спустя 24 часа.

Смыв с исследуемых образцов проводили 10 мл питательного бульона, после чего проводили 10-кратные разведения физиологическим раствором. Затем, 1 мл каждого разведения помещали в чашку Петри и заливали 15 мл питательного агара. Чашки Петри с агаром переворачивали и инкубировали при 37°C . Спустя 48 часов, подсчитывали количество выросших колоний.

Для каждого образца определяли количество жизнеспособных бактерий, по формуле (3):

$$N = (100 \times C \times D \times V) / A \quad (3)$$

где N – число жизнеспособных бактерий, извлеченных на 1 см^2 с испытуемого образца;

C – среднее количество колоний для 2 повторностей;

D – коэффициент разбавления;

V – объем, мл, питательного бульона, добавляемого к образцу;

A – площадь поверхности под покровной пленкой, мм.

Для каждого образца, определяли антимикробную активность пленок в соответствии с уравнением (4):

$$R = (U_t - U_0) - (A_t - U_0) = U_t - A_t \quad (4)$$

где R – антибактериальная активность;

U_t – среднее значение логарифма числа жизнеспособных бактерий, извлеченных из необработанных образцов после 24 ч инокуляции;

U_0 – среднее значение логарифма числа жизнеспособных бактерий, извлеченных из необработанных образцов сразу после инокуляции;

A_t – среднее значение логарифма числа жизнеспособных бактерий, извлеченных из обработанных образцов после 24 ч инокуляции.

Сканирующая электронная микроскопия

Морфологию полученных волокнистых скаффолдов изучали методом сканирующей электронной микроскопии (JCM-6000Plus, Jeol, Япония). Предварительно, образцы покрывали тонким слоем золота на распылительной системе SmartCoater (Jeol, Япония). Средний диаметр волокон считали по не менее, чем 100 измерениям с использованием программного обеспечения ImageJ (National Institutes of Health, США)

Рентгенофазовый анализ

Кристаллическую структуру полученных материалов изучали методом рентгенофазового анализа на дифрактометре ДРОН-3Н (НПП Буревестник, Россия) с источником CuK излучения с длиной волны 1,54056 Å. Параметры съемки: ускоряющее напряжение 35 кВ, ток пучка 25 мА, Скорость сканирования 4°/мин. В случае скаффолдов на основе поли(молочной кислоты) диапазон сканирования составил с 12° до 22°, поли(ε-капролактона) – 21-26°. Средний размер кристаллитов рассчитывали по формуле Дебая-Шеррера:

$$l_c = \frac{\kappa \lambda}{\cos \theta \sqrt{\beta^2 - \beta_r^2}} \quad (5)$$

где κ – коэффициент формы частиц (для сферических частиц 0,9);

λ – длина волны излучения;

β – ширина рефлекса на полувывсоте;

β_r – инструментальное уширение;

θ – угол дифракции.

Инфракрасная спектроскопия

ИК-спектры образцов полученных материалов были получены на спектрометре Cary 630 (Agilent, США).

Дифференциальная сканирующая калориметрия

Дифференциальную сканирующую калориметрию полученных материалов проводили с целью оценки их степени кристалличности на оборудовании DSC 204F1 Phoenix (NETZSCH, Germany). Степень кристалличности определяли по формуле 2:

$$X_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0} \quad (6)$$

где X_c – степень кристалличности;

ΔH_m^0 – энтальпия плавления 100% кристалличного полимера;

ΔH_m – энтальпия плавления образца.

Исследование краевого угла смачивания

Гидрофильность полученных материалов была определена на установке EasyDrop (Kruss, Германия). Краевой угол контакта с водой был определен спустя одну минуту после помещения капли дистиллированной воды на поверхность образца. Для каждого образца было проведено 3 измерения.

Исследование механических характеристик скаффолдов

Механические характеристики полученных материалов исследовали на

установке Instron 3369 с датчиком нагрузки 50N (модель 2519-102, Instron, USA). Для исследования, готовили образцы с рабочей площадью 20×10 мм. Для каждого материала проводили три измерения.

Спектрофотометрия в ультрафиолетовом и видимом диапазоне

Содержание иода в модифицированных скаффолдах и динамику выхода иода из скаффолдов, модифицированных иодом, и поливинилпирролидона из скаффолдов на основе поли(ϵ -капролактона) и поливинилпирролидона, изучали методом УФ-спектрофотометрии (Specord 250 plus, Analytik Jena AG, Германия).

Для определения концентрации иода в полученных материалах, были построены калибровочные графики растворов иода в дихлорметане концентрацией 0,001, 0,002, 0,003, 0,004, 0,005, 0,006 и 0,007 % масс.. Концентрацию иода в полученных материалах определяли по поглощению их раствора в дихлорметане на длинах волн 360 и 500 нм. С целью определения динамики выхода иода из полученных материалов, образцы материалов размером 10×10 мм помещали в 1 мл физиологического раствора при температуре 37°C . Остаточную концентрацию иода определяли по калибровочным графикам.

Для исследования выхода поливинилпирролидона из материалов на основе поли(ϵ -капролактона) и поливинилпирролидона, образцы полученных материалов массой 0,005 г помещали в 3 мл фосфатного буфера. Концентрацию поливинилпирролидона в растворах определяли при помощи УФ-спектрофотометра Specord 250 Plus (Analytik Jena, Германия) по калибровочному графику на длине волны 210 нм.

Исследование антибактериальных свойств материалов

С целью изучения антибактериальных свойств скаффолдов, модифицированных иодом, использовали суспензию бактерий *Escherichia Coli* штамма B-6954. Образцы материалов размером 10×10 мм помещали в 1 мл суспензии бактерий концентрацией 1×10^5 клеток/мл в физиологическом растворе.

После 24 часов сокультивирования при температуре 37°C, полученную суспензию разбавляли физиологическим раствором в 10, 100, 1000, 10000 и 100000 раз. 100 мкл каждого разбавления переносили в чашку Петри на мясо-пептонный агар и инкубировали 24 часа при температуре 37°C.

Исследования биосовместимости *in vitro*

Жизнеспособность мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток изучали по следующему протоколу. Образцы материалов помещали в лунки 24-луночного планшета и сокультивировали с 40000 клеток в течение 72 часов. С целью определения количества адгезированных клеток, после сокультивирования образцы промывали фосфатным буфером, адгезированные клетки фиксировали на поверхности образцов 4% параформом и ядра клеток окрашивали красителем DAPI. Окрашенные клетки визуализировали на микроскопе Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). С целью определения жизнеспособности, клетки удаляли с поверхности образцов трипсином, окрашивали Annexin V FITC и иодидом пропидия. Жизнеспособность клеток определяли методом проточной цитометрии на цитометре GuavaEasyCyte6 (Merck Milipore, Darmstadt, Germany).

Адгезию клеток HeLa на скаффолдах из поли(ε-капролактона) с добавлением поливинилпирролидона изучали по следующему протоколу. Образцы материалов размером 10×10 мм помещали в лунки 24-луночного планшета, лунки заполняли средой. В каждую лунку добавляли 80000 клеток.

Полученные материалы сокультивировали с клетками в течение 24 часов. После этого, образцы переносили в новый планшет, промывали фосфатным буфером, клетки фиксировали 4% параформальдегидом. После этого, образцы инкубировали с BSA (Sigma, США) в течение 15 минут. После этого, образцы промывали фосфатным буфером и инкубировали с первичными антителами CK7 (Abcam, USA) в разведении 1:500 с 1% BSA. Через 30 минут, образцы промывали и добавляли вторичные антитела Alexa488 (Abcam, USA). Образцы выдерживали в течение 30 минут. После этого, каплю готового раствора DAPI помещали на

образец, добавляли флуоресцентный фиксатор и накрывали покровным стеклом. Клетки визуализировали на микроскопе LSM 780 (Carl Zeiss, Германия).

ГЛАВА 3. ПОВЕРХНОСТНОЕ МОДИФИЦИРОВАНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОБРАБОТКИ СМЕСЬЮ ХОРОШЕГО И ПЛОХОГО РАСТВОРИТЕЛЕЙ

3.1 Поверхностное модифицирование пленок из поли(молочной кислоты)

Для поверхностного модифицирования пленок из поли(молочной кислоты) и в дальнейшем — скаффолдов из поли(молочной кислоты) и поли(ϵ -капролактона) использован метод «хороший/плохой растворитель». Предложенный метод можно разделить на несколько стадий. Первая стадия заключается в обработке поверхности полимерного изделия смесью органических растворителей. Данный этап приводит к формированию на поверхности изделия набухшего, частично растворенного слоя полимера, способного захватывать биологически активные соединения из внешней среды. Второй этап модифицирования процесса предусматривает помещение обработанного изделия в среду, содержащую модифицирующий агент. При удалении растворителей из поверхностных слоев полимерного изделия, модифицирующий агент остается в них закреплен (Рисунок 3).

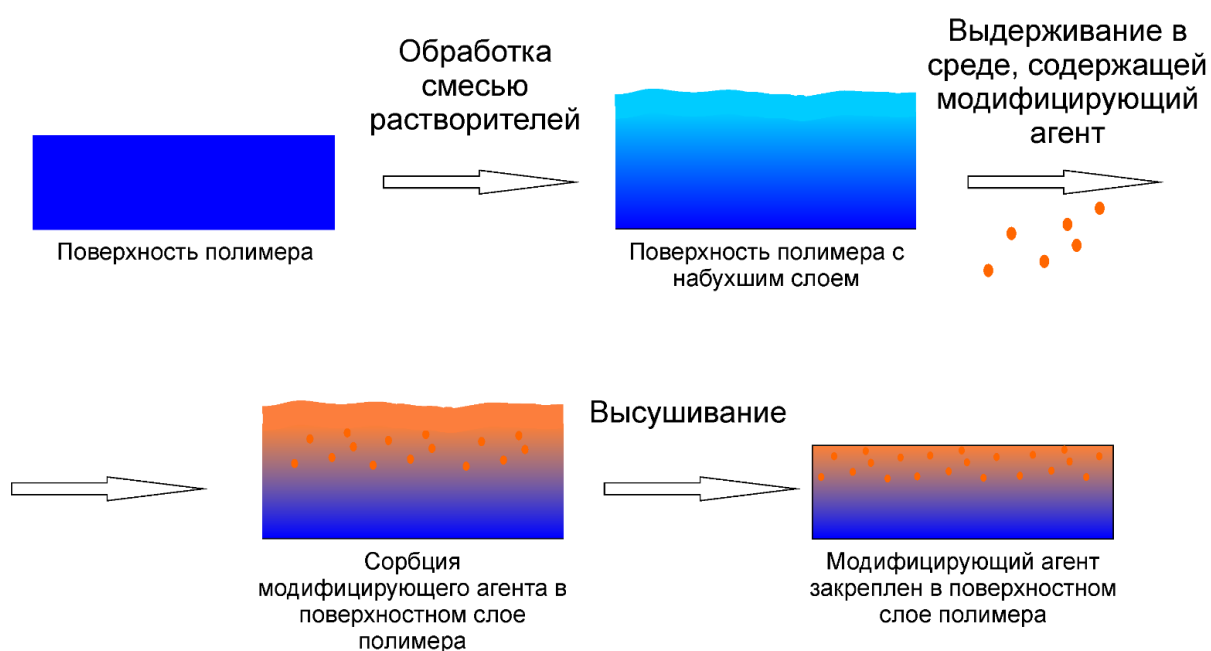


Рисунок 3 – Принцип метода «хороший/плохой растворитель»

3.1.1 Выбор системы «хороший/плохой растворитель»

Для поверхностного модифицирования пленок из поли(молочной кислоты) были использовали две системы «хороший/плохой растворитель»: толуол/этанол (3/7 по объему), предложенная ранее [19], и трихлорметан/этилацетат (1/9 по объему). Данные системы соответствуют следующим условиям:

- растворитель является неполярным и обладает низкой температурой кипения;
- плохой растворитель является полярным;
- хороший и плохой растворители хорошо смешиваются.

3.1.2 Подбор условий проведения модифицирования

Показана возможность нанесения иода на поверхность пленок из поли(молочной кислоты) из паров и растворов иода с использованием двух предложенных систем «хороший/плохой растворитель». Условия модифицирования пленок из поли(молочной кислоты) подбирали на основе интенсивности характеристических максимумов поглощения (290 и 470 нм). Образцы пленок из поли(молочной кислоты) размером 10×20 мм помещали в смесь «хороший/плохой растворитель» на 10 минут. Затем, обработанные образцы обрабатывали в насыщенных парах, или насыщенном спиртовом растворе иода. Полученные образцы промывали этиловым спиртом для удаления незакрепленного иода.

УФ-спектры модифицированных и немодифицированных пленок представлены на рисунках 4 и 5, где черный спектр соответствует исходной пленке из поли(молочной кислоты), зеленый спектр – пленке из поли(молочной кислоты) с иодом, нанесенным из спиртового раствора, красный спектр - пленке из поли(молочной кислоты) с иодом, нанесенным из паров.

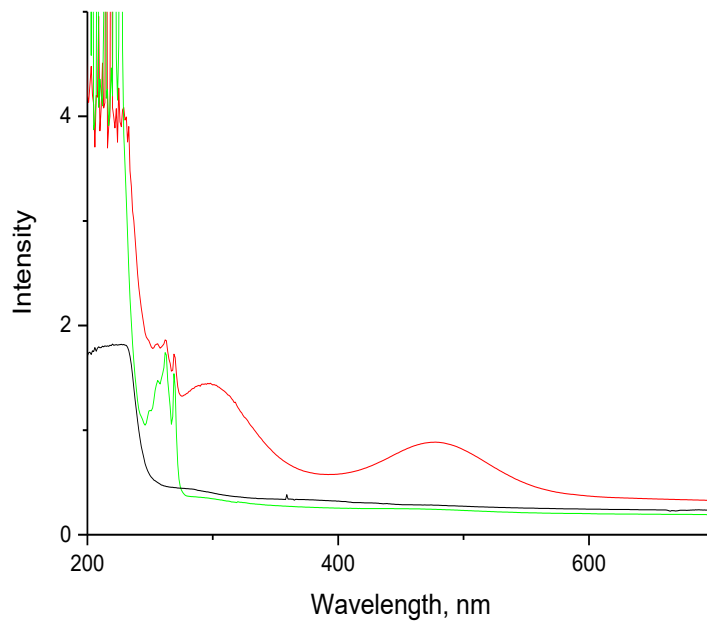


Рисунок 4 – УФ-спектры образцов, полученных с использованием смеси толуол/этанол (3/7 по объему)

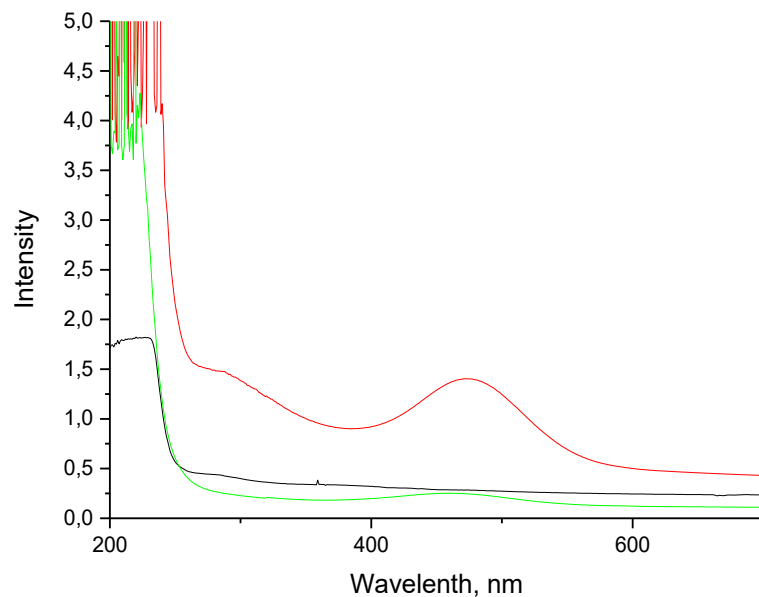


Рисунок 5 – УФ-спектры образцов, полученных с использованием смеси трихлорметан/этилацетат (3/7 по объему)

Таким образом, обработка парами иода позволяет закрепить на поверхности пленок из поли(молочной кислоты) с применением предложенного метода больше

иода за меньший промежуток времени, чем при выдерживании в спиртовом растворе.

Однако было обнаружено, что количество иода, нанесенного из раствора, можно увеличить за счет разбавления спиртового раствора иода дистиллированной водой. Пленки из поли(молочной кислоты) размером 10×20 мм были обработаны смесью толуол/этанол (3/7 по объему), а затем погружены в насыщенные растворы иода в 96% спирте и в водно-спиртовых смесях (соотношение спирта и воды 3/7 и 7/3) на 24 часа. УФ-спектры полученных образцов представлены на рисунке 6. Черный спектр – иод нанесен из спиртового раствора, зеленый и красный спектры – иод нанесен из водно-спиртовых растворов (соотношение спирта и воды 7/3 и 3/7 соответственно).

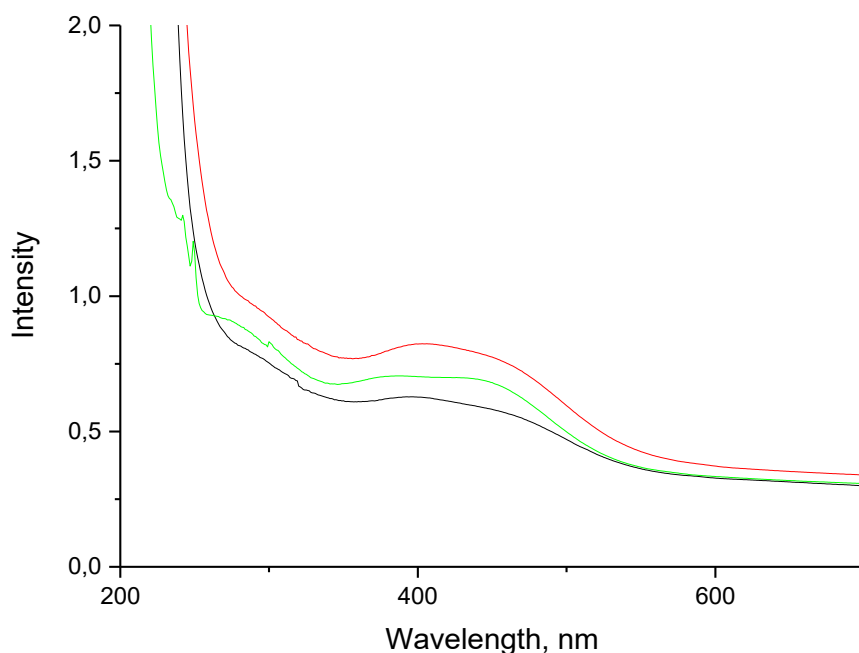


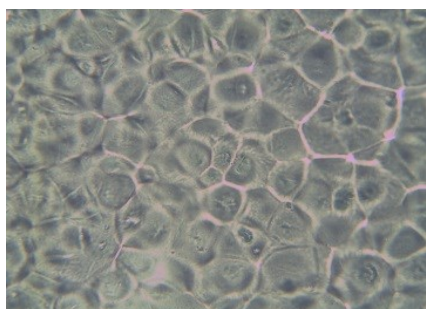
Рисунок 6 – УФ-спектры пленок из поли(молочной кислоты) с иодом, нанесенным из спиртового и водно-спиртовых растворов

Таким образом, разбавление спиртовых растворов иода водой позволяет обеспечивает нанесение большего количества иода на поверхность пленок из поли(молочной кислоты). Данные наблюдения можно объяснить частичным вымыванием нанесенного иода в спиртовых растворах.

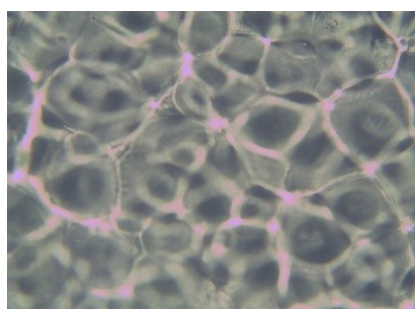
3.1.3 Качественная и количественная оценка результатов модифицирования пленок из поли(молочной кислоты)

3.1.3.1 Оптическая микроскопия полученных образцов

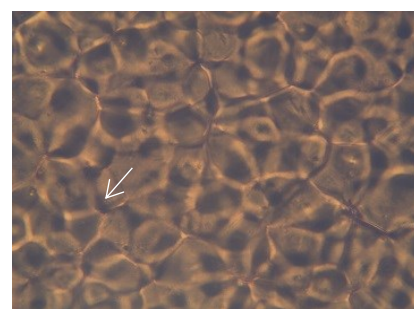
На рисунке 7 показаны результаты оптической микроскопии поверхности пленок из поли(молочной кислоты), модифицированных и немодифицированных иодом.



Исходная пленка,
увеличение x40



Пленка, обработанная
смесью хорошего и
плохого растворителей,
увеличение x40



Пленка с иодом,
нанесенным из паров,
увеличение x40

Рисунок 7 – Изображение поверхностей исходной и модифицированной пленок

При обработке смесью «хороший/плохой растворитель» наблюдается набухание полимера. После выдерживания обработанной пленки в парах иода, образец приобретает бурый цвет. На поверхности модифицированной пленки наблюдаются кристаллы иода.

3.1.3.2 Исследование стабильности полученного слоя, содержащего иод, в различных средах

Стабильность слоя, содержащего иод, на поверхности пленок из поли(молочной кислоты), была исследована в пяти средах: на воздухе, в вакууме, в дистиллированной воде, физрастворе и фосфатном буфере. Стабильность

сформированного слоя оценивали по снижению интенсивности максимумов поглощения иода на УФ-спектрах образцов. Спектры образцов снимали через 1, 2, 3, 5 и 7 дней после начала эксперимента. Результаты представлены на рисунках 8 и 9.

