

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА PLLA СКАФФОЛДАХ, ОБРАБОТАННЫХ ПЛАЗМОЙ АТМОСФЕРНОГО ДАВЛЕНИЯ

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

kibler.elina@mail.ru

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

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

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

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

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

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

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

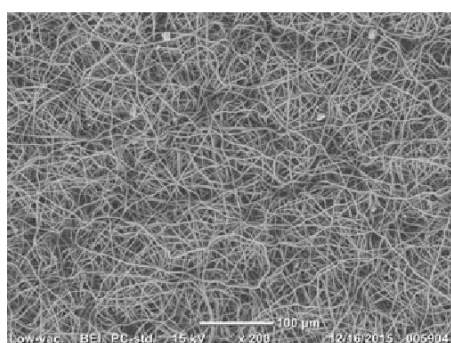
Три группы образцов, модифицированных в ПАД, подверглись обработке в водном растворе ГК различной концентрации: 0,1 %, 0,2 % и 0,3 % в течение 30 минут. Смачиваемость поверхности полученных образцов исследовали на установке «EasyDrop» (Krüss, Германия) методом «сидячей» капли (объем 3 мкл), помещенной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

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

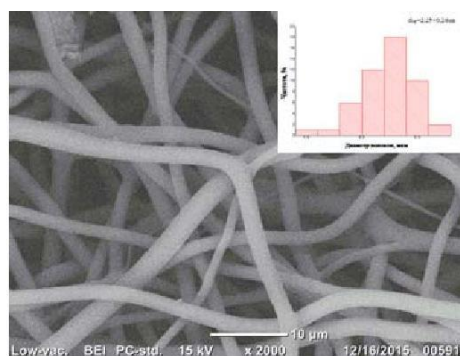
Образцы, обработанные водным раствором ГК, показывают большие углы смачиваемости, следовательно, меньшую гидрофильность по сравнению с образцом, модифицированным в ПАД и не обработанным раствором ГК, для которого наблюдается полная смачиваемость, из-за чего можно предположить, что свободные радикалы,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

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

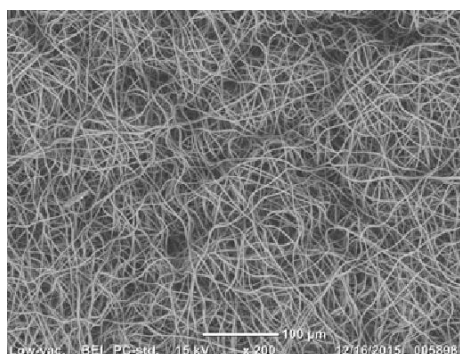
Для оценки влияния плазмы атмосферного давления на размеры волокон скаффолдов были построены гистограммы распределения по диаметрам волокон до и после модифицирования (рис. 1). Из сопоставления средних диаметров волокон всех пяти групп образцов видно, что при модифицировании поверхностей скаффолдов в ПАД и при обработке их ГК морфология скаффолдов остается неизменной.



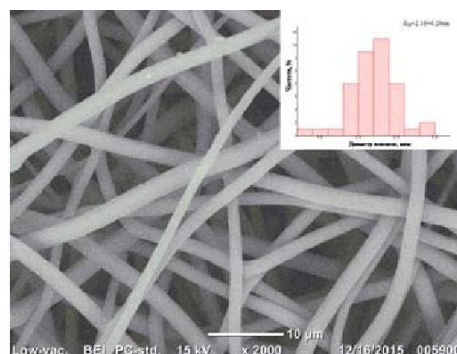
а)



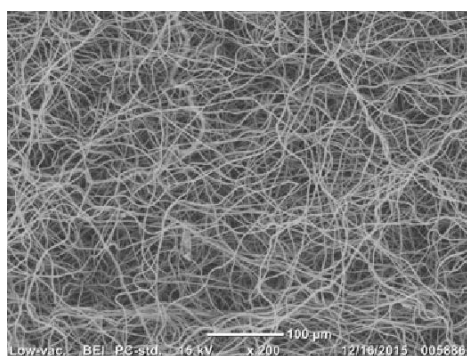
б)