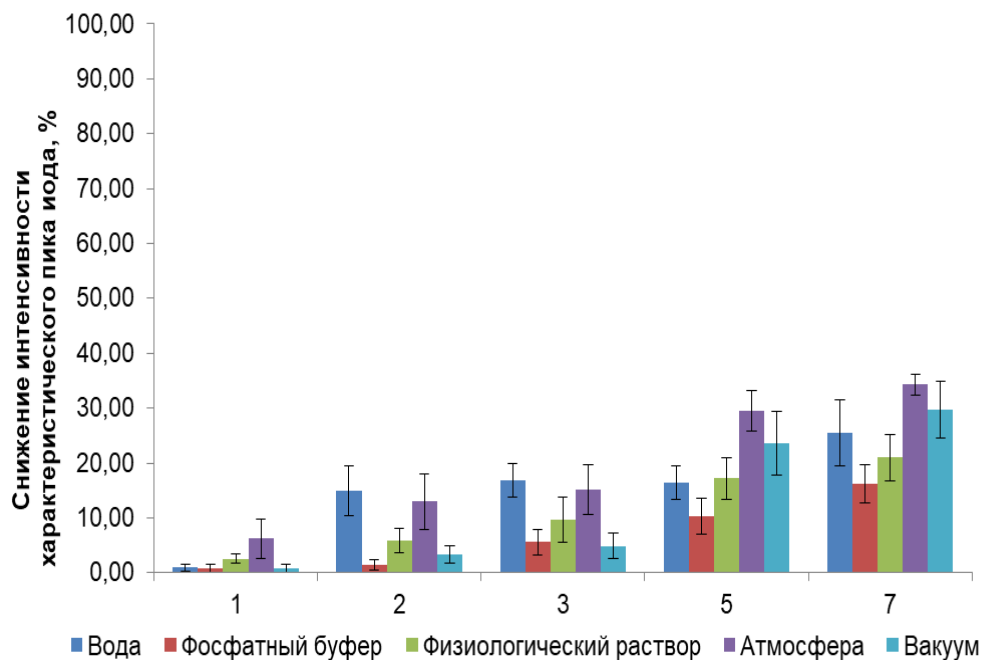


Рисунок 8 – Исследование стабильности слоя иода, нанесенного из раствора

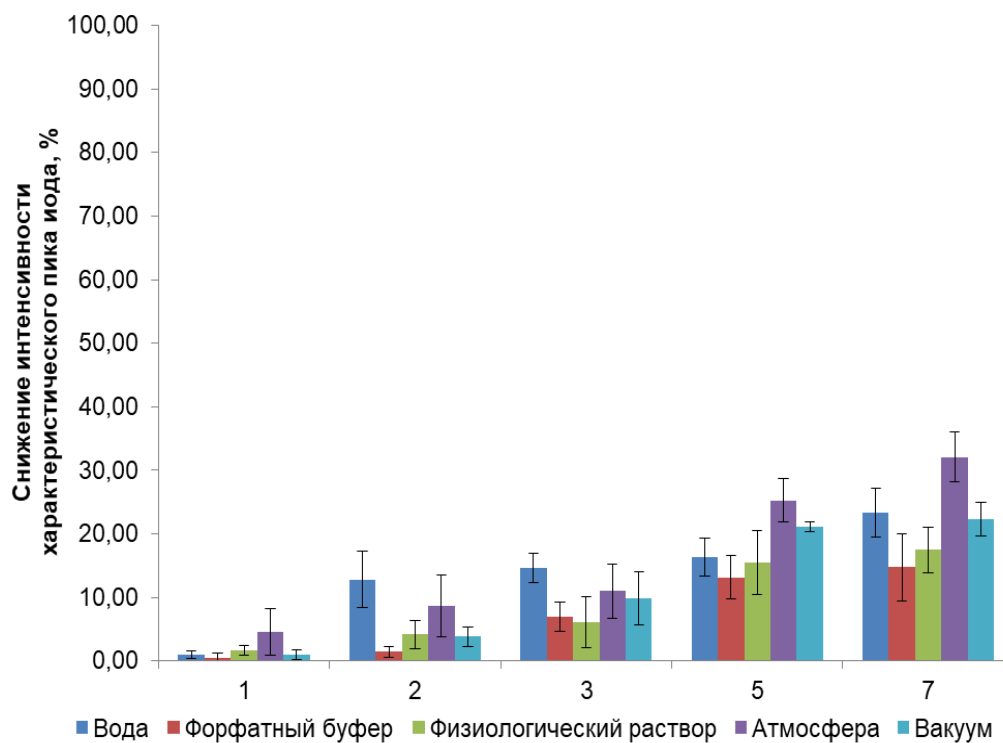


Рисунок 9 – Исследование стабильности слоя иода, нанесенного из паров

Согласно полученным данным, полученные материалы наиболее стабильны в физиологическом растворе и фосфатном буфере, что позволяет сделать предположение о возможности их хранения в данных средах.

3.1.3.3 Механические свойства полученных материалов

Результаты исследования влияния обработки смесью «хороший/плохой растворитель» и нанесения иода предложенным методом на механические характеристики пленок из поли(молочной кислоты) представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Механические свойства полученных образцов

Образец	Модуль эластично- сти, МПа	Прочность на разрыв, МПа	Относи- тельное удлинение, %
Пленка из ПМК	2382,5±30,8	63,11±5,8	146,5±7,4
Пленка из ПМК, обработанная смесью «хороший/плохой растворитель» составом толуол/этанол (3/7 по объему) в течение 10 минут	1281,8±24,5	53,25±4,6	164,3±6,8
Пленка из ПМК, обработанная смесью «хороший/плохой растворитель» составом толуол/этанол (3/7 по объему) в течение 10 минут с иодом, нанесенным из насыщенного водно-спиртового раствора ($C_{I_2} = 6,5$ мг/мл) в течение 48 ч (концентрация иода на поверхности 0.030 ± 0.008 г/см ²)	1554,0±27,3	47,81±3,9	136,3±5,8

Продолжение таблицы 3

Пленка из ПМК, обработанная смесью «хороший/плохой растворитель» составом толуол/этанол (3/7 по объему) в течение 10 минут с иодом, нанесенным из паров иода в течение 7 минут (концентрация иода на поверхности 0.0400 ± 0.0083 г/см ²)	$2426,0 \pm 31,6$	$40,84 \pm 3,5$	$114,3 \pm 4,3$
--	-------------------	-----------------	-----------------

Частичное растворение полимера при обработке смесью «хороший/плохой растворитель» ожидаемо привело к увеличению относительного удлинения образцов. В свою очередь, нанесение иода из водно-спиртового раствора приводило ко снижению модуля эластичности, что можно связать с остаточным растворителем в поверхностных слоях полимера, так как при нанесении из паров подобных изменений не наблюдалось.

3.1.3.4 Исследование динамики нанесения иода на поверхность пленок из поли(молочной кислоты) из паров и растворов

С целью изучения количества иода, наносимого на поверхность пленок из поли(молочной кислоты) с использованием предложенного метода, пленки из поли(молочной кислоты) были обработаны смесью толуол/этанол (3/7 по объему), или трихлорметан/этилацетат (1/9 по объему) в течение 10 минут, и помещены в насыщенный водно-спиртовой раствор иода ($C_{I_2} = 6,5$ мг/мл) на 6, 12, 24 и 48 часов, или в пары иода на 30, 60, 180, 300, 420, 600, 1200 и 1800 секунд.

Концентрацию иода в полученных образцах изучали посредством десорбции нанесенного иода в 2 мл этанола в течение суток по УФ-спектрам полученных растворов.

Калибровочные графики были построены для спиртовых растворов иода концентрацией 0,00003 г/мл, 0,00005 г/мл, 0,00006 г/мл и 0,00008 г/мл.

Полученные калибровочные прямые приведены на рисунке 10.

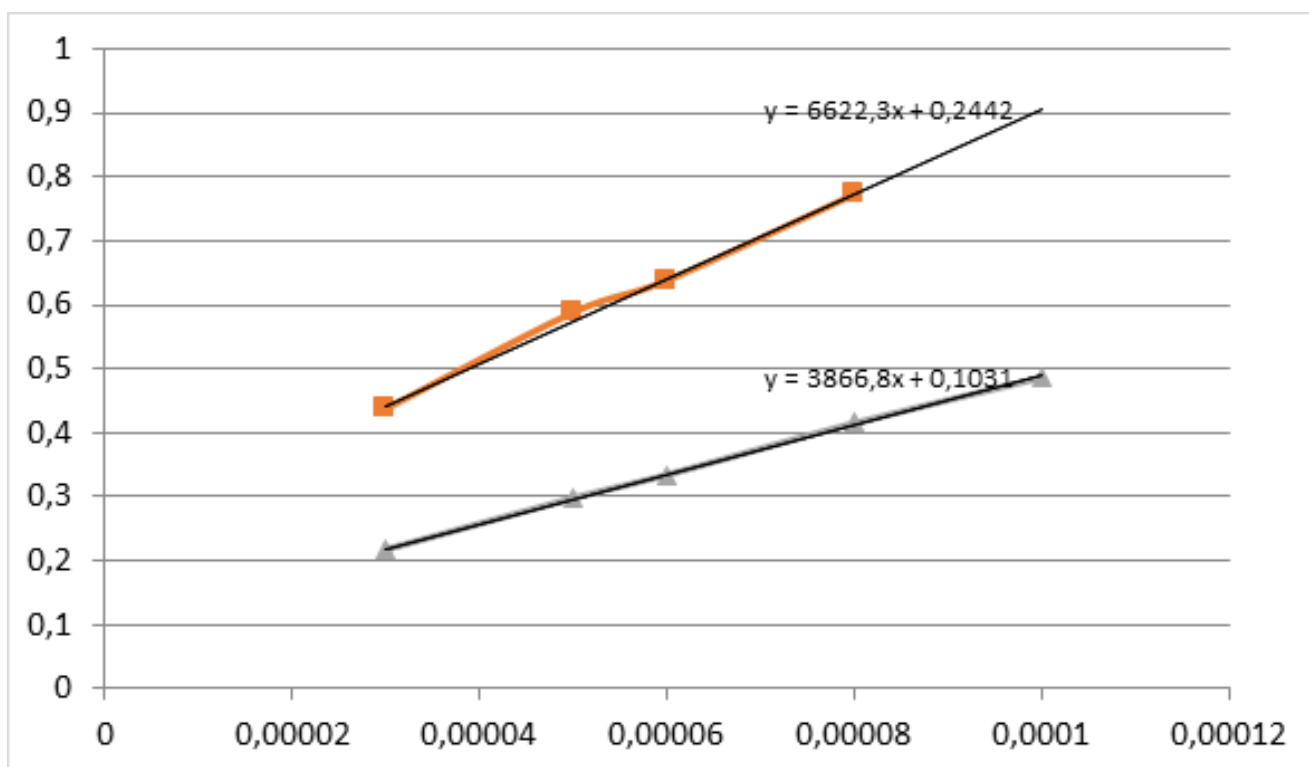


Рисунок 10 – Интенсивность поглощения растворов иода и ее зависимость от концентрации

Полноту десорбции иода с поверхности образцов в течение 24 часов выдерживания в этаноле подтверждали методом рентгенофлуоресцентного анализа. Спектры исследованных образцов представлены на рисунке 11. Красный спектр – исходная пленка из поли(молочной кислоты), черный спектр – пленка из поли(молочной кислоты) с иодом, нанесенным из паров, зеленый спектр – спектр пленки, обработанной в парах иода после выдерживания в этаноле в течение суток.

На полученных спектрах наблюдаются три пика, соответствующие атомам иода: 3, 27,1 и 32 кэВ. После выдерживания образца в этиловом спирте в течение 24 часов окраска пленок, свидетельствующая о наличии иода в поверхностном слое, пропадает, а на спектрах РФЛА пиков иода не наблюдается, что свидетельствует о полной десорбции иода из поверхностного слоя пленок.

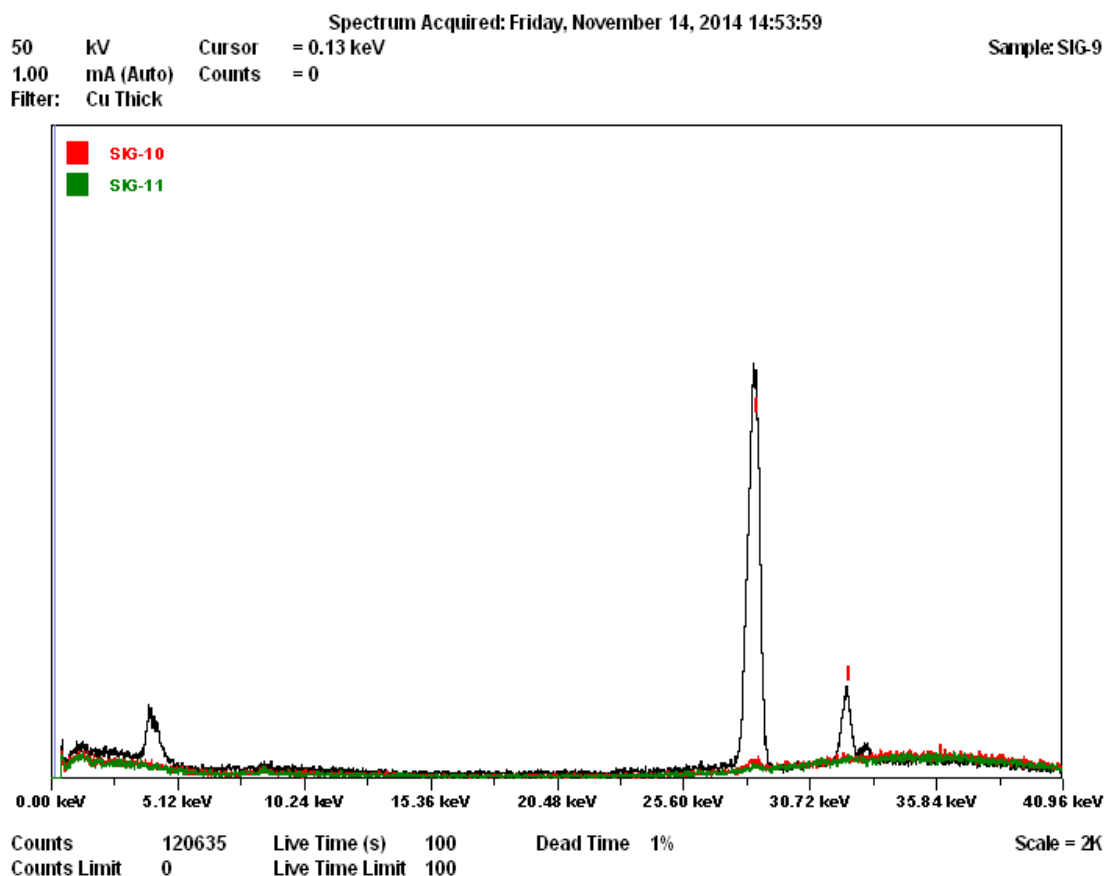


Рисунок 11 – РФЛА-спектры полученных образцов

Зависимости количества иода, нанесенного на образец с использованием каждой из систем растворителей, продемонстрированы на рисунках 12-15.

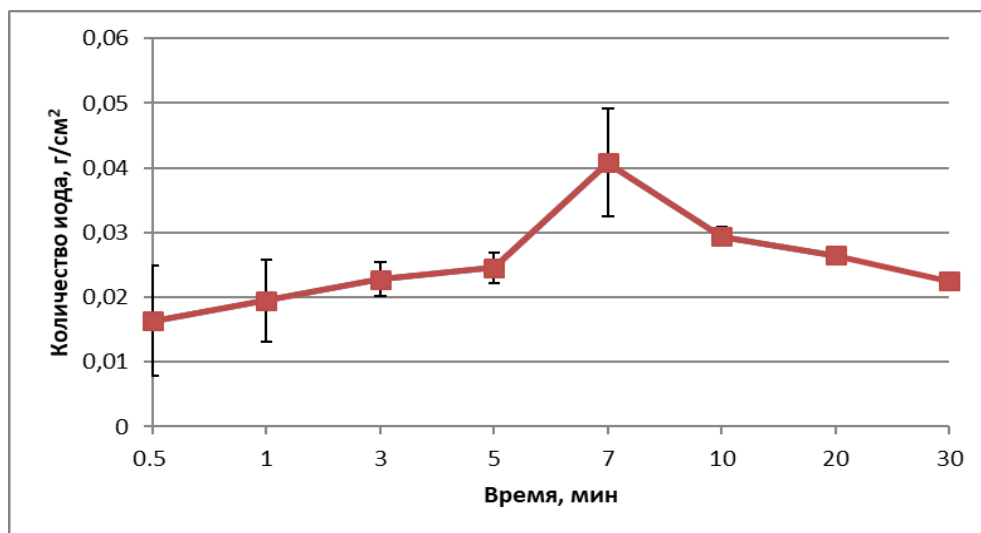


Рисунок 12 – Зависимость количества иода, нанесенного на поверхность образца из паров, с использованием системы толуол/этанол (3/7 по объему), от времени нанесения

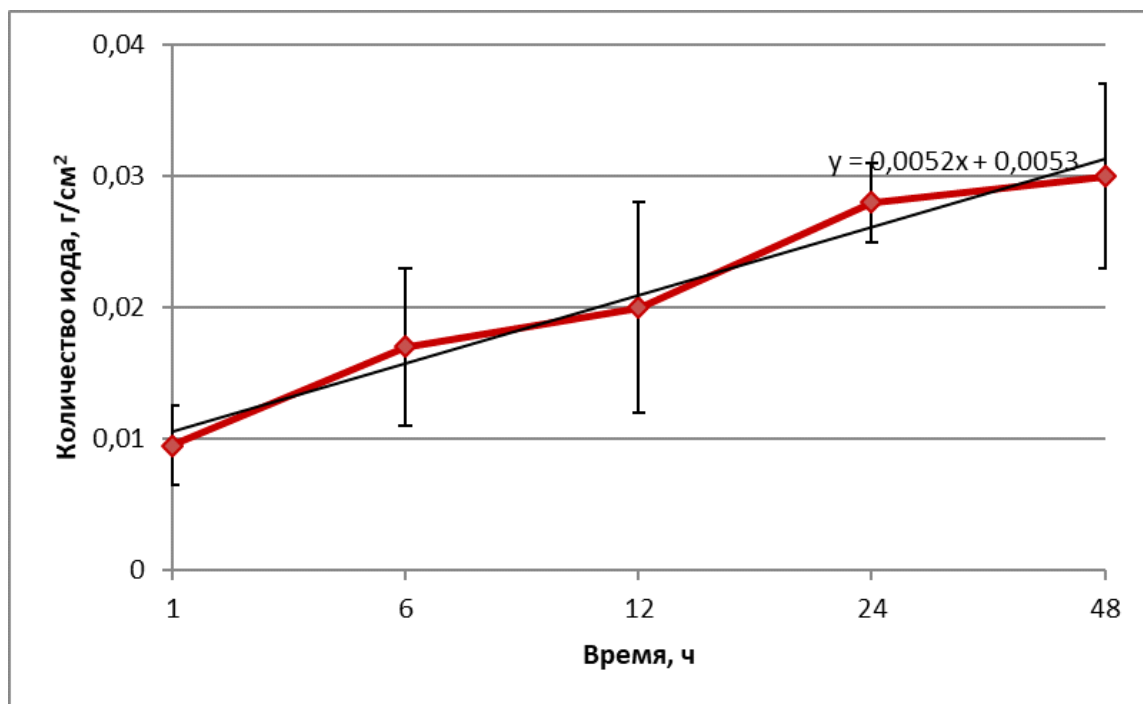


Рисунок 13 – Зависимость количества иода, нанесенного на поверхность образца из насыщенного водно-спиртового раствора ($C_{I_2}=6,5$ мг/мл), с использованием системы толуол/этанол (3/7 по объему), от времени нанесения

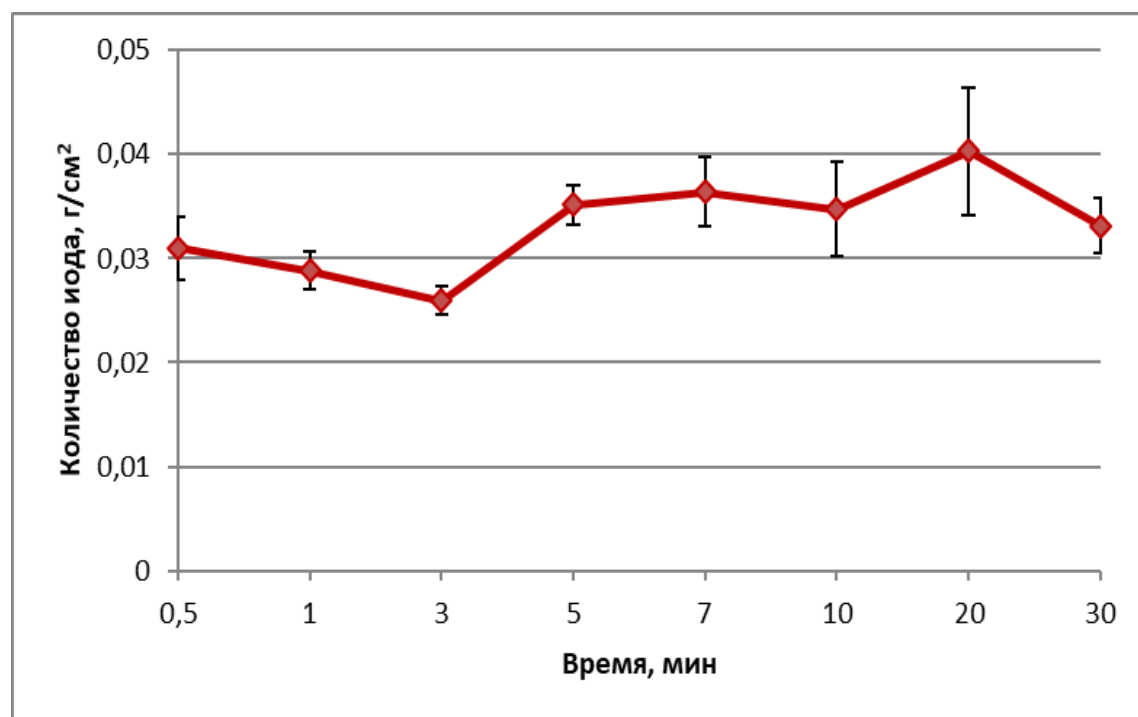


Рисунок 14 – Зависимость количества иода, нанесенного на поверхность образца из паров, с использованием системы трихлорметан/этилацетат (1/9 по объему), от времени нанесения

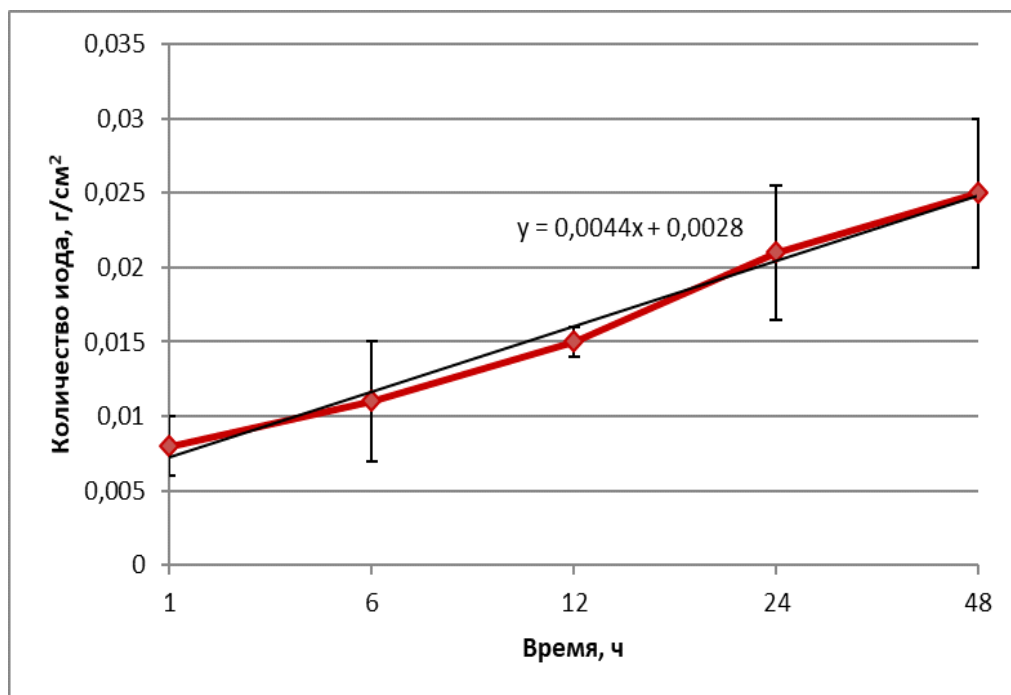


Рисунок 15 – Зависимость количества иода, нанесенного на поверхность образца из насыщенного водно-спиртового раствора ($C_{I_2}=6,5$ мг/мл), с использованием системы трихлорметан/этилацетат (1/9 по объему), от времени нанесения

Таким образом, с помощью подобранных режимов возможно нанесение примерно до 0,04 г иода на сантиметр поверхности пленки из поли(молочной кислоты). Однако использование системы толуол/этанол (3/7 по объему) позволяет достичь этой концентрации за меньший промежуток времени.

3.1.3.5 Антибактериальные свойства полученных материалов

По результатам количественного анализа, наибольшее количество иода на поверхность пленок из поли(молочной кислоты) было нанесено при обработке полимера смесью толуола и этанола (3/7, об.) с последующим выдерживанием в парах иода в течение 7 минут. Так как именно иод является агентом, проявляющим антибактериальные свойства, была проверена антибактериальная активность материала, содержащего наибольшее количество иода на поверхности. Результаты измерения антибактериальной активности полученного материала представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Число жизнеспособных бактерий после 24 ч инкубации на полимерных пленках с иммобилизованным на поверхности иодом

Образец	Число жизнеспособных бактерий (N), извлеченных на 1 см ² , КОЕ/см ²	
	после 0 часов	после 24
Пленка из поли(молочной кислоты) (контроль)	$2,0 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$
Пленка из поли(молочной кислоты), обработанная смесью толуол/этанол (3/7 по объему) с иодом, нанесенным на поверхность из паров в течение 7 минут (концентрация иода на поверхности 0.04 ± 0.0083 г/см ²)	$2,0 \times 10^5$	5

В соответствии с формулой (4) антибактериальная активность полученного материала составила 3,85.

Таким образом, нанесение иода на пленки из поли(молочной кислоты) позволяет придать полимеру антибактериальные свойства.

3.2 Получение скаффолдов на основе поли(ε-капролактона) и поли(молочной кислоты), содержащих иод на поверхности волокон, с использованием метода «хороший/плохой растворитель»

Одним из рисков, возникающих при применении тканеинженерных скаффолдов на основе биоразлагаемых полиэфиров, является возможность возникновения раневых инфекций, связанных с адгезией патогенных бактерий на поверхности полимера [69]. Таким образом, возникает актуальность получения скаффолдов на основе биоразлагаемых полиэфиров (в частности поли(молочной кислоты) и поли(ε-капролактона), обладающих антибактериальной активностью). С целью придания полимерным материалам подобных свойств, часто

используются наполнители, среди которых – серебро, оксид цинка, оксид церия и антибиотики [70].

Ещё одним типом добавок, обладающих антибактериальной и противовирусной активностью, является иод и его соединения [71]. На данный момент, разработан широкий ряд полимерных материалов, содержащих иод в качестве антибактериального агента. Так, иод добавлен на стадии полимеризации в скаффолды на основе полиуретана, что позволило придать им антибактериальную активность в отношении *S. aureus*. Мембраны на основе нейлона-6, модифицированные иодом, проявляли антибактериальную активность в отношении *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *K. pneumonia* [72]. В случае поли(молочной кислоты) и поли(ε-капролактона), материалы, содержащие иод, неизвестны связи с низкой совместимостью этих полимеров с иодом.

В связи с этим, метод модифицирования, основанный на предварительной обработке поверхности полимера смесью хорошего и плохого растворителей, был впервые реализован для скаффолдов с целью получения материалов на основе поли(ε-капролактона) и поли(молочной кислоты), содержащих иод на поверхности волокон.

3.2.1 Подбор состава системы «хороший/плохой растворитель»

С целью подбора состава смеси «хороший/плохой растворитель» для модифицирования скаффолдов из поли(молочной кислоты) и поли(ε-капролактона), было исследовано влияние обработки смесями толуола и этанола в соотношении от 0,5/9,5 до 1/9 в течение 10 минут на морфологию (рисунки 16 и 17) и кристаллическую структуру (рисунки 18 и 19) скаффолдов.

Обработка скаффолдов смесями толуола и этанола выбранных составов не привела к статистически значимым изменениям среднего диаметра волокон, а также к формированию дефектов в структуре скаффолдов (склеякам и обрывам волокон). В связи с этим, оптимальным составом смеси «хороший/плохой растворитель» был выбран состав с соотношением толуола к этанолу 1/9 по

объему, поскольку он содержит большее количество толуола, способствующего формированию активного слоя, способного захватывать модифицирующий агент.

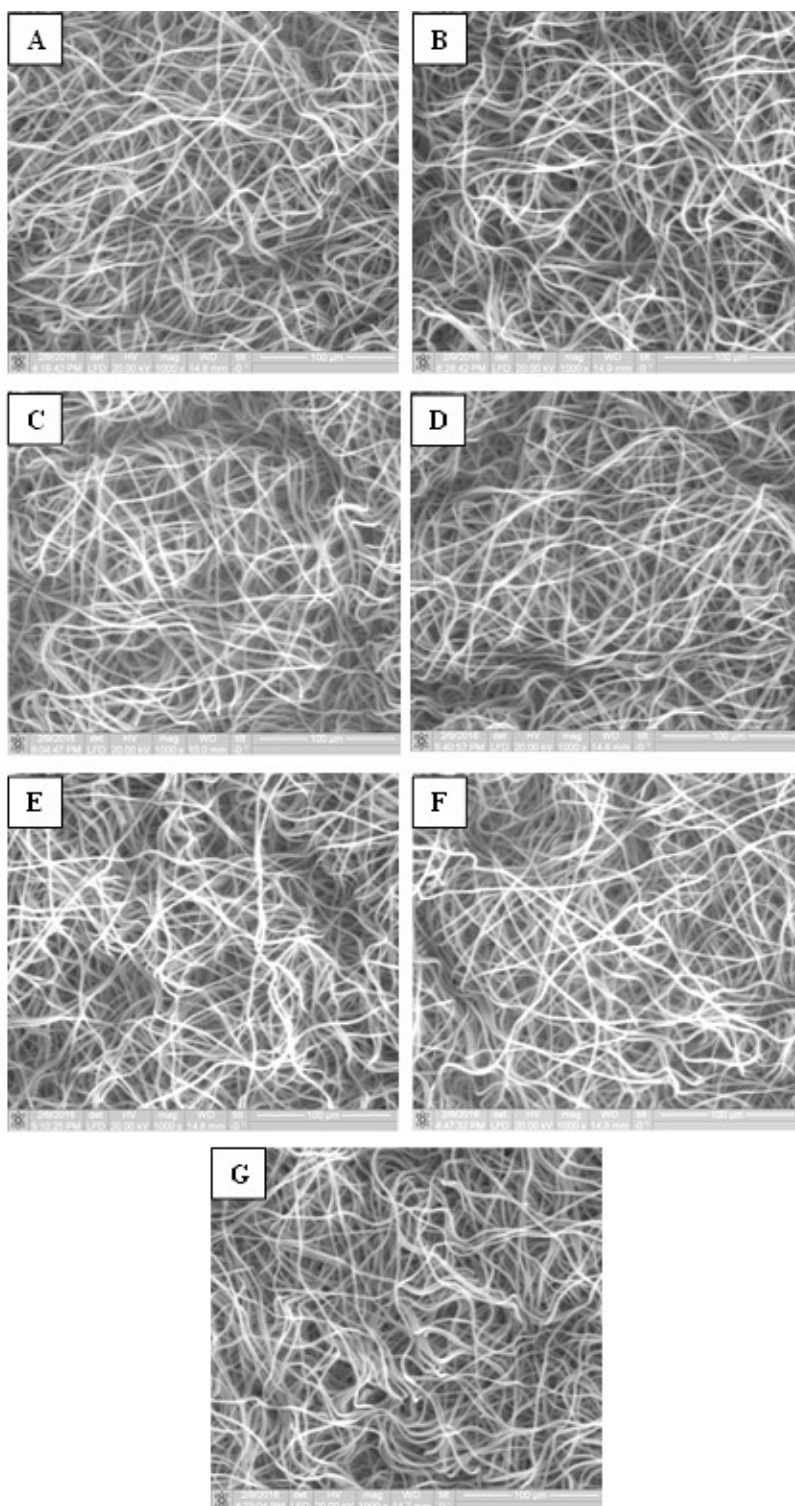


Рисунок 16 – СЭМ-изображения скаффолдов из поли(молочной кислоты) до (А) и после обработки смесью толуола и этанола в различных соотношениях, В – G, от 0,5/9,5 до 1/9, соответственно.

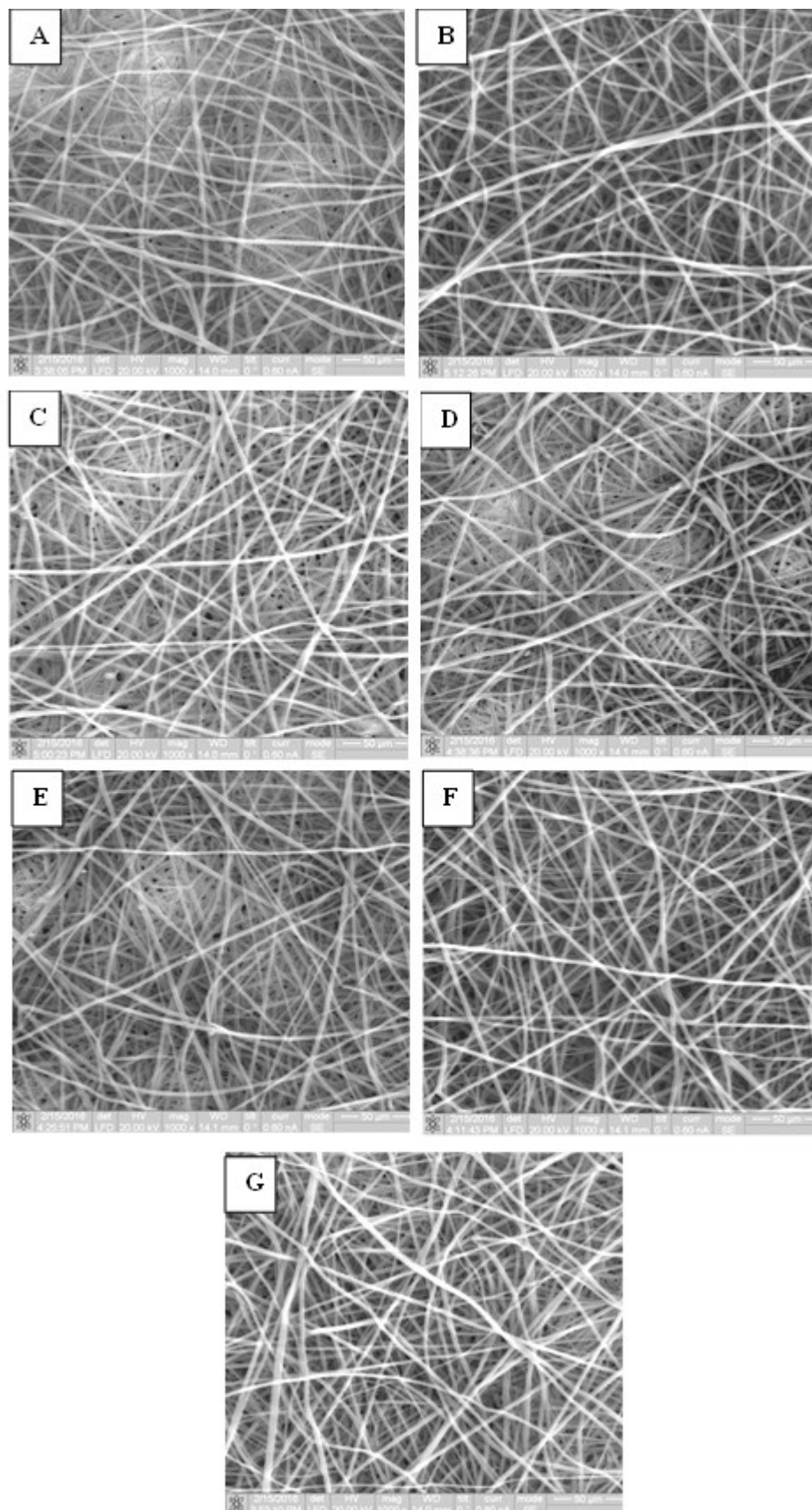


Рисунок 17 – СЭМ-изображения скаффолдов из поли(ε-капролактона) до (А) и после обработки смесью толуола и этанола в различных соотношениях, В – G, от 0,5/9,5 до 1/9, соответственно.

На рисунках 18 и 19 приведены дифрактограммы скаффолдов на основе поли(молочной кислоты) и поли(ϵ -капролактона) до и после обработки смесями толуола и этанола в различных соотношениях.

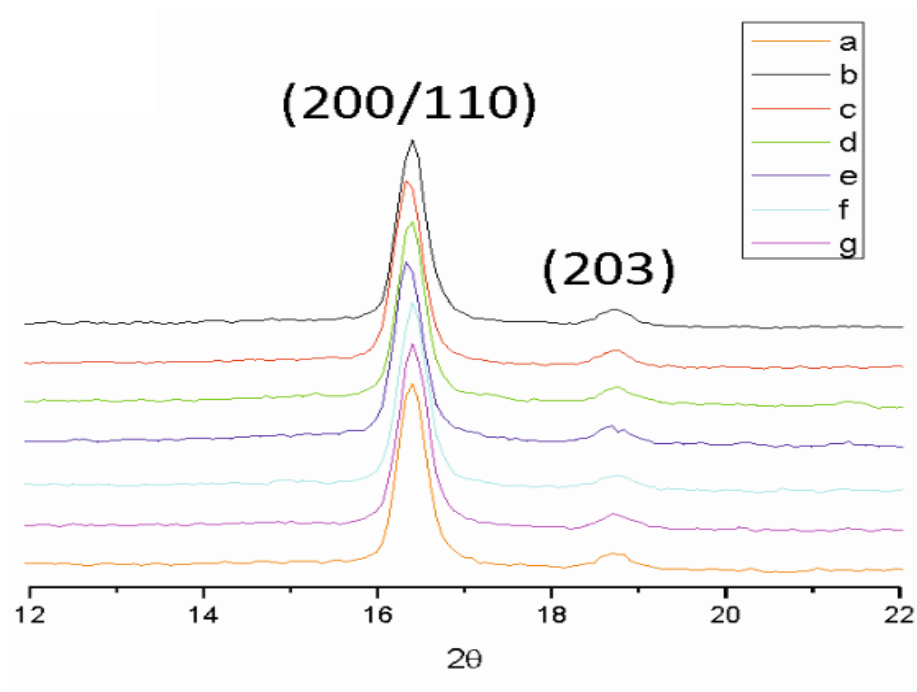


Рисунок 18 – Дифрактограммы скаффолдов из поли(молочной кислоты) до (а) и после обработки смесью толуола и этанола в различных соотношениях, b – g, от 0,5/9,5 до 1/9, соответственно.

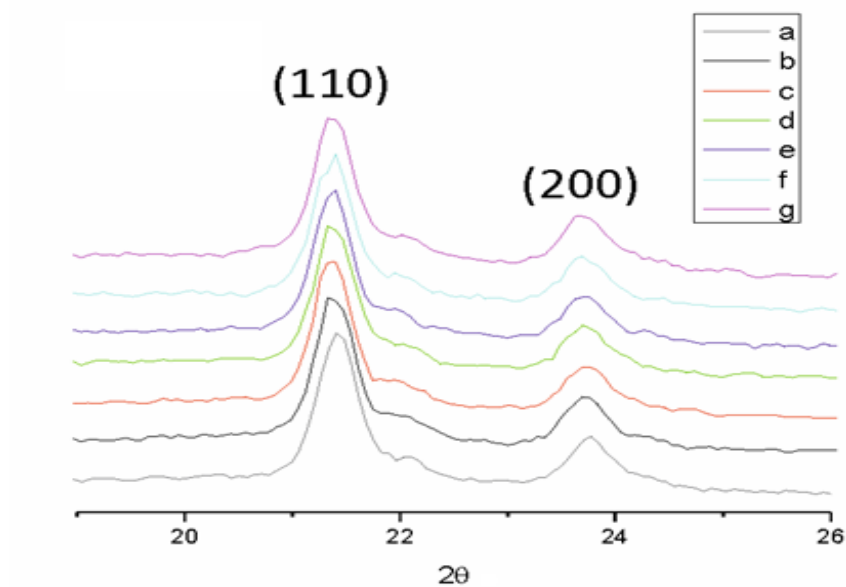


Рисунок 19 – Дифрактограммы скаффолдов из поли(ϵ -капролактона) до (а) и после обработки смесью толуола и этанола в различных соотношениях, b – g, от 0,5/9,5 до 1/9, соответственно.

На дифрактограммах обработанных материалов не было обнаружено новых рефлексов. Таким образом, можно сделать вывод о том, что обработка смесями толуола и этанола в выбранных соотношениях не ведет к изменениям в кристаллической структуре скаффолдов из поли(молочной кислоты) и поли(ϵ -капролактона). Размер кристаллитов, рассчитанный по формуле (5), также статистически значимо не изменился (Таблица 5).

Таким образом, в дальнейшем для модифицирования скаффолдов на основе поли(молочной кислоты) и поли(ϵ -капролактона) использовали смесь толуола и этанола в соотношении 1/9. Показано, что данный состав смеси не оказывает влияния на морфологию и кристаллическую структуру скаффолдов.

Таблица 5 – Средний размер кристаллита материалов до и после обработки смесями толуола и этанола в различном соотношении

Соотношение толуола и этанола (по объему)	Средний размер кристаллита поли(молочной кислоты), нм	Средний размер кристаллита поли(ϵ -капролактона), нм
0	21,61 $\pm$ 0,38	19,35 $\pm$ 0,61
0,5/9,5	21,05 $\pm$ 0,32	19,80 $\pm$ 0,65
0,6/9,4	21,05 $\pm$ 0,31	19,35 $\pm$ 0,59
0,7/9,3	21,24 $\pm$ 0,55	19,51 $\pm$ 0,70
0,8/9,2	21,61 $\pm$ 0,33	19,48 $\pm$ 0,21
0,9/9,1	20,69 $\pm$ 0,53	19,35 $\pm$ 0,61
1/9	21,07 $\pm$ 0,83	18,89 $\pm$ 0,28

3.2.2 Изучение динамики нанесения иода на поверхность волокон

Проведена оптимизация нанесения иода на скаффолды из поли(молочной кислоты) и поли(ε-капролактона). Максимальная концентрация иода в скаффолдах из поли(ε-капролактона) достигается за 180 секунд выдерживания в парах, а в скаффолдах из поли(молочной кислоты) – за 300 секунд (Рисунок 20).

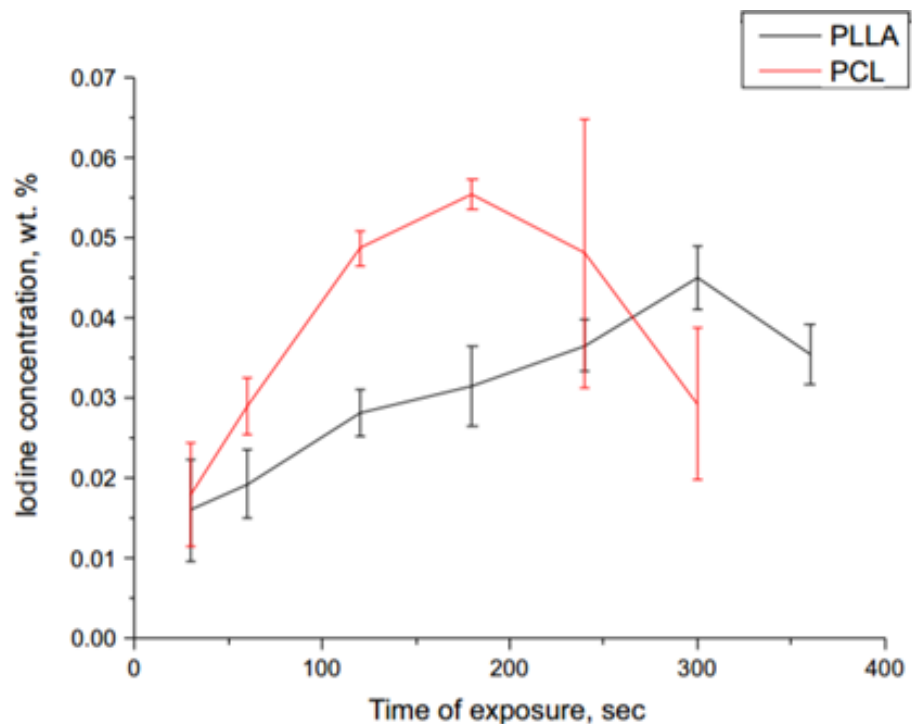


Рисунок 20 – Изменения концентрации иода в материалах со временем выдерживания в парах иода

Таким образом, на скаффолды из поли(ε-капролактона) было нанесено приблизительно на 0,01 % масс. больше иода. С учетом близких значений параметров растворимости поли(молочной кислоты) и поли(ε-капролактона), можно предположить, что ключевую роль в процессе частичного растворения поверхностных слоев и адсорбции иода играет молекулярная масса полимера.

Отдельно стоит обратить внимание на характер адсорбции иода. Согласно полученным результатам, после достижения максимума, концентрация иода в материале начинает падать, что противоречит динамике простой адсорбции, согласно которой предполагалось насыщение активного слоя полимера и поддержание концентрации иода на одном уровне. Это наблюдение можно

объяснить суммарным эффектом двух процессов: в процессе адсорбции иода, растворители испаряются с поверхности волокон, что ведет к переносу и испарению иода. Для доказательства выдвинутого предположения, был поставлен дополнительный эксперимент. Скаффолды из поли(молочной кислоты) и из поли(ε-капролактона) были обработаны смесью толуола и этанола (1/9, об.) в течение 10 минут и помещены в идентичный стеклянный цилиндр без паров иода на 300 и 180 секунд, соответственно. Затем, скаффолды перемещали в пары иода. Оказалось, что поверхностный слой скаффолдов, высушенных подобным образом, утратил свою сорбционную способность. Таким образом, испарение остаточных растворителей из поверхностного слоя, ведущее к его застыванию, стало лимитирующим фактором. В то же время, со снижением сорбционной способности поверхностного слоя волокон иод начинает испаряться из сформированного слоя.

Проведенные исследования показали, что максимальные концентрации иода в скаффолдах на основе поли(молочной кислоты) и поли(ε-капролактона) достигнуты за 300 и 180 секунд выдерживания в парах иода. В связи с этим материалы, выдержанные в парах иода большее время, исследованы не были.

3.3 Физико-химические свойства скаффолдов, содержащих иод на поверхности волокон

3.3.1 Морфология скаффолдов, содержащих иод на поверхности волокон

Метод сканирующей электронной микроскопии был использован для оценки влияния предложенного метода нанесения иода на морфологию волокон скаффолдов из поли(молочной кислоты) и поли(ε-капролактона).

Было отмечено статистически незначимое снижение среднего диаметра волокон скаффолдов на основе поли(молочной кислоты) (Рисунок 21). Кроме того, нанесение иода на поверхность волокон не привело к формированию каких-либо, дефектов в структуре скаффолда.

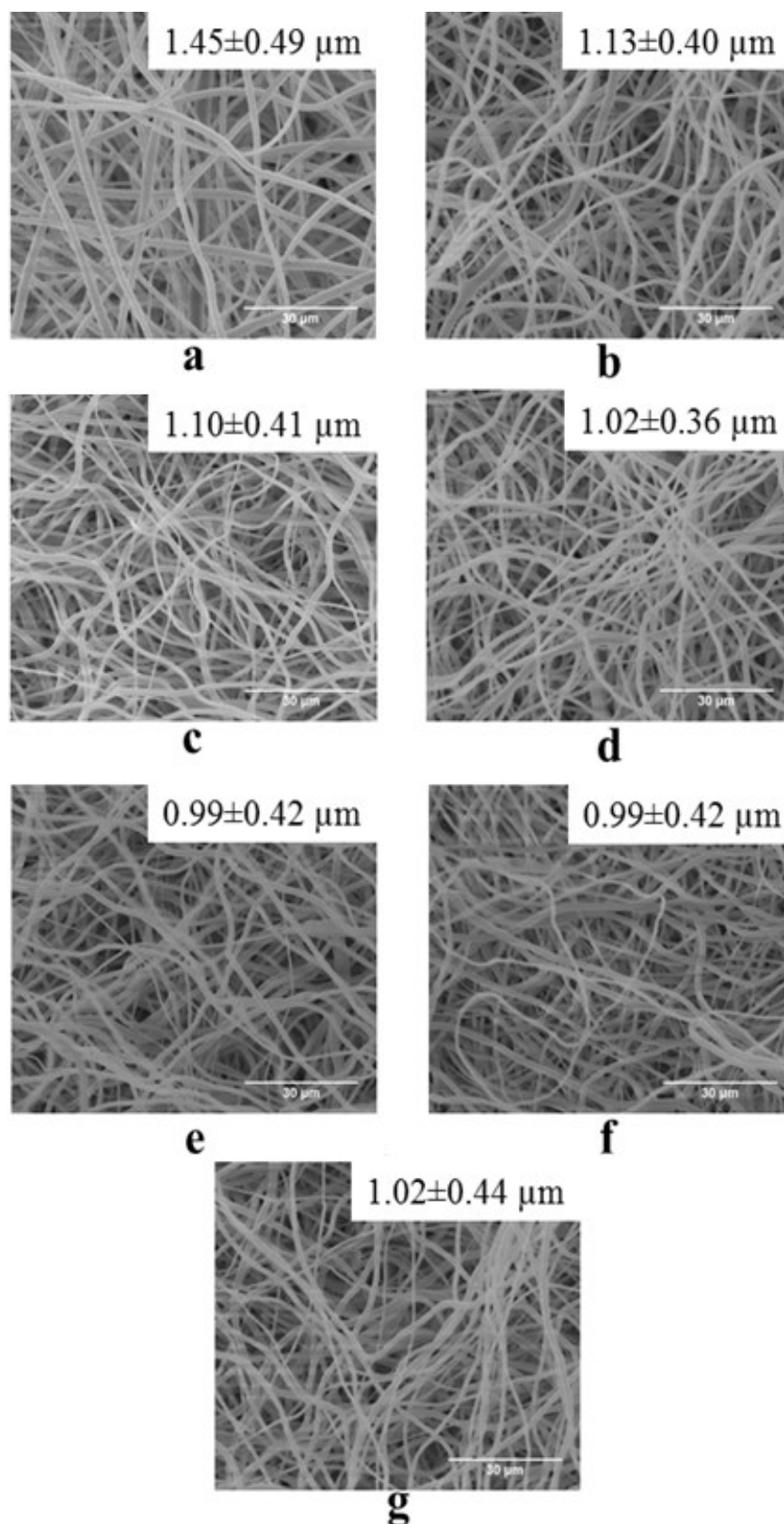


Рисунок 21 – СЭМ-изображения немодифицированных и модифицированных скаффолдов из поли(молочной кислоты): а) контрольный образец б)-г) – образцы, выдержанные в парах иода 30, 60, 120, 180, 240 и 300 секунд, соответственно.

Похожая картина наблюдалась и для скаффолдов из поли(ε-капролактона) (Рисунок 22). Как и для скаффолдов из поли(молочной кислоты), статистически значимых изменений среднего диаметра волокон обнаружено не было. Макроструктура скаффолда также не изменилась.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) полученных материалов позволила выявить еще одну возможную причину более высокой концентрации иода в скаффолдах из поли(ε-капролактона). Поскольку волокна скаффолдов из поли(ε-капролактона) почти в 2,5 раза толще, чем волокна скаффолдов из поли(молочной кислоты), поверхность полимера, способная к захвату иода, также увеличена.

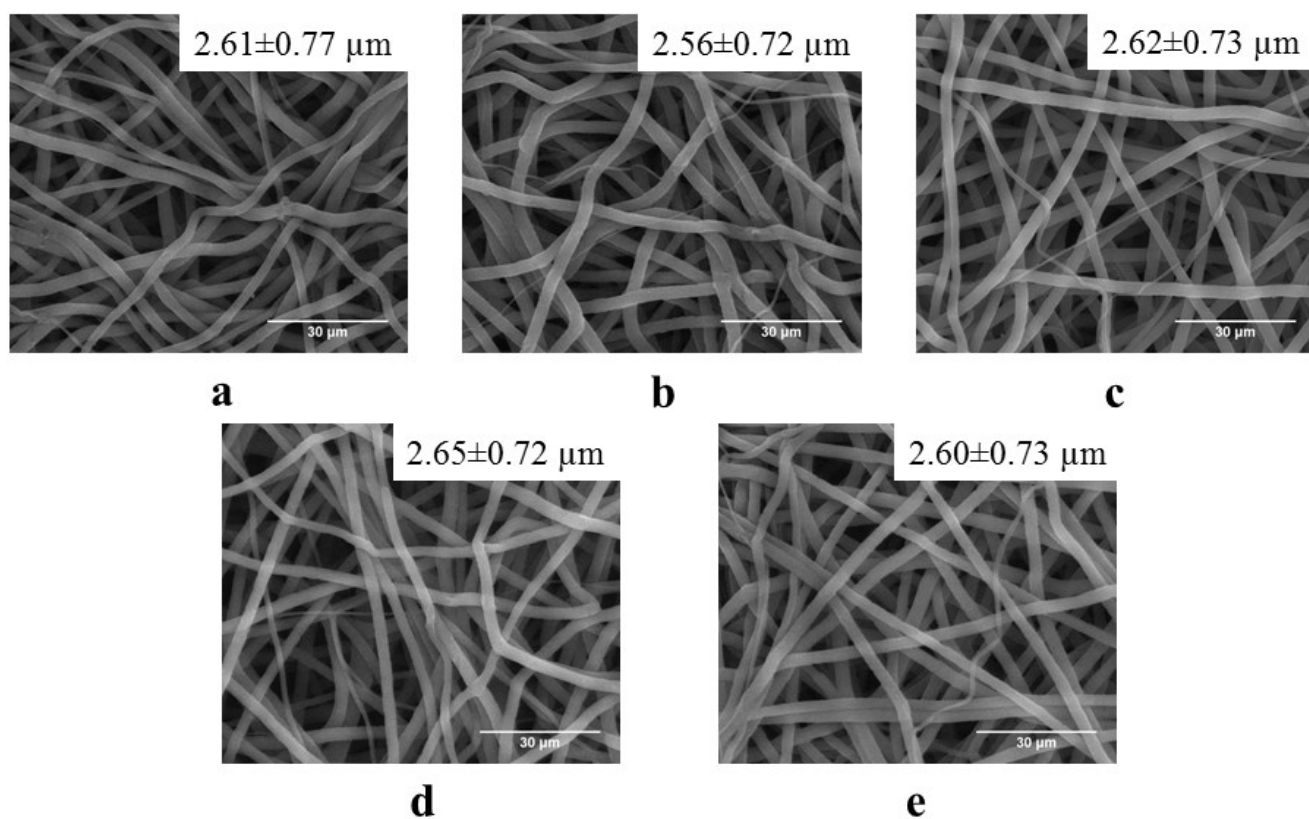


Рисунок 22 – СЭМ-изображения немодифицированных и модифицированных скаффолдов из поли(ε-капролактона): а) контрольный образец б)-е) – образцы, выдержанные в парах иода 30, 60, 120 и 180 секунд, соответственно.

3.3.2 Механические свойства скаффолдов, содержащих иод на поверхности волокон

С целью доказательства предположения о том, что поверхностное модифицирование полимеров не влияет на механические свойства материала, проведено сравнение прочности на разрыв модифицированных и немодифицированных скаффолдов (Рисунок 23).

Обнаруженные изменения прочности на разрыв оказались статистически незначимы и не имели общей зависимости со временем выдерживания в парах иода. Таким образом, можно сказать, что предлагаемый метод модифицирования не влияет на механические свойства полимерных скаффолдов.

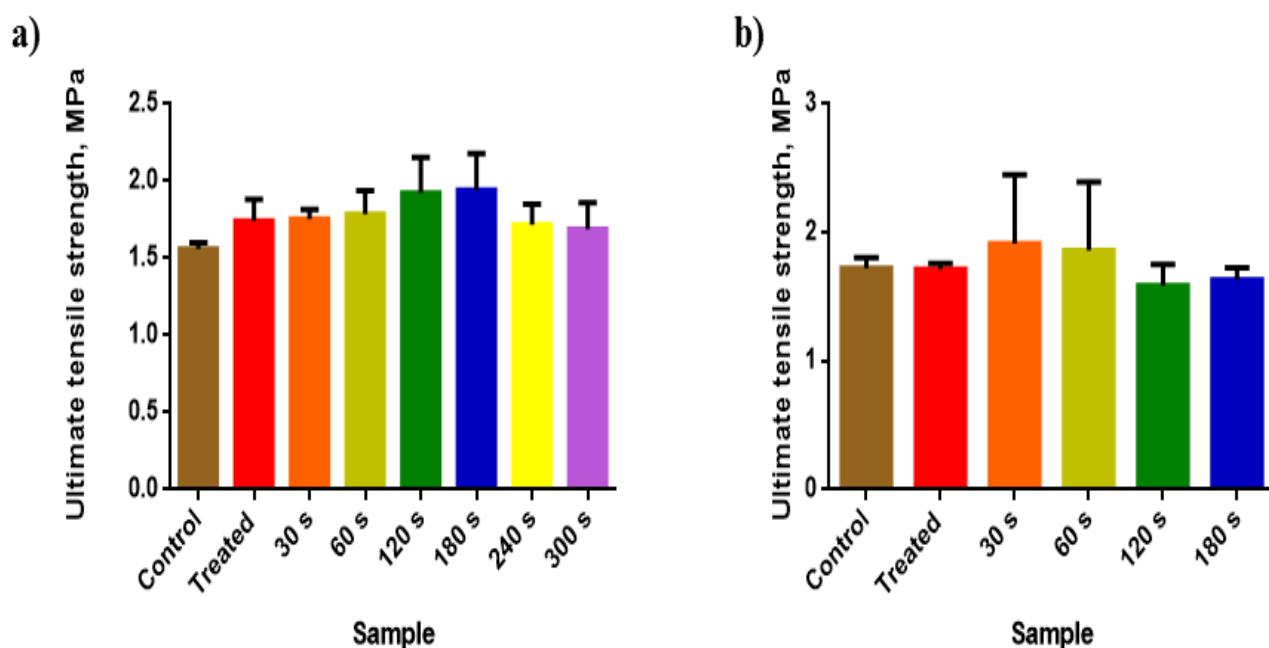


Рисунок 23 – Прочность на разрыв образцов из: а) поли(молочной кислоты) б) поли(ε-капролактона)

3.4 Антибактериальные свойства скаффолдов, содержащих иод на поверхности волокон

Обнаружено, что полученные материалы проявляют активность в

отношении *E. coli*. Значительное снижение концентрации бактерий наблюдалось при инкубировании с немодифицированными скаффолдами. Нами высказано предположение, что в силу своей волокнистой структуры материалы удерживают часть бактерий внутри, а дальнейшее снижение численности бактерий связано с антибактериальной активностью иода.

Скаффолды из поли(ϵ -капролактона), выдержанные в парах иода в течение 180 секунд, демонстрировали 100% активность против *E. coli* (Рисунок 24).

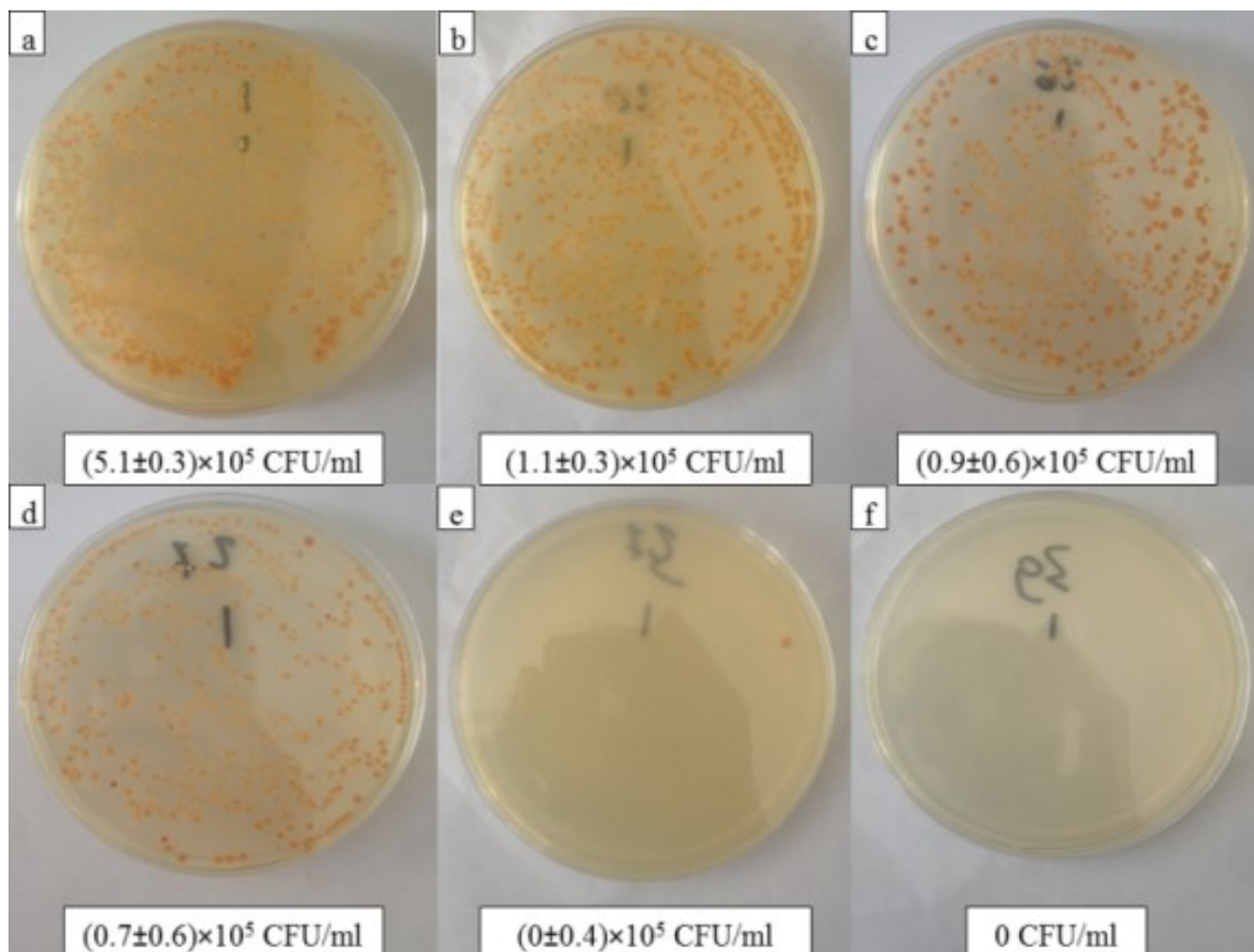


Рисунок 24 – Культуры *E. coli* после 24 часов инкубирования а) без скаффолда б) с немодифицированным скаффолдом из поли(ϵ -капролактона) с)-f) со скаффолдами из поли(ϵ -капролактона), выдержанными в парах иода в течение 30, 60, 120 и 180 секунд

По сравнению с некоторыми представленными полимерными

волокнистыми структурами, обладающими антибактериальным эффектом (такими, как скаффолды из поли(молочной кислоты) и поли(ϵ -капролактона), содержащие наночастицы серебра [74] и трагакант [75]), скаффолды, представленные в данном исследовании, оказались более эффективны.

Антибактериальная активность была обнаружена и для скаффолдов из поли(молочной кислоты) (Рисунок 25).

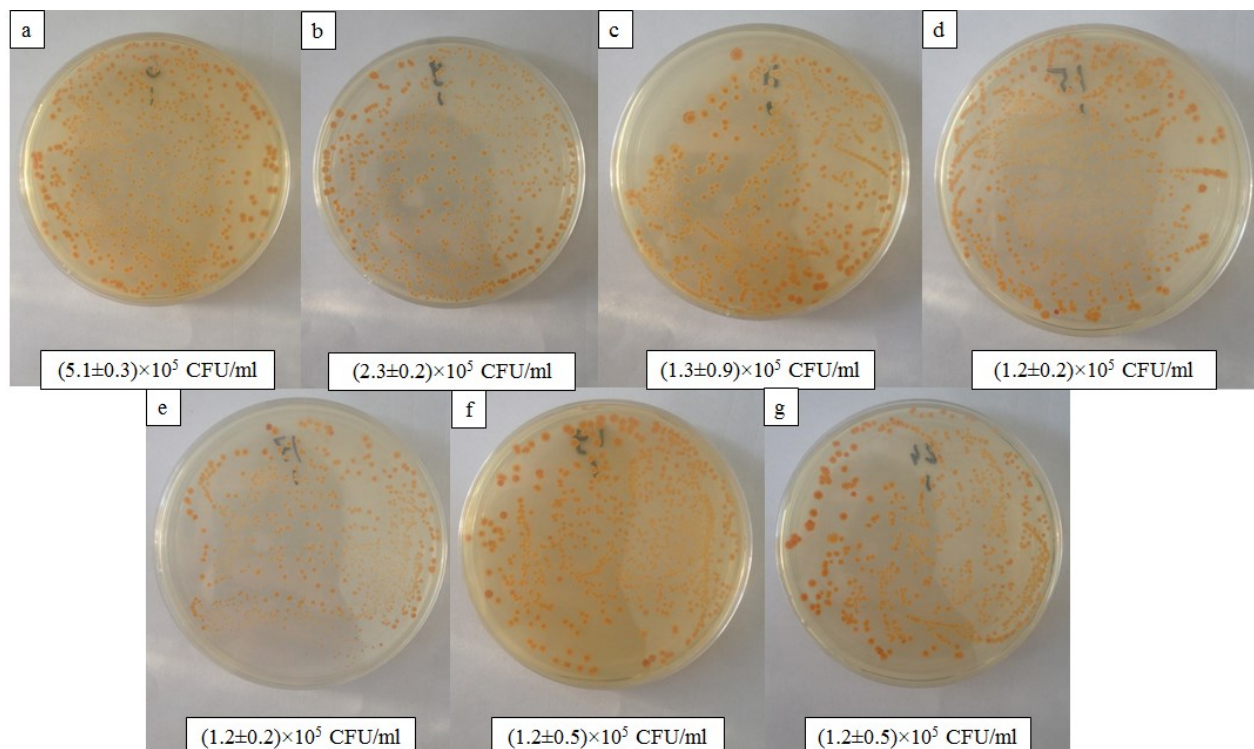


Рисунок 25 – Культуры *E. coli* после 24 инкубирования а) без скаффолда б) с немодифицированным скаффолдом из поли(молочной кислоты) с)–г) со скаффолдами из поли(молочной кислоты), выдержанными в парах иода в течение 30, 60, 120, 180, 240 и 300 секунд

Как и для скаффолдов из поли(ϵ -капролактона), отмечено значительное снижение количества бактерий в суспензии после инкубирования с немодифицированными скаффолдами. Модифицирование скаффолдов из поли(молочной кислоты) позволило поддерживать концентрацию бактерий на уровне $(1,2 \pm 0,5) \times 10^5$ КОЕ/мл. таким образом, с точки зрения антибактериальной активности, скаффолды из поли(ϵ -капролактона) более предпочтительны в связи с

более высокой концентрацией иода и более низкой молекулярной массой, что ведет к более эффективной адсорбции иода и контакту с окружающей средой.

3.5 Получение скаффолдов на основе поли(молочной кислоты), содержащих желатин на поверхности волокон, с использованием метода «хороший/плохой растворитель»

Благодаря своим механическим характеристикам, высокому соотношению площади поверхности к объему, биосовместимости и биodeградируемости, скаффолды на основе поли(молочной кислоты) активно изучаются в качестве материалов для восстановления хрящевой и костной ткани, тканей сосудов, печени и почек, а также – для целевой доставки лекарственных средств [76]. В то же время, существенным недостатком поли(молочной кислоты) является её гидрофобность, что затрудняет адгезию клеток к поверхности полимера и соответственно, снижает его биосовместимость [77]. С целью повышения биосовместимости скаффолдов на основе поли(молочной кислоты), предложен ряд методов, среди которых – плазменная обработка, химическое травление и получение композитных материалов [78].

Перспективным подходом является включение белковых молекул в структуру скаффолда. Желатин – это неиммуногенный биоразлагаемый и биосовместимый белок, применяемый в тканевой инженерии хрящевой, костной и кожной тканей, а также тканей глаз и кровеносных сосудов [79]. На сегодняшний день, существует два подхода ко включению желатина в состав полимерных скаффолдов. Первый заключается в добавлении желатина в процессе формования, второй – в нанесении желатина после формования скаффолда [80].

Для реализации первого подхода, предложено несколько методов. Группой Gu материалы на основе поли(молочной кислоты) и желатина получены из прядильного раствора в трихлорметане, уксусной кислоте и воде [81]. Chen и коллеги использовали для изготовления скаффолдов на основе поли(молочной кислоты) и желатина 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропан-2-ол [14]. Группой Binan

скаффолды из поли(молочной кислоты) с добавлением желатина были получены методом коаксиального электроспиннинга [82]. Группой Torricelli показана возможность получения скаффолдов на основе поли(молочной кислоты) и желатина при одновременном электроспиннинге полимеров на общем коллекторе [83]. В рамках упомянутых исследований, показано, что добавление желатина благоприятно влияет на биосовместимость скаффолдов на основе поли(молочной кислоты). В то же время, исследователями было обнаружено ухудшение прочности полученных материалов.

Альтернативный вариант получения скаффолдов на основе поли(молочной кислоты), содержащих желатин, заключается в нанесении желатина на поверхность волокон, таким образом, сохраняя объемные свойства скаффолда. С целью ковалентной пришивки желатина на поверхность волокон из поли(молочной кислоты), группа Cui использовала 1,6-гександиамин и глутаровый альдегид [84]. Группой Chen для нанесения желатина на поверхность волокон из поли(молочной кислоты) использована предварительная обработка плазмой тлеющего разряда кислорода [85]. Недостатками существующих методов нанесения желатина на поверхность волокон поли(молочной кислоты) является использование реактивов, которые разрушают макромолекулы полимера, либо необходимость дополнительного оборудования (в частности, плазменной установки).

Таким образом, метод модифицирования, основанный на предварительной обработке смесью толуола и этанола может стать эффективной альтернативой существующим методам получения скаффолдов на основе поли(молочной кислоты) и желатина.

Эффективность метода оценивали посредством определения количества желатина, нанесенного на поверхность волокон, с использованием гравиметрического метода. Для этого, увеличение массы скаффолда после нанесения желатина разделили на объем скаффолда. Результаты данных измерений приведены в таблице 6.

Полученные результаты наглядно демонстрируют, что предложенный метод

нековалентной иммобилизации позволяет достичь максимальной концентрации желатина в скаффолде уже после пяти минут выдерживания.

Таблица 6 – Изменение количества желатина, нанесенного на поверхность волокон, с течением времени обработки в растворе желатина

Время выдерживания в растворе желатина, мин	Концентрация желатина, мг/см ³
0	-
5	0,07 ± 0,01
10	0,05 ± 0,01
30	0,05 ± 0,01
60	0,06 ± 0,01

При нанесении желатина из его раствора, одновременно проходят два процесса: адсорбция желатина активным слоем полимера и растворение желатина, находящегося на поверхности волокон. Можно сделать предположение о том, что в первые пять минут нанесения достигается равновесие этих двух процессов.

3.6 Физико-химические свойства скаффолдов, содержащих желатин на поверхности волокон

3.6.1 Морфология скаффолдов, содержащих желатин на поверхности волокон

Скаффолды из поли(молочной кислоты) были образованы случайно переплетающимися волокнами цилиндрической формы с нормальным распределением диаметров (Рисунок 26). Средний диаметр волокон немодифицированного скаффолда составил $3,95 \pm 0,24$ мкм. Иммобилизация желатина в течение 5 минут привела к увеличению среднего диаметра волокон приблизительно на 10%. При этом, толщина полученного покрытия, содержащего

желатин (в районе 400 нм), и распределение диаметров волокон не изменялись при дальнейшем выдерживании образца в растворе желатина до 60 минут (Таблица 7, Рисунок 26).

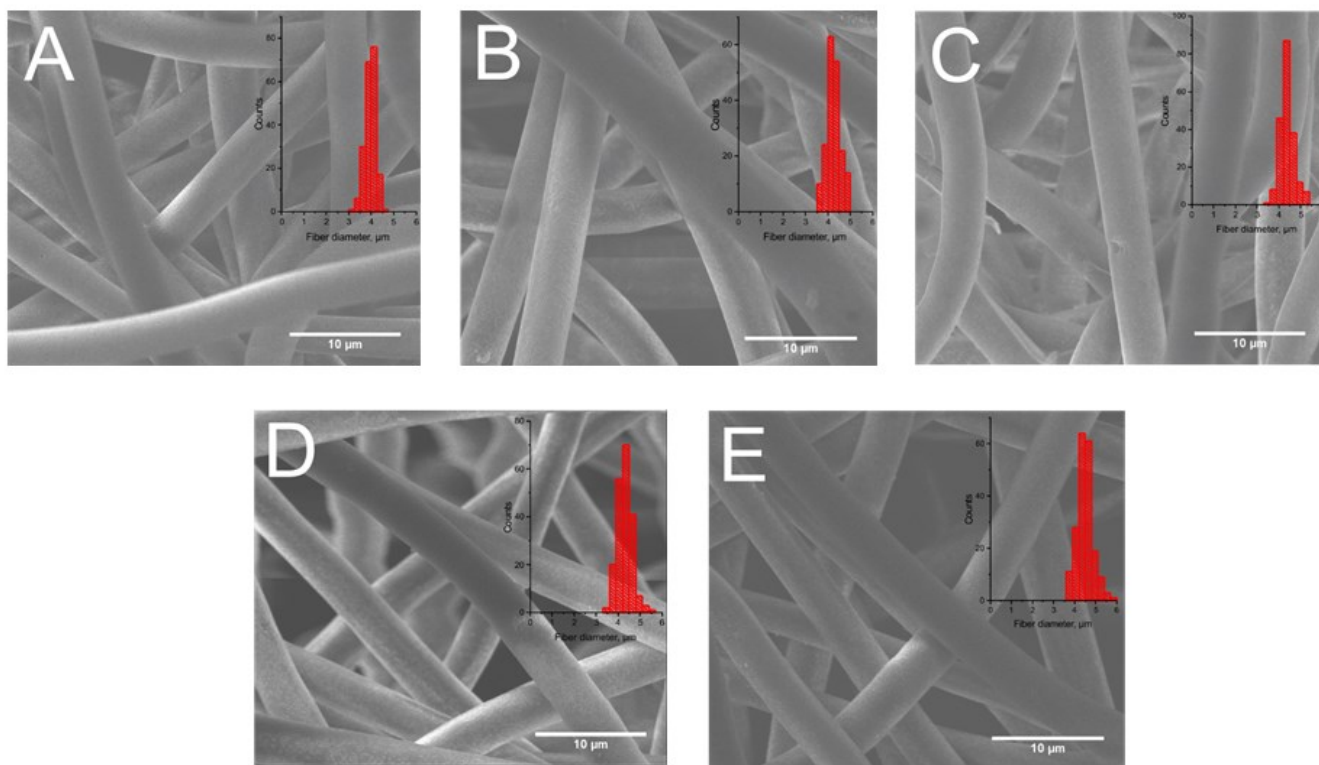


Рисунок 26 – СЭМ-изображения и распределение диаметров волокон полученных материалов: А – немодифицированный скаффолд, В-Е – скаффолды, модифицированные в растворе желатина в течение 5, 10, 30 и 60 минут, соответственно

Также, формирование покрытия, содержащего желатин, привело к снижению пористости материала (от $92 \pm 8\%$ до $84 \pm 1\%$), связанному с увеличением среднего диаметра волокон (Таблица 7).

Таблица 7 – Морфологические характеристики материалов, модифицированных и немодифицированных желатином

Время выдерживания в растворе желатина, мин	Средний диаметр волокон, мкм ($n = 200$)	Пористость, % ($n = 5$)
0	$4,0 \pm 0,2$	92 ± 8

Продолжение таблицы 7

5	$4,3 \pm 0,5^*$	$84 \pm 1^*$
10	$4,4 \pm 0,3^*$	$83 \pm 2^*$
30	$4,3 \pm 0,3^*$	$83 \pm 1^*$
60	$4,5 \pm 0,4^*$	$83 \pm 1^*$

$*p < 0.05$ по сравнению с контрольным образцом (тест Крускала-Уоллеса)

3.6.2 Гидрофильность скаффолдов, содержащих желатин на поверхности волокон

Поверхность скаффолдов из поли(молочной кислоты) имела гидрофобный характер, краевой угол контакта с водой составил $127 \pm 2^\circ$, что связано с их пористой структурой и отсутствием гидрофобных групп на поверхности материала. Нанесение желатина привело к полному смачиванию поверхности (Таблица 8).

Таблица 8 – Гидрофильность модифицированных и немодифицированных желатином материалов

Время выдерживания в растворе желатина, мин	0	5	10	30	60
Краевой угол смачивания водой, °	127 ± 2	0	0	0	0

3.6.3 Механические свойства скаффолдов, содержащих желатин на поверхности волокон

Немодифицированные скаффолды из поли(молочной кислоты) обладали прочностью на разрыв в $0,8 \pm 0,1$ МПа, и максимальным удлинением $340 \pm 10\%$. Нанесение желатина в течение 5 минут привело к увеличению прочности на разрыв на 60% и снижению максимального удлинения на 50% (Таблица 9).

Данные эффекты можно объяснить рядом факторов: увеличением среднего диаметра волокон, различными механическими свойствами поли(молочной кислоты) и желатина, а также пластифицирующим эффектом желатина.

Таблица 9 – Физико-химические характеристики материалов, модифицированных и немодифицированных желатином.

Время выдерживания в растворе желатина, мин	Максимальное удлинение, % (n = 5)	Прочность на разрыв, МПа (n = 5)
0	340 ± 10	$0,8 \pm 0,1$
5	$240 \pm 40^*$	$1,3 \pm 0,4^*$
10	$180 \pm 22^*$	$1,3 \pm 0,2^*$
30	$187 \pm 36^*$	$1,4 \pm 0,3^*$
60	$195 \pm 46^*$	$1,4 \pm 0,3^*$

* $p < 0.05$ по сравнению с контрольным образцом (тест Крускала-Уоллеса)

3.7 Исследование биосовместимости скаффолдов, содержащих желатин на поверхности волокон

При культивировании мезенхимальных стволовых клеток на поверхности немодифицированного скаффолда из поли(молочной кислоты), клетки имели округлую форму и среднюю площадь 228 ± 81 мкм². Среднее количество адгезированных клеток составило 160 ± 7 клеток на мм² скаффолда (Таблица 10). Сокультивирование с материалами, модифицированными желатином, привело к почти двукратному увеличению количества адгезированных клеток на единицу площади образца и их площади (Таблица 8). Кроме того, адгезированные клетки располагались вдоль волокон, что говорит об их высокой функциональности. Улучшенная адгезия клеток на поверхности модифицированных скаффолдов объясняется улучшенной гидрофильностью поверхности, наличием в составе желатина пептидных доменов, распознаваемых интегриновыми рецепторами, а также наличием в составе желатина свободных карбоксильных групп.

Таблица 10 – Количество адгезированных клеток и средняя площадь одной клетки на материалах, модифицированных и немодифицированных желатином.

Время иммобилизации желатина, мин	Количество адгезированных клеток на мм ² (n = 3)	Средняя площадь одной клетки, мкм ² (n = 3)
0	160 ± 7	228 ± 81
5	315 ± 23*	417 ± 163*
10	335 ± 23*	411 ± 162*
30	331 ± 24*	432 ± 184*
60	300 ± 10*	418 ± 170*

* $p < 0.05$ по сравнению с контрольным образцом (тест Крускала-Уоллеса)

3.8 Краткие выводы по главе 3

Благодаря предложенному методу модифицирования скаффолдов на основе поли(молочной кислоты) и поли(ε-капролактона), предусматривающего предварительную обработку скаффолдов смесью хорошего и плохого растворителей (толуола и этанола, 1/9 по объему) с последующим выдерживанием обработанных скаффолдов в насыщенных парах иода, впервые получены материалы на основе перечисленных полимеров, содержащие иод на поверхности волокон. Предложенный метод также впервые применен для нековалентной иммобилизации желатина на поверхности волокон биоразлагаемых полимеров.

Установлено, что иммобилизация иода на поверхности волокон скаффолдов из поли(молочной кислоты) и поли(ε-капролактона) с помощью предложенного метода не оказывает статистически значимого влияния на морфологию скаффолдов (средний диаметр волокон скаффолда остается прежним). Также показано, что нанесение иода с применением предложенного метода не оказывает влияния на механические характеристики полимеров. Нанесение иода позволило придать модифицированным материалам антибактериальную и бактериостатическую активность в отношении *E. coli*.

Также метод модифицирования скаффолдов на основе поли(молочной кислоты), предусматривающий предварительную обработку смесью хорошего и плохого растворителей (толуола и этанола, 1/9 по объему), впервые использован для нековалентной иммобилизации желатина на поверхности волокон из поли(молочной кислоты). Предложенный метод позволил сформировать на поверхности волокон равномерный слой, содержащий желатин, толщиной приблизительно 400 нм. Формирование желатинсодержащего покрытия привело к снижению пористости модифицированных материалов с $92 \pm 8 \%$ до $84 \pm 1 \%$.

Оптимизация предложенного метода позволила сделать вывод о том, что максимальная концентрация желатина (0.07 ± 0.01 мг/см³ скаффолда) достигается уже за пять минут выдерживания образца, обработанного смесью растворителей, в растворе желатина.

Помимо улучшения гидрофильности модифицированных материалов (угол контакта с водой немодифицированного скаффолда 120° , модифицированного - 0°), нанесение желатина привело к упрочнению материала. в частности - максимальная нагрузка увеличилась на 60 %, тогда как максимальное удлинение - уменьшилось на 50 %.

Благодаря нанесению желатина на волокна скаффолдов предложенным методом, удалось улучшить биосовместимость скаффолдов, что доказано улучшенной адгезией мезенхимальных стволовых клеток.

ГЛАВА 4. ПОЛУЧЕНИЕ КОМПОЗИТНЫХ МАТЕРИАЛОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ В ОБЪЕМЕ

4.1 Получение скаффолдов на основе поли(ε-капролактона), содержащих L-аргинин

Благодаря своим механическим характеристикам, волокнистые скаффолды на основе поли(ε-капролактона) стали распространенным материалом, предлагаемым для создания сосудистых графтов [86,87]. В то же время, применение поли(ε-капролактона) связано с риском тромбоза и замедленной эндотелиализацией [88]. С целью решения этих проблем, предложен ряд методов поверхностного и объемного модифицирования скаффолдов на основе поли(ε-капролактона) для сосудистых графтов.

Являясь естественным субстратом для ферментов семейства NO-синтаз, L-аргинин является перспективным агентом для модифицирования кардиоваскулярных имплантатов. Под действием NO-синтаз, L-аргинин метаболизируется до L-цитруллина и оксида азота (II), являющегося одним из наиважнейших соединений в кровеносной системе [89]. Так, иммобилизация L-аргинина на поверхности сосудистых стентов из нитрида титана с TaTiO₂ покрытием привела к увеличению гемосовместимости стентов благодаря меньшей скорости кальцификации и тромбогенности [90].

Таким образом, актуальность разработки композитного материала на основе поли(ε-капролактона), содержащего L-аргинин, становится очевидна. Однако, ранее получение подобных материалов было затруднено отсутствием общего растворителя для полимера и аминокислоты. Нашей группой обнаружена возможность приготовления прядильных растворов поли(ε-капролактона), содержащих L-аргинин.

4.2 Физико-химические свойства скаффолдов, содержащих L-аргинин

4.2.1 Изучение влияния концентрации L-аргинина в прядильном растворе на морфологию полученных скаффолдов

Для получения волокнистых материалов на основе поли(ϵ -капролактона) с содержанием L-аргинина были приготовлены растворы поли(ϵ -капролактона) и L-аргинина в гексафторизопропанолe с концентрацией сухого вещества 7% масс. Концентрация L-аргинина в сухом веществе составляла 0, 0,1, 0,5, 1, 3 и 7 % масс.

Влияние концентрации L-аргинина на морфологию полученных материалов исследовали при формовании скаффолдов в одном режиме: напряжение – 20 кВ, скорость подачи раствора – 2 мл/ч, расстояние от кончика иглы, через которую подается раствор, до коллектора 150 мм.

На рисунке 27 представлены СЭМ изображения скаффолдов с различным содержанием L-аргинина.

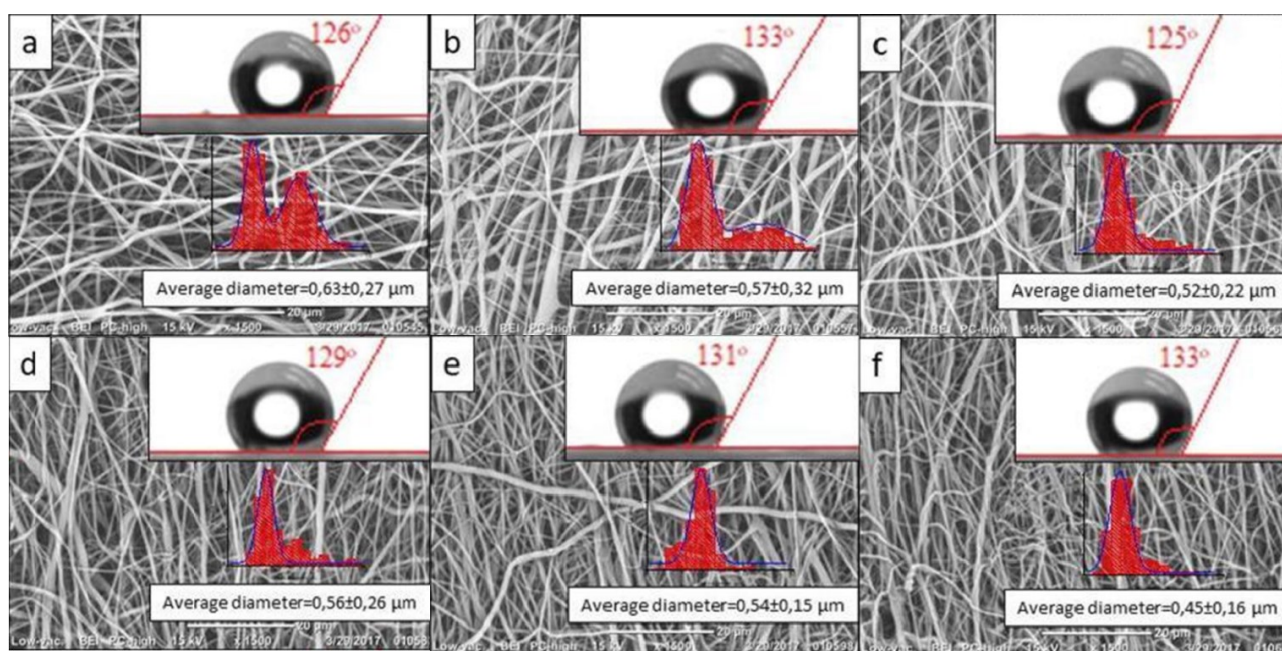


Рисунок 27 – СЭМ-изображения, гистограммы распределения диаметров волокон и краевой угол смачивания водой скаффолдов с различным содержанием L-аргинина: a-f, 0, 0,1, 0,5, 1, 3 и 7 % масс.

Добавление L-аргинина в прядильный раствор привело к значительным

изменениям морфологии полученных материалов. Скаффолды без содержания L-аргинина были сформированы волокнами со средним диаметром $0,63 \pm 0,27$ мкм. Распределение диаметров волокон имело бимодальный характер. С ростом концентрации L-аргинина наблюдалось снижение среднего диаметра волокон скаффолда (до $0,45 \pm 0,16$ мкм) и изменение распределения диаметров волокон в сторону одномодального.

Данные наблюдения можно объяснить следующим образом. Гексафторизопропанол, растворитель, использованный при формовании материалов, является достаточно сильной кислотой ($pK_a = 9.3$). Таким образом, при протонировании L-аргинина в прядильном растворе возможно образование ряда ионов и цвиттер-ионов: $(CF_3)_2CHO^-$, $H_3N^+C(=NH)NH(CH_2)_3CH(NH_2)COOH$, $H_2NC(=NH_2^+)(CH_2)_3CH(NH_2)COOH$, $H_2N(C=NH)(CH_2)_3CH(NH_3^+)COOH$, $H_2N(C=NH)(CH_2)_3CH(NH_3^+)COO^-$. Наличие данных ионов ведет к увеличению электрической проводимости прядильных растворов, что, в свою очередь, ведет к более частому расщеплению струй полимера при формовании и, соответственно, меньшему диаметру сформованных волокон.

4.2.2 Механические свойства скаффолдов с различным содержанием L-аргинина

В таблице 11 приведены механические характеристики полученных материалов с различным содержанием L-аргинина.

Таблица 11 – Механические характеристики материалов на основе поли(ϵ -капролактона) с различным содержанием L-аргинина

Содержание L-аргинина	Степень кристалличности, %	Максимальное удлинение, %	Максимальная нагрузка, МПа	Модуль Юнга, МПа
0%	$53,0 \pm 0,5$	162 ± 10	8 ± 1	18 ± 3
0,1%	$54,4 \pm 1,3$	147 ± 13	12 ± 2	21 ± 3
0,5%	$55,5 \pm 1,6$	123 ± 12	10 ± 2	21 ± 3

Продолжение таблицы 11

1%	$53,7 \pm 0,3$	142 ± 7	14 ± 1	24 ± 2
3%	$56,4 \pm 0,5$	151 ± 10	17 ± 1	23 ± 1
7%	$58,2 \pm 0,4$	176 ± 23	21 ± 3	34 ± 3

Концентрация L-аргинина оказывала неоднозначное влияние на механические характеристики полученных материалов. Её рост от 0 до 0,5 % масс. вёл к снижению максимального удлинения со 162 ± 10 до 123 ± 12 %. При дальнейшем росте концентрации L-аргинина наблюдалось упрочнение материалов (рост максимальной нагрузки с 10 ± 2 до 21 ± 3 МПа).

Наблюдаемые изменения механических свойств полученных материалов могут быть объяснены рядом факторов:

- изменение морфологии полученных материалов (снижение среднего диаметра волокон и изменение характера распределения диаметра волокон);
- рост степени кристалличности полученных материалов с увеличением концентрации аргинина;
- возможность формирования водородных связей между сложноэфирными связями поли(ε-капролактона) и -COOH, -NH₂, =NH группами L-аргинина.

4.3 Исследование биосовместимости скаффолдов, содержащих L-аргинин, in vitro

В таблице 12 представлены результаты сокультивирования мезенхимальных стволовых клеток с полученными материалами.

Таблица 12 – Количество адгезированных мезенхимальных стволовых клеток и их жизнеспособность на материалах с различным содержанием L-аргинина

Содержание L-аргинина	Количество адгезированных клеток на мм ² образца	Жизнеспособные клетки, %	Апоптоз, %	Поздний апоптоз и некроз, %
-----------------------	---	--------------------------	------------	-----------------------------

Продолжение таблицы 12

0%	52 ± 16	$66,8 \pm 4,4$	$18,8 \pm 5,3$	$12,3 \pm 0,5$
0,1%	69 ± 27	$67,2 \pm 3,5$	$18,1 \pm 0,1$	$12,5 \pm 3,3$
0,5%	107 ± 32	$71,6 \pm 2,3$	$12,6 \pm 2,2$	$14,9 \pm 0,2$
1%	74 ± 25	$76,4 \pm 0,8$	$11,6 \pm 0,4$	$11,0 \pm 1,3$
3%	67 ± 24	$66,5 \pm 8,6$	$16,9 \pm 5,5$	$15,3 \pm 2,8$
7%	113 ± 30	$50,0 \pm 7,7$	$27,6 \pm 4,5$	$23,0 \pm 0,1$

4.4 Получение скаффолдов на основе поли(ε-капролактона) и поливинилпирролидона с использованием гексафторизопропанола в качестве общего растворителя

Благодаря отличным механическим характеристикам, биосовместимости и биоразлагаемости, материалы на основе поли(ε-капролактона) получили широкое распространение в различных областях медицины как средства целевой доставки лекарственных средств и белков, материалов покрытий, и материалов для восстановления различных тканей человека [15]. В частности, скаффолды на основе поли(ε-капролактона), полученные методом электроспиннинга, активно используются для доставки лекарственных препаратов, белковых молекул и других биологически активных веществ [91–95].

В свою очередь, контроль кинетики выхода активного агента играет важнейшую роль для систем целевой доставки, позволяя поддерживать необходимую концентрацию в месте имплантации, избежать побочные эффекты и таким образом использовать ЛС более эффективно [96]. В отношении систем целевой доставки на основе полимерных скаффолдов, полученных методом электроспиннинга, для контроля за кинетикой выхода наиболее интенсивно используются плазменные методы [97]. Однако, плазменные методы предусматривают использование дополнительного (обычно, дорогостоящего)

оборудования и неизбежно ведут к деградации полимера, и, соответственно, ухудшению его механических свойств. Кроме того, остается серьезный вопрос касательно стабильности загруженных агентов под воздействием плазмы.

Перспективным подходом для контроля кинетики выхода ЛС является получение композитных полимерных материалов. Комбинирование полимеров с различными свойствами (степень кристалличности, молекулярная масса, гидрофильность, и т.д.) позволяет в значительной мере варьировать свойства конечного скаффолда [98]. В данном контексте становятся интересны композитные материалы на основе поли(ϵ -капролактона) и поливинилпирролидона, поскольку комбинирование водорастворимого (поливинилпирролидона) и водонерастворимого (поли(ϵ -капролактона)) полимеров позволяет варьировать гидрофильность, а также стабильность композита в водной среде.

Так, методом аэродинамического формования группой Seok Chan Park получены core-shell скаффолды на основе поли(ϵ -капролактона) и поливинилпирролидона, содержащие сульфородамин Б [99]. В качестве порогена, во внешний слой поли(ϵ -капролактона) был добавлен поливинилпирролидон различной молекулярной массы, что позволило регулировать выход сульфородамина Б в водной среде. Полученные материалы проявляли улучшенную биосовместимость с кератиноцитами эпидермиса человека.

Также, для получения скаффолдов на основе поли(ϵ -капролактона) и поливинилпирролидона успешно использован метод электрогидродинамической 3D-печати. Группой Kai Li получены скаффолды из поли(ϵ -капролактона) и поливинилпирролидона, проявляющие высокую биосовместимость с MC3T3-E1 Subclone14 клетками хрящевой ткани [100]. Группой Jun-Chuan Wang данный метод использован для получения высокоориентированных скаффолдов, содержащих тетрациклин. Получение таких материалов позволило достичь выхода тетрациклина *in vitro* в течение 120 часов [101].

Однако, наиболее распространенным методом для получения скаффолдов на основе поли(ϵ -капролактона) и поливинилпирролидона является метод

электроформования. Так, группой Kim подобраны режимы получения материалов с соотношением поли(ε-капролактона) и поливинилпирролидона 100/0, 90/10, 80/20, 60/40, 50/50, 40/60 и 0/100. % масс из прядильного раствора в смеси хлороформа и метанола (1/4, об.) [102]. Рост концентрации поливинилпирролидона вел к упрочнению материалов и улучшению адгезии клеток стволовых клеток, выделенных из жировой ткани. Более того, скаффолды на основе поли(ε-капролактона) и поливинилпирролидона успешно использованы для контролируемой доставки лекарственных агентов. Группой Suganya из прядильного раствора в смеси хлороформа и метанола (1/4, об.) были получены скаффолды из поли(ε-капролактона) и поливинилпирролидона с соотношением полимеров 50/50, загруженные экстрактом *Tecomella undulata*. Полученные материалы проявляли антибактериальную активность в отношении *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* [103]. Группой Jia получены скаффолды из поли(ε-капролактона) и поливинилпирролидона, содержащие наночастицы серебра [104].

Таким образом, становится очевидной перспективность материалов на основе поли(ε-капролактона) и поливинилпирролидона в тканевой инженерии и для систем целевой доставки лекарственных средств. В то же время, влияние соотношения полимеров в материалах, полученных методом электроспиннинга, не исследовано и по сей день. Поэтому, в данной работе при одних и тех же параметрах электроформования получены скаффолды из поли(ε-капролактона) и поливинилпирролидона с различным соотношением полимеров (100/0, 95/5, 90/10, 75/25 и 50/50 % масс.). Кроме того, данные материалы получены из прядильного раствора в 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропаноле, что существенно расширяет их возможные применения, поскольку этот растворитель является распространенным растворителем для широкого спектра биологически активных веществ [95,105–107].

4.4.1 Изучение влияния соотношения поли(ε-капролактона) и поливинилпирролидона в прядильном растворе на морфологию полученных материалов

С целью исследования влияния содержания поли(ε-капролактона) и поливинилпирролидона в прядильном растворе на морфологию полученных материалов, были приготовлены растворы полимеров в гексафторизопропанол с концентрацией сухого вещества 7 % масс. с различным соотношением поли(ε-капролактона) и поливинилпирролидона: 100/0, 95/5, 90/10, 75/25 и 50/50. Скаффолды были получены при следующих параметрах электроформования: напряжение – 25 кВ, скорость подачи раствора – 3 мл/ч, расстояние от кончика иглы до стального цилиндрического коллектора диаметром 100 мм, вращающегося со скоростью 50 об./мин – 110 мм. На рисунке 28 приведены СЭМ-изображения полученных скаффолдов на основе поли(ε-капролактона) и поливинилпирролидона в различных соотношениях.

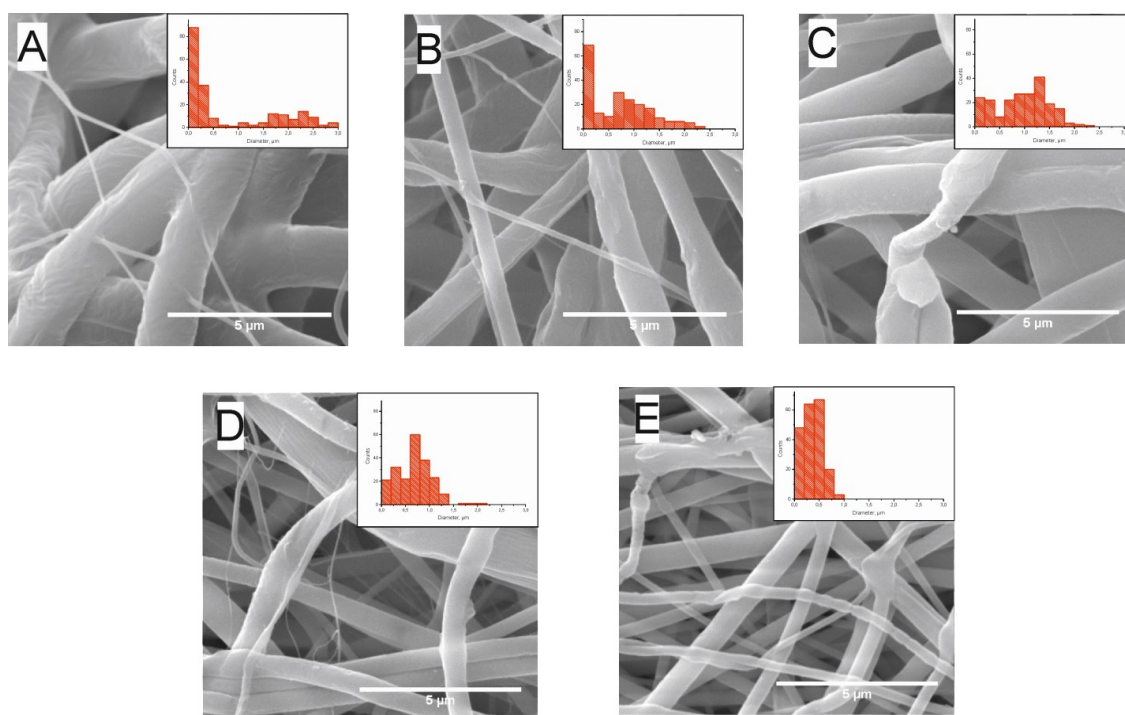


Рисунок 28 – СЭМ-изображения полученных материалов (увеличение x20000) и распределение диаметров волокон скаффолдов с различным соотношением поли(ε-капролактона) и поливинилпирролидона: а-е, 100/0, 95/5, 90/10, 75/25, 50/50, соответственно.

С увеличением концентрации поливинилпирролидона, наблюдается снижение среднего диаметра волокон полученных материалов (Таблица 11) и изменение распределения диаметра волокон. Данное наблюдение можно объяснить меньшей вязкостью прядильных растворов в связи с более низкой молекулярной массой поливинилпирролидона (Таблица 13).

Таблица 13 – Вязкость прядильных растворов и средний диаметр волокон скаффолдов с различным соотношением поли(ε-капролактона) и поливинилпирролидона.

Соотношение поли(ε-капролактона) и поливинилпирролидона	Динамическая вязкость прядильного раствора, Па×с	Средний диаметр волокон, мкм
100/0	2,95	0,88±0,97
95/5	2,65	0,74±0,57
90/10	2,1	0,96±0,51
75/25	1,27	0,68±0,35
50/50	0,46	0,37±0,18

4.5 Физико-химические свойства скаффолдов на основе поли(ε-капролактона) и поливинилпирролидона

4.5.1 Механические свойства скаффолдов с различным соотношением поли(ε-капролактона) и поливинилпирролидона

В Таблице 14 представлены механические свойства полученных скаффолдов с различным соотношением поли(ε-капролактона) и поливинилпирролидона.

Добавление поливинилпирролидона в концентрации 5 % масс. привело к увеличению модуля Юнга на 10 % и снижению максимального удлинения более, чем на 35 %. Дальнейший рост концентрации поливинилпирролидона также вел к

упрочнению материала. Так, по сравнению со скаффолдом из поли(ϵ -капролактона), скаффолд с соотношением поли(ϵ -капролактона) и поливинилпирролидона 50/50 обладал в шесть раз большим модулем Юнга и в пять раз меньшим максимальным удлинением.

Таблица 14 – Механические свойства полученных скаффолдов с различным соотношением поли(ϵ -капролактона) и поливинилпирролидона.

Соотношение поли(ϵ -капролактона) и поливинилпирролидона	Модуль Юнга, МПа	Максимальное удлинение, %
100/0	17,4 $\pm$ 0,4	1038,7 $\pm$ 36,5
95/5	20,4 $\pm$ 2,2	684,8 $\pm$ 233,3
90/10	34,2 $\pm$ 0,6	482,8 $\pm$ 3,0
75/25	59,7 $\pm$ 7,7	369,5 $\pm$ 24,8
50/50	105,4 $\pm$ 8,4	199,8 $\pm$ 14,1

Описанные изменения механических характеристик можно объяснить влиянием двух факторов. Первый - изменение морфологии полученных материалов с ростом концентрации поливинилпирролидона (снижение среднего диаметра волокон и изменение распределения диаметра волокон с бимодального к одномодальному). Вторым фактором, который может влиять на механические характеристики полученных материалов, являются возможные взаимодействия между макромолекулами поли(ϵ -капролактона) и поливинилпирролидона. С целью обнаружения подобных взаимодействий, нами получены ИК-спектры материалов (Рисунок 29).

На ИК-спектрах полученных материалов с увеличением концентрации поливинилпирролидона наблюдалось увеличение интенсивности характеристической полосы поглощения, соответствующей валентным колебаниям связи C=O (1665 см⁻¹) (Рисунок 29). В то же время, снижалась интенсивность полосы поглощения валентным колебаниям связи C=O (1721 см⁻¹), соответствующая кристаллическим участкам поли(ϵ -капролактона). Более того,

для перечисленных полос наблюдались сдвиги в сторону больших (для поли(ϵ -капролактона)) и меньших (для поливинилпирролидона) волновых чисел.

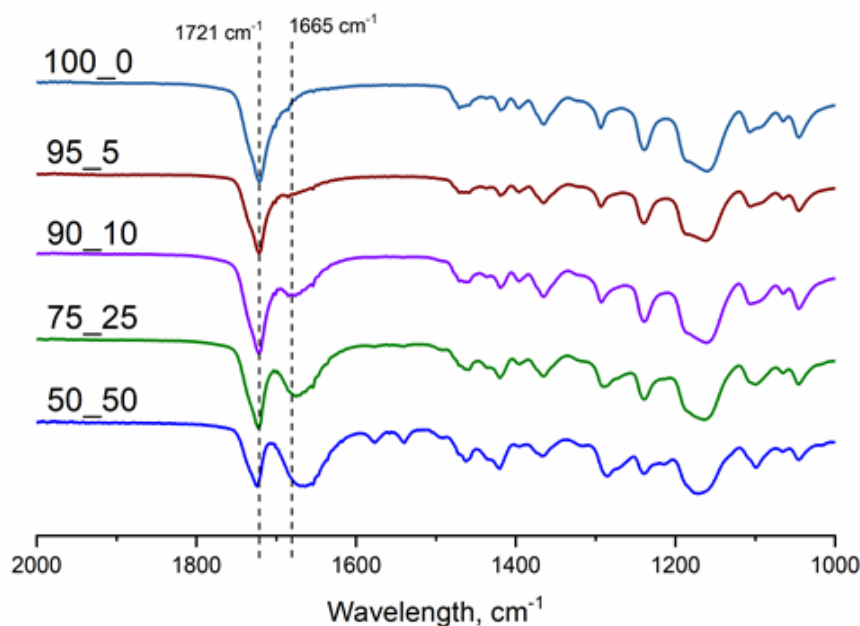


Рисунок 29 – ИК-спектры полученных материалов с различным соотношением поли(ϵ -капролактона) и поливинилпирролидона.

С учетом данных наблюдений, можно говорить о наличии слабых (например, Ван дер Ваальсовых) взаимодействий между молекулами полимера, низкой степени кристалличности полученных материалов и низкой совместимости поли(ϵ -капролактона) и поливинилпирролидона. Изменения механических свойств полученных материалов (упрочнение с увеличением концентрации поливинилпирролидона) можно связать с данными заключениями.

4.5.2 Изучение стабильности полученных материалов в водной среде

При изучении динамики выхода поливинилпирролидона из полученных материалов, наблюдалась явная зависимость количества вышедшего полимера от его концентрации в материале (Рисунок 30).

В случае материалов с высоким содержанием поливинилпирролидона (25 и 50 % масс.) наблюдалась стадия “burst” релиза поливинилпирролидона (например,

80% поливинилпирролидона из скаффолда с содержанием поливинилпирролидона 50% вышло в первые 30 минут). За исключением материала с содержанием поливинилпирролидона 5%, после суток выдерживания в фосфатном буфере концентрация оставшегося водорастворимого полимера находилась на приблизительно одном уровне.

При выдерживании полученных материалов в фосфатном буфере в течение недели, также была обнаружена зависимость между концентрацией поливинилпирролидона и изменениями морфологии скаффолдов (Рисунок 31).

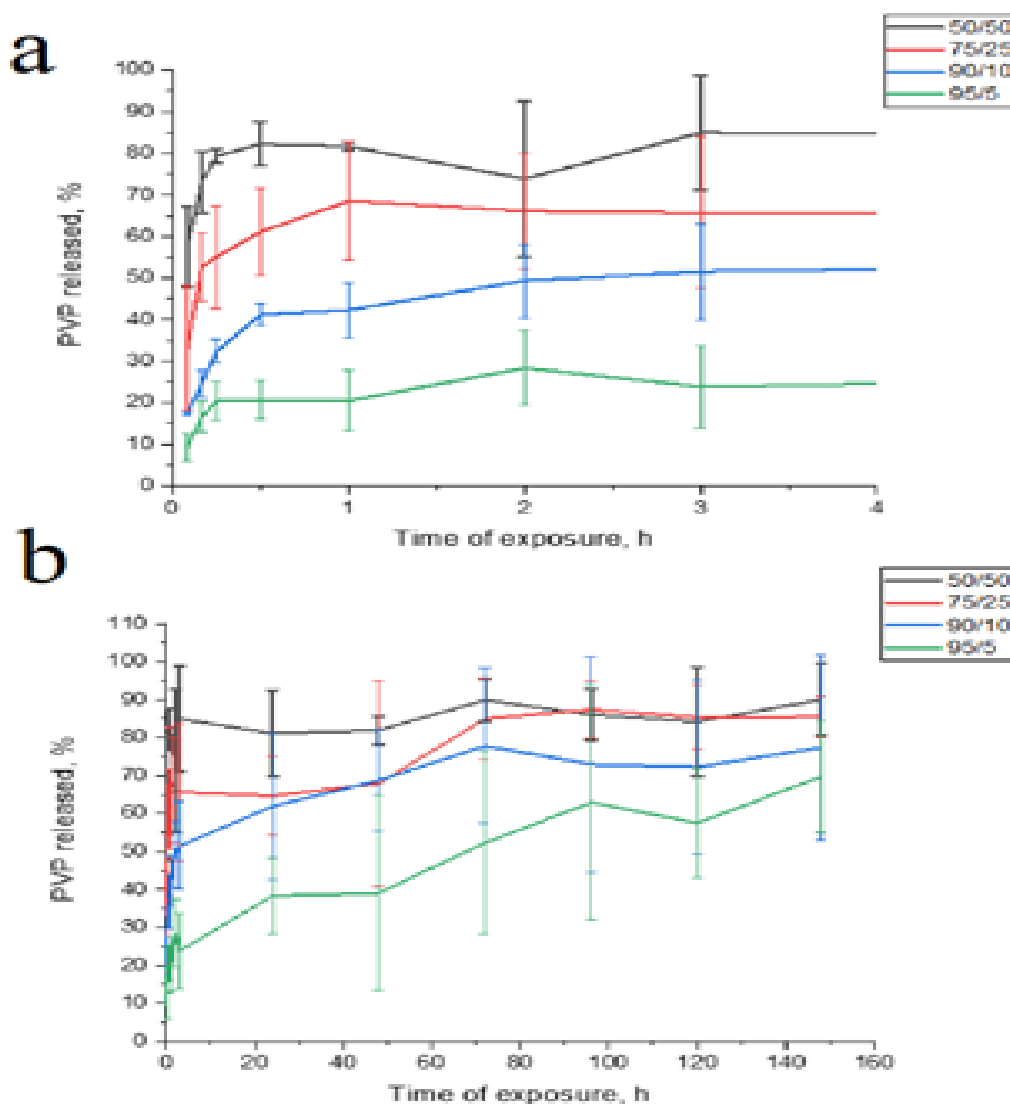


Рисунок 30 – Динамика выхода поливинилпирролидона из материалов с различным соотношением поли(ε-капролактона) и поливинилпирролидона: а – в течение первых 4 часов, б – в течение недели

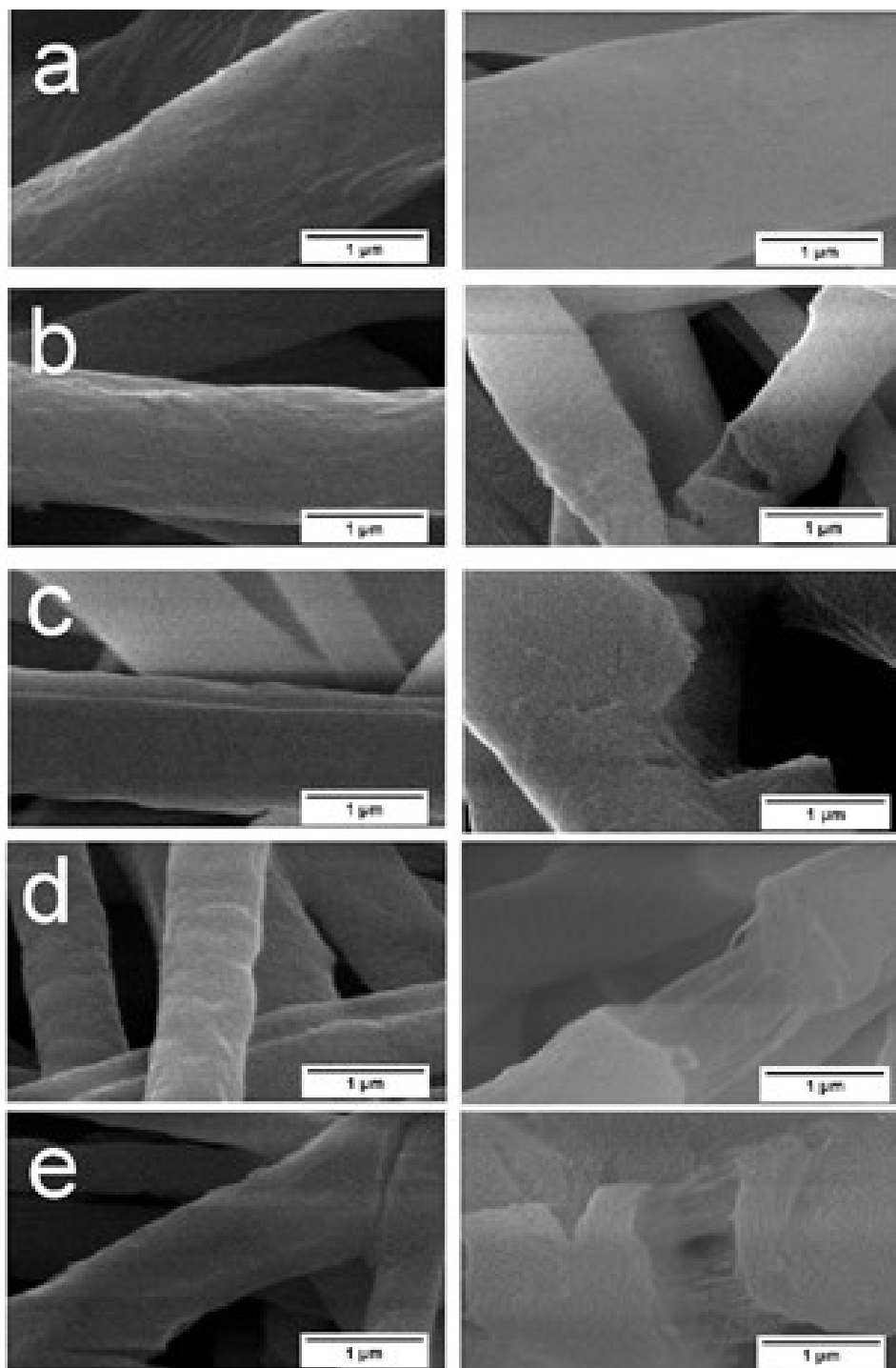


Рисунок 31 – СЭМ изображения материалов с различным соотношением поли(ε-капролактона) и поливинилпирролидона до и после выдерживания в фосфатном буфере в течение недели: а-е - 100/0, 95/5, 90/10, 75/25 и 50/50, соответственно.

Для скаффолда из чистого поли(ε-капролактона) значительных изменений морфологии обнаружено не было. В то же время, с увеличением концентрации поливинилпирролидона обнаружено образование множественных дефектов, таких

как поры и трещины. Таким образом, наблюдаемые дефекты образовались в связи с растворением поливинилпирролидона из волокон материалов.

4.6 Исследование биосовместимости скаффолдов на основе поли(ε-капролактона) и поливинилпирролидона

4.6.1 Клеточные исследования *in vitro*

При изучении адгезии клеток HeLa на полученных материалах, наблюдалась тенденция к увеличению количества адгезированных клеток. Однако, несмотря на очевидно лучшую смачиваемость материалов с добавлением поливинилпирролидона, при сокультивировании полученных материалов с клетками HeLa, статистически значимых отличий в количестве адгезированных клеток при сравнении с контрольным образцом обнаружено не было (Таблица 15).

Таблица 15 – Количество адгезированных клеток HeLa на поверхности материалов после 24 часов сокультивирования.

Соотношение поли(ε-капролактона) и поливинилпирролидона	Краевой угол смачивания до 24 часов в водной среде, °	Краевой угол смачивания после 24 часов в водной среде, °	Количество адгезированных клеток, клеток/мм ²
100/0	124,7±0,5	121,9±1,2	1459±824
95/5	0	118,5±0,7	2112±736
90/10	0	118,1±1,1	2126±973
75/25	0	109,5±1,8	2999±1002
50/50	0	73,5±1,6	2230±545

Одним из ключевых свойств, определяющих адгезию клеток к поверхности,

является её гидрофильность. Все полученные материалы, содержащие поливинилпирролидон, обладали супергидрофильностью и капля воды полностью растекалась по их поверхности. С другой стороны, после выдерживания полученных материалов они теряли свои гидрофильные свойства (или они ухудшались) за счет вымывания поливинилпирролидона. Сниженная гидрофильность поверхности и могла стать фактором, препятствующим адгезии клеток.

4.6.2 Краткие выводы по главе 4

Благодаря подбору общего растворителя, методом электроспиннинга впервые получены волокнистые скаффолды на основе поли(ϵ -капролактона) и L-аргинина.

Показано, что концентрация L-аргинина в прядильном растворе в значительной степени влияет на морфологию полученных материалов. По результатам экспериментов по формованию скаффолдов в одном режиме, обнаружено, что рост концентрации L-аргинина в сухом веществе с 0 до 7 % масс. ведёт к снижению среднего диаметра волокон на 25% и изменению распределения диаметра волокон с бимодального с одномодальному.

Концентрация L-аргинина неоднозначный эффект на механические свойства L-аргинина. Так, максимальная нагрузка и модуль Юнга увеличивались с ростом концентрации L-аргинина, а максимальное растяжение - снижалось для материалов с содержанием L-аргинина от 0 до 0,5 % масс. и увеличивалось при концентрациях от 0,5% до 7% масс.

Несмотря на крайне гидрофильную природу L-аргинина, его концентрация не оказала статистически значимого влияния на краевой угол смачивания. При этом, концентрация L-аргинина оказывала непосредственное влияние на биосовместимость полученных материалов. Так, наилучшей биосовместимостью по таким параметрам, как среднее количество адгезированных клеток и доля жизнеспособных клеток обладали скаффолды с концентрацией L-аргинина от 0,5

до 1 % масс.

Для получения волокнистых скаффолдов на основе поли(ϵ -капролактона) и поливинилпирролидона в качестве общего растворителя впервые использован гексафторизопропанол. Данные материалы впервые получены при одном режиме электроформования, что позволило исследовать влияние соотношения полимеров в прядильном растворе на их морфологические, механические и биологические свойства, а также стабильность в водной среде.

Показано, что рост концентрации поливинилпирролидона в прядильном растворе ведет к снижению среднего диаметра волокон и сужению распределения диаметров волокон полученных материалов, что связано со снижением вязкости прядильного раствора.

Также, уже при концентрации поливинилпирролидона 5 % масс. полученные материалы оказались супергидрофильны, краевой угол смачивания составил 0° (против $124,7 \pm 0,5$ у скаффолда из чистого поли(ϵ -капролактона)). В то же время, при выдерживании в водной среде в течение 1 суток, поливинилпирролидон частично вымывался, что привело к возвращению скаффолдам гидрофобности.

Рост концентрации поливинилпирролидона также вёл к упрочнению материалов. Так, модуль Юнга и максимальное удлинение материала из чистого поли(ϵ -капролактона) составили $17,4 \pm 0,4$ МПа и $1038,7 \pm 36,5$ %, соответственно, тогда как для композитного материала с соотношением полимеров 50/50 - $105,4 \pm 8,4$ МПа и $199,8 \pm 14,1$ %.

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ

1. Состав смеси «хороший/плохой растворитель» впервые подобран для модифицирования волокнистых скаффолдов на основе поли(молочной кислоты) и поли(ε-капролактона). С использованием смеси подобранного состава на поверхность скаффолдов нанесен иод и желатин с целью придания им антибактериальных свойств и высокой биосовместимости, соответственно.

2. Использование 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропанола в качестве общего растворителя позволило впервые получить композитные материалы на основе поли(ε-капролактона) и L-аргинина. Добавление L-аргинина в прядильный раствор оказало существенный эффект на морфологию полученных материалов, а именно – с увеличением концентрации L-аргинина средний диаметр волокон полученных материалов снижался, а распределение диаметра – менялось с бимодального на одномодальное. Установлено влияние количества введенного L-аргинина на прочностные свойства полученных материалов и биосовместимость по отношению к мультипотентным мезенхимальным стволовым клеткам.

3. Впервые 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропанол использован в качестве общего растворителя для получения композитных скаффолдов на основе поли(ε-капролактона) и поливинилпирролидона. Изучено влияние соотношения полимеров в прядильном растворе на ключевые физико-химические и биологические свойства материалов при получении в одном режиме электроформования. Использование 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропанола в качестве общего растворителя позволило достичь лучшей гидрофильности полученных материалов (краевой угол смачивания составил 0° уже при содержании поливинилпирролидона 5 масс. %) и лучших прочностных характеристик.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen S. Electrospinning: An enabling nanotechnology platform for drug delivery and regenerative medicine / Chen S., Li R., Li X., Xie J. // *Advanced Drug Delivery Reviews* – 2018. – Т. 132 – С.188–213.
2. Petlin D.G. A fiber distribution model for predicting drug release rates / Petlin D.G., Amarah A.A., Tverdokhlebov S.I., Anissimov Y.G. // *Journal of Controlled Release* – 2017. – Т. 258 – С.218–225.
3. Kuang G. Biphasic drug release from electrospun polyblend nanofibers for optimized local cancer treatment / Kuang G., Zhang Z., Liu S., Zhou D., Lu X., Jing X., Huang Y. // *Biomaterials Science* – 2018. – Т. 6 – № 2 – С.324–331.
4. Goodman A.M. Near-infrared remotely triggered drug-release strategies for cancer treatment / Goodman A.M., Neumann O., Nørregaard K., Henderson L., Choi M.-R., Clare S.E., Halas N.J. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2017. – Т. 114 – № 47 – С.12419–12424.
5. Yohe S.T. Triggered Drug Release from Superhydrophobic Meshes using High-Intensity Focused Ultrasound / Yohe S.T., Kopechek J.A., Porter T.M., Colson Y.L., Grinstaff M.W. // *Advanced Healthcare Materials* – 2013. – Т. 2 – № 9 – С.1204–1208.
6. Liu M. Internal stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery: Design strategies and applications / Liu M., Du H., Zhang W., Zhai G. // *Materials Science and Engineering: C* – 2017. – Т. 71 – С.1267–1280.
7. Chen M. Electrospun Nanofibers-Mediated On-Demand Drug Release / Chen M., Li Y.-F., Besenbacher F. // *Advanced Healthcare Materials* – 2014. – Т. 3 – № 11 – С.1721–1732.
8. Jiang J. Mussel-inspired protein-mediated surface functionalization of electrospun nanofibers for pH-responsive drug delivery / Jiang J., Xie J., Ma B., Bartlett D.E., Xu A., Wang C.-H. // *Acta Biomaterialia* – 2014. – Т. 10 – № 3 – С.1324–1332.
9. Falde E.J. Layered superhydrophobic meshes for controlled drug release / Falde E.J., Freedman J.D., Herrera V.L.M., Yohe S.T., Colson Y.L., Grinstaff M.W. // *Journal of Controlled Release* – 2015. – Т. 214 – С.23–29.

10. Hayrapetyan A. Signaling Pathways Involved in Osteogenesis and Their Application for Bone Regenerative Medicine / Hayrapetyan A., Jansen J.A., Beucken J.J.J.P. van den // *Tissue Engineering Part B: Reviews* – 2015. – T. 21 – № 1 – C.75–87.
11. Hinderer S. ECM and ECM-like materials — Biomaterials for applications in regenerative medicine and cancer therapy / Hinderer S., Layland S.L., Schenke-Layland K. // *Advanced Drug Delivery Reviews* – 2016. – T. 97 – C.260–269.
12. Zhang Y. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds / Zhang Y., Ouyang H., Lim C.T., Ramakrishna S., Huang Z.-M. // *Journal of Biomedical Materials Research* – 2005. – T. 72B – № 1 – C.156–165.
13. Fu L. Three-dimensional nanofiber scaffolds with arrayed holes for engineering skin tissue constructs / Fu L., Xie J., Carlson M.A., Reilly D.A. // *MRS Communications* – 2017. – T. 7 – № 3 – C.361–366.
14. Chen W. Superabsorbent 3D Scaffold Based on Electrospun Nanofibers for Cartilage Tissue Engineering / Chen W., Chen S., Morsi Y., El-Hamshary H., El-Newhy M., Fan C., Mo X. // *ACS Applied Materials & Interfaces* – 2016. – T. 8 – № 37 – C.24415–24425.
15. Malikmammadov E. PCL and PCL-based materials in biomedical applications / Malikmammadov E., Tanir T.E., Kiziltay A., Hasirci V., Hasirci N. // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* – 2018. – T. 29 – № 7–9 – C.863–893.
16. Hoskins J.N. Synthesis and Degradation Behavior of Cyclic Poly(ϵ -caprolactone) / Hoskins J.N., Grayson S.M. // *Macromolecules* – 2009. – T. 42 – № 17 – C.6406–6413.
17. Woodruff M.A. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century / Woodruff M.A., Hutmacher D.W. // *Progress in Polymer Science* – 2010. – T. 35 – № 10 – C.1217–1256.
18. Feng S. Study on the condensed state physics of poly(ϵ -caprolactone) nano-aggregates in aqueous dispersions / Feng S., Chen Y., Meng C., Mai B., Wu Q., Gao H., Liang G., Zhu F. // *Journal of Colloid and Interface Science* – 2015. – T. 450 – C.264–271.
19. Schäler K. Dynamics in Crystallites of Poly(ϵ -caprolactone) As Investigated by

- Solid-State NMR / Schäler K., Achilles A., Bärenwald R., Hackel C., Saalwächter K. // *Macromolecules* – 2013. – T. 46 – № 19 – C.7818–7825.
20. Díaz E. In Vitro Degradation of Poly(caprolactone)/nHA Composites / Díaz E., Sandonis I., Valle M.B. // *Journal of Nanomaterials* – 2014. – T. 2014 – C.1–8.
21. Gleadall A. Degradation mechanisms of bioresorbable polyesters. Part 2. Effects of initial molecular weight and residual monomer / Gleadall A., Pan J., Kruff M.-A., Kellomäki M. // *Acta Biomaterialia* – 2014. – T. 10 – № 5 – C.2233–2240.
22. Eshraghi S. Mechanical and microstructural properties of polycaprolactone scaffolds with one-dimensional, two-dimensional, and three-dimensional orthogonally oriented porous architectures produced by selective laser sintering / Eshraghi S., Das S. // *Acta Biomaterialia* – 2010. – T. 6 – № 7 – C.2467–2476.
23. Wang X. Drug distribution within poly(ϵ -caprolactone) microspheres and in vitro release / Wang X., Wang Y., Wei K., Zhao N., Zhang S., Chen J. // *Journal of Materials Processing Technology* – 2009. – T. 209 – № 1 – C.348–354.
24. Middleton J.C. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices / Middleton J.C., Tipton A.J. // *Biomaterials* – 2000. – T. 21 – № 23 – C.2335–2346.
25. P. Pawar R. Biomedical Applications of Poly(Lactic Acid) / P. Pawar R., U. Tekale S., U. Shisodia S., T. Totre J., J. Domb A. // *Recent Patents on Regenerative Medicine* – 2014. – T. 4 – № 1 – C.40–51.
26. Griffith L.G. Polymeric biomaterials / Griffith L.G. // *Acta Materialia* – 2000. – T. 48 – № 1 – C.263–277.
27. Lim L.-T. Processing technologies for poly(lactic acid) / Lim L.-T., Auras R., Rubino M. // *Progress in Polymer Science* – 2008. – T. 33 – № 8 – C.820–852.
28. Perego G. Effect of molecular weight and crystallinity on poly(lactic acid) mechanical properties / Perego G., Cella G.D., Bastioli C. // *Journal of Applied Polymer Science* – 1996. – T. 59 – № 1 – C.37–43.
29. Davachi S.M. Polylactic Acid in Medicine / Davachi S.M., Kaffashi B. // *Polymer-Plastics Technology and Engineering* – 2015. – T. 54 – № 9 – C.944–967.
30. Gunatillake P. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering / Gunatillake P. // *European Cells and Materials* – 2003. – T. 5 – C.1–16.

31. Li W.-J. Fabrication and Application of Nanofibrous Scaffolds in Tissue Engineering / Li W.-J., Tuan R.S. // *Current Protocols in Cell Biology* – 2009. – T. 42 – № 1 – C.25.2.1-25.2.12.
32. Doshi J. Electrospinning process and applications of electrospun fibers / Doshi J., Reneker D.H. // *Journal of Electrostatics* – 1995. – T. 35 – № 2–3 – C.151–160.
33. Teo W.E. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. / Teo W.E., Ramakrishna S. // *Nanotechnology* – 2006. – T. 17 – № 14 – C.R89–R106.
34. Supaphol P. Ultrafine Electrospun Polyamide-6 Fibers: Effects of Solvent System and Emitting Electrode Polarity on Morphology and Average Fiber Diameter / Supaphol P., Mit-uppatham C., Nithitanakul M. // *Macromolecular Materials and Engineering* – 2005. – T. 290 – № 9 – C.933–942.
35. Tan S.-H. Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process / Tan S.-H., Inai R., Kotaki M., Ramakrishna S. // *Polymer* – 2005. – T. 46 – № 16 – C.6128–6134.
36. Theron S.A. Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polymer solutions / Theron S.A., Zussman E., Yarin A.L. // *Polymer* – 2004. – T. 45 – № 6 – C.2017–2030.
37. Badrossamay M.R. Nanofiber Assembly by Rotary Jet-Spinning / Badrossamay M.R., McIlwee H.A., Goss J.A., Parker K.K. // *Nano Letters* – 2010. – T. 10 – № 6 – C.2257–2261.
38. Shanmuganathan K. Solventless High Throughput Manufacturing of Poly(butylene terephthalate) Nanofibers / Shanmuganathan K., Fang Y., Chou D.Y., Sparks S., Hibbert J., Ellison C.J. // *ACS Macro Letters* – 2012. – T. 1 – № 8 – C.960–964.
39. Mellado P. A simple model for nanofiber formation by rotary jet-spinning / Mellado P., McIlwee H.A., Badrossamay M.R., Goss J.A., Mahadevan L., Kit Parker K. // *Applied Physics Letters* – 2011. – T. 99 – № 20 – C.203107.
40. Mîndru T.B. Morphological aspects of polymer fiber mats obtained by air flow rotary-jet spinning / Mîndru T.B., Ignat L., Mîndru I.B., Pinteala M. // *Fibers and Polymers* – 2013. – T. 14 – № 9 – C.1526–1534.

41. Rogalski J.J. Rotary jet spinning review – a potential high yield future for polymer nanofibers / Rogalski J.J., Bastiaansen C.W.M., Peijs T. // *Nanocomposites* – 2017. – T. 3 – № 4 – C.97–121.
42. Tutak W. The support of bone marrow stromal cell differentiation by airbrushed nanofiber scaffolds / Tutak W., Sarkar S., Lin-Gibson S., Farooque T.M., Jyotsnendu G., Wang D., Kohn J., Bolikal D., Simon C.G. // *Biomaterials* – 2013. – T. 34 – № 10 – C.2389–2398.
43. Daristotle J.L. A Review of the Fundamental Principles and Applications of Solution Blow Spinning / Daristotle J.L., Behrens A.M., Sandler A.D., Kofinas P. // *ACS Applied Materials & Interfaces* – 2016. – T. 8 – № 51 – C.34951–34963.
44. Polat Y. Solution blowing of thermoplastic polyurethane nanofibers: A facile method to produce flexible porous materials / Polat Y., Pampal E.S., Stojanovska E., Simsek R., Hassanin A., Kilic A., Demir A., Yilmaz S. // *Journal of Applied Polymer Science* – 2016. – T. 133 – № 9 – C.n/a-n/a.
45. Wade R.J. Advances in nanofibrous scaffolds for biomedical applications: From electrospinning to self-assembly / Wade R.J., Burdick J.A. // *Nano Today* – 2014. – T. 9 – № 6 – C.722–742.
46. Ma P.X. Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix / Ma P.X., Zhang R. // *Journal of Biomedical Materials Research* – 1999. – T. 46 – № 1 – C.60–72.
47. Norman J.J. Methods for Fabrication of Nanoscale Topography for Tissue Engineering Scaffolds / Norman J.J., Desai T.A. // *Annals of Biomedical Engineering* – 2006. – T. 34 – № 1 – C.89–101.
48. Stojanovska E. A review on non-electro nanofibre spinning techniques / Stojanovska E., Canbay E., Pampal E.S., Calisir M.D., Agha O., Polat Y., Simsek R., Gundogdu N.A.S., Akgul Y., Kilic A. // *RSC Advances* – 2016. – T. 6 – № 87 – C.83783–83801.
49. Wang J. Suspended Micro/Nanofiber Hierarchical Biological Scaffolds Fabricated Using Non-Electrospinning STEP Technique / Wang J., Nain A.S. // *Langmuir* – 2014. – T. 30 – № 45 – C.13641–13649.
50. Nain A.S. Control of Cell Behavior by Aligned Micro/Nanofibrous Biomaterial

Scaffolds Fabricated by Spinneret-Based Tunable Engineered Parameters (STEP) Technique / Nain A.S., Phillippi J.A., Sitti M., MacKrell J., Campbell P.G., Amon C. // Small – 2008. – T. 4 – № 8 – C.1153–1159.

51. Duque Sánchez L. Surface modification of electrospun fibres for biomedical applications: A focus on radical polymerization methods / Duque Sánchez L., Brack N., Postma A., Pigram P.J., Meagher L. // Biomaterials – 2016. – T. 106 – C.24–45.

52. Cools P. Non-thermal Plasma Technology for the Improvement of Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine - A Review InTech, 2016.

53. Croll T.I. Controllable Surface Modification of Poly(lactic- c o -glycolic acid) (PLGA) by Hydrolysis or Aminolysis I: Physical, Chemical, and Theoretical Aspects / Croll T.I., O'Connor A.J., Stevens G.W., Cooper-White J.J. // Biomacromolecules – 2004. – T. 5 – № 2 – C.463–473.

54. Dolci L.S. Carboxyl Surface Functionalization of Poly(L -lactic acid) Electrospun Nanofibers through Atmospheric Non-Thermal Plasma Affects Fibroblast Morphology / Dolci L.S., Quiroga S.D., Gherardi M., Laurita R., Liguori A., Sanibondi P., Fiorani A., Calzà L., Colombo V., Focarete M.L. // Plasma Processes and Polymers – 2014. – T. 11 – № 3 – C.203–213.

55. Liu W. Effects of plasma treatment to nanofibers on initial cell adhesion and cell morphology / Liu W., Zhan J., Su Y., Wu T., Wu C., Ramakrishna S., Mo X., Al-Deyab S.S., El-Newehy M. // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces – 2014. – T. 113 – C.101–106.

56. Sankar D. Surface Plasma Treatment of Poly(caprolactone) Micro, Nano, and Multiscale Fibrous Scaffolds for Enhanced Osteoconductivity / Sankar D., Shalumon K.T., Chennazhi K.P., Menon D., Jayakumar R. // Tissue Engineering Part A – 2014. – T. 20 – № 11–12 – C.1689–1702.

57. Prabhakaran M.P. Surface modified electrospun nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering / Prabhakaran M.P., Venugopal J., Chan C.K., Ramakrishna S. // Nanotechnology – 2008. – T. 19 – № 45 – C.455102.

58. Kudryavtseva V. Atmospheric pressure plasma assisted immobilization of hyaluronic acid on tissue engineering PLA-based scaffolds and its effect on primary

- human macrophages / Kudryavtseva V., Stankevich K., Gudima A., Kibler E., Zhukov Y., Bolbasov E., Malashicheva A., Zhuravlev M., Riabov V., Liu T., Filimonov V., Remnev G., Klüter H., Kzhyshkowska J., Tverdokhlebov S. // *Materials & Design* – 2017. – T. 127 – C.261–271.
59. Wang X. Integrated antifouling and bactericidal polymer membranes through bioinspired polydopamine/poly(N-vinyl pyrrolidone) coating / Wang X., Yuan S., Shi D., Yang Y., Jiang T., Yan S., Shi H., Luan S., Yin J. // *Applied Surface Science* – 2016. – T. 375 – C.9–18.
60. Nielsen S.R. Mussel inspired surface functionalization of electrospun nanofibers for bio-applications / Nielsen S.R., Besenbacher F., Chen M. // *Physical Chemistry Chemical Physics* – 2013. – T. 15 – № 40 – C.17029.
61. Ku S.H. Human endothelial cell growth on mussel-inspired nanofiber scaffold for vascular tissue engineering / Ku S.H., Park C.B. // *Biomaterials* – 2010. – T. 31 – № 36 – C.9431–9437.
62. Wei S. Osteoinductive peptide-functionalized nanofibers with highly ordered structure as biomimetic scaffolds for bone tissue engineering / Wei S., Gao X., Zhang X., Song J., Xu X., Xu A., Wang M., Xie B., Huang E., Deng F. // *International Journal of Nanomedicine* – 2015. – C.7109.
63. Yoo H.S. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery / Yoo H.S., Kim T.G., Park T.G. // *Advanced Drug Delivery Reviews* – 2009. – T. 61 – № 12 – C.1033–1042.
64. Quinn A. Polyelectrolyte Blend Multilayers: A Versatile Route to Engineering Interfaces and Films / Quinn A., Such G.K., Quinn J.F., Caruso F. // *Advanced Functional Materials* – 2008. – T. 18 – № 1 – C.17–26.
65. He L. Surface Modification of PLLA Nano-scaffolds with Laminin Multilayer by LbL Assembly for Enhancing Neurite Outgrowth / He L., Tang S., Prabhakaran M.P., Liao S., Tian L., Zhang Y., Xue W., Ramakrishna S. // *Macromolecular Bioscience* – 2013. – T. 13 – № 11 – C.1601–1609.
66. Khorshidi S. A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications / Khorshidi S., Solouk A., Mirzadeh H., Mazinani S., Lagaron

- J.M., Sharifi S., Ramakrishna S. // *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* – 2016. – T. 10 – № 9 – C.715–738.
67. Gao X. Progress in electrospun composite nanofibers: composition, performance and applications for tissue engineering / Gao X., Han S., Zhang R., Liu G., Wu J. // *Journal of Materials Chemistry B* – 2019. – T. 7 – № 45 – C.7075–7089.
68. Aghdam R.M. Investigating the effect of PGA on physical and mechanical properties of electrospun PCL/PGA blend nanofibers / Aghdam R.M., Najarian S., Shakhesi S., Khanlari S., Shaabani K., Sharifi S. // *Journal of Applied Polymer Science* – 2012. – T. 124 – № 1 – C.123–131.
69. Gristina A. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration / Gristina A. // *Science* – 1987. – T. 237 – № 4822 – C.1588–1595.
70. *Polymeric Materials with Antimicrobial Activity* // под ред. A. Muñoz-Bonilla, M. Cerrada, M. Fernández-García. – Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2013.
71. Shirai T. Antibacterial iodine-supported titanium implants / Shirai T., Shimizu T., Ohtani K., Zen Y., Takaya M., Tsuchiya H. // *Acta Biomaterialia* – 2011. – T. 7 – № 4 – C.1928–1933.
72. Singhal J.P. Antibacterial Multifilament Nylon Sutures / Singhal J.P., Singh J., Ray A.R., Singh H., Rattan A. // *Biomaterials, Artificial Cells and Immobilization Biotechnology* – 1991. – T. 19 – № 3 – C.631–648.
73. Xu X. Biodegradable electrospun poly(l-lactide) fibers containing antibacterial silver nanoparticles / Xu X., Yang Q., Wang Y., Yu H., Chen X., Jing X. // *European Polymer Journal* – 2006. – T. 42 – № 9 – C.2081–2087.
74. Zarekhalili Z. Fabrication and characterization of PVA/Gum tragacanth/PCL hybrid nanofibrous scaffolds for skin substitutes / Zarekhalili Z., Bahrami S.H., Ranjbar-Mohammadi M., Milan P.B. // *International Journal of Biological Macromolecules* – 2017. – T. 94 – C.679–690.
75. Santoro M. Poly(lactic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering / Santoro M., Shah S.R., Walker J.L., Mikos A.G. // *Advanced Drug Delivery Reviews* – 2016. – T. 107 – C.206–212.
76. Chen L. Functional polymer surfaces for controlling cell behaviors / Chen L.,

- Yan C., Zheng Z. // *Materials Today* – 2018. – T. 21 – № 1 – C.38–59.
77. Rasal R.M. Poly(lactic acid) modifications / Rasal R.M., Janorkar A. V., Hirt D.E. // *Progress in Polymer Science (Oxford)* – 2010. – T. 35 – № 3 – C.338–356.
78. Aldana A.A. Current advances in electrospun gelatin-based scaffolds for tissue engineering applications / Aldana A.A., Abraham G.A. // *International Journal of Pharmaceutics* – 2017. – T. 523 – № 2 – C.441–453.
79. Sagitha P. Recent advances in post-modification strategies of polymeric electrospun membranes / Sagitha P., Reshmi C.R., Sundaran S.P., Sujith A. // *European Polymer Journal* – 2018. – T. 105 – C.227–249.
80. Gu S.-Y. Electrospinning of gelatin and gelatin/poly(l-lactide) blend and its characteristics for wound dressing / Gu S.-Y., Wang Z.-M., Ren J., Zhang C.-Y. // *Materials Science and Engineering: C* – 2009. – T. 29 – № 6 – C.1822–1828.
81. Binan L. Differentiation of neuronal stem cells into motor neurons using electrospun poly-l-lactic acid/gelatin scaffold / Binan L., Tendey C., Crescenzo G. De, Ayoubi R. El, Ajji A., Jolicoeur M. // *Biomaterials* – 2014. – T. 35 – № 2 – C.664–674.
82. Torricelli P. Co-electrospun gelatin-poly(l-lactic acid) scaffolds: Modulation of mechanical properties and chondrocyte response as a function of composition / Torricelli P., Gioffrè M., Fiorani A., Panzavolta S., Gualandi C., Fini M., Focarete M.L., Bigi A. // *Materials Science and Engineering: C* – 2014. – T. 36 – C.130–138.
83. Cui W. In Situ Growth Kinetics of Hydroxyapatite on Electrospun Poly(dl - lactide) Fibers with Gelatin Grafted / Cui W., Li X., Chen J., Zhou S., Weng J. // *Crystal Growth & Design* – 2008. – T. 8 – № 12 – C.4576–4582.
84. Chen J.-P. Surface modification of electrospun PLLA nanofibers by plasma treatment and cationized gelatin immobilization for cartilage tissue engineering / Chen J.-P., Su C.-H. // *Acta Biomaterialia* – 2011. – T. 7 – № 1 – C.234–243.
85. Johnson R. Coaxially-structured fibres with tailored material properties for vascular graft implant / Johnson R., Ding Y., Nagiah N., Monnet E., Tan W. // *Materials Science and Engineering: C* – 2019. – T. 97 – C.1–11.
86. Park S. Fabrication of strong, bioactive vascular grafts with PCL/collagen and PCL/silica bilayers for small-diameter vascular applications / Park S., Kim J., Lee M.-

- K., Park C., Jung H.-D., Kim H.-E., Jang T.-S. // *Materials & Design* – 2019. – T. 181 – C.108079.
87. Kumar V.A. Tissue Engineering of Blood Vessels: Functional Requirements, Progress, and Future Challenges / Kumar V.A., Brewster L.P., Caves J.M., Chaikof E.L. // *Cardiovascular Engineering and Technology* – 2011. – T. 2 – C.137–148.
88. Dusse L.M.S. Revisão sobre óxido nítrico / Dusse L.M.S., Vieira L.M., Carvalho M. das G. // *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* – 2003. – T. 39 – № 4.
89. Sun J. Polydopamine-assisted immobilization of arginine molecules to improve hemocompatibility / Sun J., Fu T., Sun J., Wu F., Liu Y. // *Surface and Interface Analysis* – 2016. – T. 48 – № 9 – C.1007–1011.
90. Bala Balakrishnan P. Star poly(ϵ -caprolactone)-based electrospun fibers as biocompatible scaffold for doxorubicin with prolonged drug release activity / Bala Balakrishnan P., Gardella L., Forouharshad M., Pellegrino T., Monticelli O. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* – 2018. – T. 161 – C.488–496.
91. Lin W.-C. Electrospun Poly(ϵ -caprolactone) Nanofibrous Mesh for Imiquimod Delivery in Melanoma Therapy / Lin W.-C., Yeh I.-T., Niyama E., Huang W.-R., Ebara M., Wu C.-S. // *Polymers* – 2018. – T. 10 – № 3 – C.231.
92. Hu J. Drug-loaded emulsion electrospun nanofibers: characterization, drug release and in vitro biocompatibility / Hu J., Prabhakaran M.P., Tian L., Ding X., Ramakrishna S. // *RSC Advances* – 2015. – T. 5 – № 121 – C.100256–100267.
93. Ji W. Bioactive Electrospun Scaffolds Delivering Growth Factors and Genes for Tissue Engineering Applications / Ji W., Sun Y., Yang F., Beucken J.J.J.P. van den, Fan M., Chen Z., Jansen J.A. // *Pharmaceutical Research* – 2011. – T. 28 – № 6 – C.1259–1272.
94. Stankevich K.S. Poly(ϵ -caprolactone) Scaffolds Doped with c-Jun N-terminal Kinase Inhibitors Modulate Phagocyte Activation / Stankevich K.S., Schepetkin I.A., Goreninskii S.I., Lavrinenko A.K., Bolbasov E.N., Kovrizhina A.R., Kirpotina L.N., Filimonov V.D., Khlebnikov A.I., Tverdokhlebov S.I., Quinn M.T. // *ACS Biomaterials Science & Engineering* – 2019. – T. 5 – № 11 – C. 5990–5999.

95. Smith K.L. [37] Membrane systems: Theoretical aspects , 1985. – 495–504c.
96. Petlin D.G. Plasma treatment as an efficient tool for controlled drug release from polymeric materials: A review / Petlin D.G., Tverdokhlebov S.I., Anissimov Y.G. // Journal of Controlled Release – 2017. – T. 266 – C.57–74.
97. Agarwal S. Use of electrospinning technique for biomedical applications / Agarwal S., Wendorff J.H., Greiner A. // Polymer – 2008. – T. 49 – № 26 – C.5603–5621.
98. Chan Park S. Influence of shell compositions of solution blown PVP/PCL core-shell fibers on drug release and cell growth / Chan Park S., Kim M.J., Choi K., Kim J., Choi S.-O. // RSC Advances – 2018. – T. 8 – № 57 – C.32470–32480.
99. Li K. Electrohydrodynamic jet 3D printing of PCL/PVP composite scaffold for cell culture / Li K., Wang D., Zhao K., Song K., Liang J. // Talanta – 2020. – C.120750.
100. Wang J.-C. Preparation of active 3D film patches via aligned fiber electrohydrodynamic (EHD) printing / Wang J.-C., Zheng H., Chang M.-W., Ahmad Z., Li J.-S. // Scientific Reports – 2017. – T. 7 – № 1 – C.43924.
101. Kim G.-M. Electrospinning of PCL/PVP blends for tissue engineering scaffolds / Kim G.-M., Le K.H.T., Giannitelli S.M., Lee Y.J., Rainer A., Trombetta M. // Journal of Materials Science: Materials in Medicine – 2013. – T. 24 – № 6 – C.1425–1442.
102. Suganya S. Herbal drug incorporated antibacterial nanofibrous mat fabricated by electrospinning: An excellent matrix for wound dressings / Suganya S., Senthil Ram T., Lakshmi B.S., Giridev V.R. // Journal of Applied Polymer Science – 2011. – T. 121 – № 5 – C.2893–2899.
103. Jia Y.T. Preparation of PCL/PVP/Ag Nanofiber Membranes by Electrospinning Method / Jia Y.T., Wu C., Dong F.C., Huang G., Zeng X.H. // Applied Mechanics and Materials – 2012. – T. 268–270 – C.580–583.
104. Goreninskii S.I. Fabrication and properties of l -arginine-doped PCL electrospun composite scaffolds / Goreninskii S.I., Bolbasov E.N., Sudarev E.A., Stankevich K.S., Anissimov Y.G., Golovkin A.S., Mishanin A.I., Viknianshchuk A.N., Filimonov V.D., Tverdokhlebov S.I. // Materials Letters – 2018. – T. 214 – C.64–67.
105. Shen F. Hexafluoro-2-propanol as a potent cosolvent for chemical ligation of

membrane proteins / Shen F., Tang S., Liu L. // Science China Chemistry – 2011. – T. 54 – № 1 – C.110–116.

106. Mamangun D.M.D. Orthogonal alignment of DNA using hexafluoroisopropanol as solvent for film castings / Mamangun D.M.D., Santana J.L., Ouchen F., Grote J.G., Sotzing G.A. // RSC Adv. – 2014. – T. 4 – № 75 – C.39798–39801.

ПРИЛОЖЕНИЕ А АКТ ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии
имени академика Г.А. Илизарова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
ФГБУ «НМИЦ ТО имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава России
6, ул. М. Ульяновой, г. Курган, 640014, Россия
Тел. (352 2) 45-47-47, факс (3522) 45-40-60, 45-45-05
E-mail: office@ilizarov.ru, Internet: www.ilizarov.ru

На № _____
от _____

УТВЕРЖДАЮ

И.о. директора ФГБУ «НМИЦ ТО
имени академика Г. А. Илизарова»
Минздрава России

Д.м.н. _____ А.В. Бурцев
«09» октября 2020г.

АКТ

об использовании результатов диссертационной работы «Новые методы
поверхностного и объемного модифицирования материалов на основе
биоразлагаемых полиэфиров для медицинских применений»
Горенинского С.И. в ФГБУ «НМИЦ ТО имени академика
Г. А. Илизарова» Минздрава России

Настоящим, ФГБУ «НМИЦ ТО имени академика Г. А. Илизарова»
Минздрава России подтверждает результаты проведенных совместно с ФГАОУ
ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический
университет» экспериментальных исследований в рамках соглашения № 89 о
стратегическом партнерстве от 21 мая 2018 года.

Целью исследования было повышение биосовместимости волокнистых
скаффолдов на основе полимолочной кислоты, полученных методом
электроформования. Основной задачей исследования было разработка
высокопористых материалов на основе полимолочной кислоты, содержащих в
поверхностном слое желатин, обладающий высокой биосовместимостью и
гидрофильностью

В основе разработанного, при участии Горенинского С.И., способа
модифицирования материалов на основе полимолочной кислоты лежит метод
«хороший/плохой растворитель» – обработка поверхности полимера смесью



Система менеджмента качества сертифицирована на соответствие ISO 9001:2015

органических растворителей (толуола и этанола, 1/9 по объему) с последующим выдерживанием в растворе желатина.

По результатам работы на основе полимолочной кислоты и желатина изготовлены композитные скаффолды, которые использованы в ФГБУ «НМИЦ ТО имени академика Г. А. Илизарова» Минздрава России в экспериментах *in vivo*. Проведенные исследования показали, что разработанные Горенинским С.И. материалы, стимулируют восстановление хрящевых тканей, и перспективны к применению в регенеративной медицине.

Руководитель Клиники нейроортопедии
и системных заболеваний,
д.м.н., профессор РАН,
врач травматолог-ортопед высшей категории



 Попков Д.А.

ПРИЛОЖЕНИЕ В АКТ ВНЕДРЕНИЯ В НАУЧНУЮ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИМЕНИ В. А. АЛМАЗОВА»



197341, Россия, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2
Тел./факс: +7 (812) 702-37-30
e-mail: fmc@almazovcentre.ru

ОГРН 1037804031011 ИНН 7802030429 КПП 781401001

16.10.2020 № 02-05-8416/20
на № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Заместитель генерального директора
по научной работе
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
д.м.н., член-корреспондент РАН
А.О. Конради



АКТ

Внедрения в научную деятельность результатов диссертационной работы
Горенинского С.И. в ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»

Настоящий акт составлен представителями ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России на основании результатов работы, выполненной совместно с Томским политехническим университетом в рамках проекта РФФИ мол_нр 17-33-50099 «Исследование взаимодействия пула эндотелиальных клеток пупочной вены и мезенхимальных стволовых клеток человека с биodeградируемыми волокнистыми скаффолдами на основе полиэфиров с добавлением аминокислот».

Одной из задач исследования было повышение биосовместимости волокнистых скаффолдов на основе поли(ε-капролактона), изготовленных методом электроформования. Задача была решена путем загрузки в материал скаффолдов L-аргинина, являющегося источником оксида азота (II).

Разработанный Горенинским С.И. с соавторами метод формирования материалов на основе поли(ε-капролактона) и L-аргинина основан на использовании 1,1,1,3,3,3-гексапропан-2-ола в качестве общего растворителя для полимера и аминокислоты.

Горенинским С.И. изготовлены нетканые материалы на основе поли(ε-капролактона), содержащие L-аргинин, которые были использованы в экспериментальной практике ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России в исследованиях in vitro. По результатам проведенных клеточных исследований было определено, что оптимальная концентрация L-аргинина находится в диапазоне 0,5-1 масс. %.

Таким образом, по результатам работы были даны рекомендации по использованию волокнистых скаффолдов на основе поли(ε-капролактона) с L-аргинином для разработки сосудистых графтов.

Директор института
молекулярной биологии
и генетики, д.м.н.

Костарева А.А.

Руководитель группы
генно-клеточной инженерии, д.м.н.

Головкин А.С.

ПРИЛОЖЕНИЕ Г АКТ ВНЕДРЕНИЯ В УЧЕБНОМ ПРОЦЕССЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

УТВЕРЖДАЮ

Директор института медицинского
образования ФГБУ «НМИЦ им. В.А.
Алмазова» Минздрава России

 / Е.В. Пармон
« » 2020 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

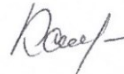
Мы, нижеподписавшиеся, декан лечебного факультета Института медицинского образования, д.м.н., доцент Г.А. Кухарчик, декан факультета биомедицинских наук, д.б.н., О.В. Кулинина, профессор кафедры биологии, д.м.н., А.С. Головкин, подтверждаем, что результаты диссертационной работы Горенинского Семёна Игоревича на тему «Новые методы поверхностного и объемного модифицирования материалов на основе биоразлагаемых полиэфиров для медицинских применений», представленной на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 05.11.17 – «Приборы, системы и изделия медицинского назначения», внедрены и используются по разделу «биологическое тестирование и оценка биосовместимости» в учебном процессе кафедры биологии при изучении дисциплин «Биология развития» и «Иммунология», преподаваемых студентам в рамках специалитета по специальности «Лечебное дело».

Декан лечебного факультета,
д.м.н., доцент



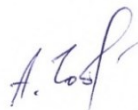
Кухарчик Г.А.

Декан факультета
биомедицинских наук, д.б.н.



Кулинина О.В.

Профессор кафедры
биологии, д.м.н.



Головкин А.С.

ПРИЛОЖЕНИЕ Д ПАТЕНТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2616670

**СПОСОБ НАНЕСЕНИЯ ИОДА И ЕГО СОЕДИНЕНИЙ НА
ПОВЕРХНОСТЬ ИЗДЕЛИЙ ИЗ ПОЛИМОЛОЧНОЙ
КИСЛОТЫ**

Патентообладатель: *федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
"Национальный исследовательский Томский
политехнический университет" (RU)*

Авторы: *Горенинский Семен Игоревич (RU), Станкевич Ксения
Сергеевна (RU), Даниленко Надежда Викторовна (RU),
Филимонов Виктор Дмитриевич (RU), Твердохлебов Сергей
Иванович (RU)*

Заявка № 2015154344

Приоритет изобретения 18 декабря 2015 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 18 апреля 2017 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 18 декабря 2035 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

 Г.П. Ивлиев