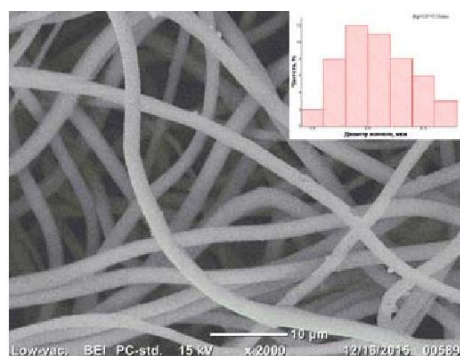
в)



г)



д)



е)

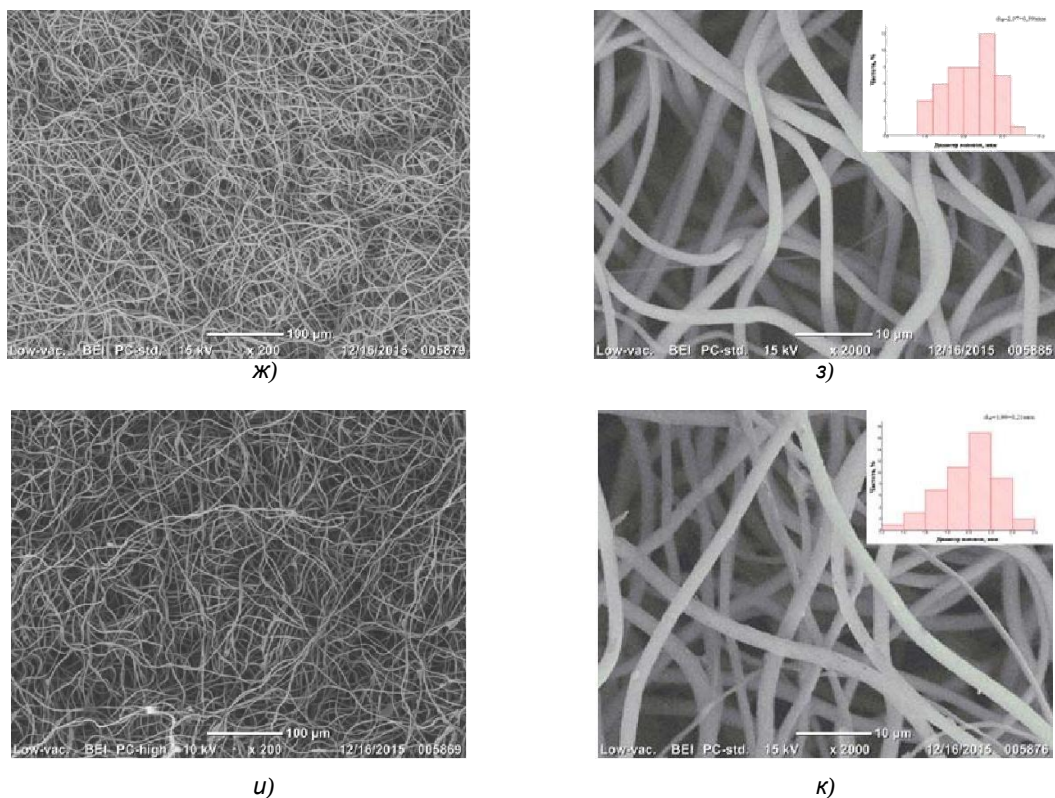


Рисунок 1. СЭМ изображения образцов с увеличением: а) $\times 200$, б) $\times 2000$ не модифицированного и не обработанного ; в) $\times 200$, г) $\times 2000$ модифицированного в ПАД; д) $\times 200$, е) $\times 2000$ модифицированного в ПАД и обработанного в 0,1%-растворе ГК, ж) $\times 200$, з) $\times 2000$ модифицированного в ПАД и обработанного в 0,2%-растворе ГК ; и) $\times 200$, к) $\times 2000$ модифицированного в ПАД и обработанного в 0,3%-растворе ГК

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

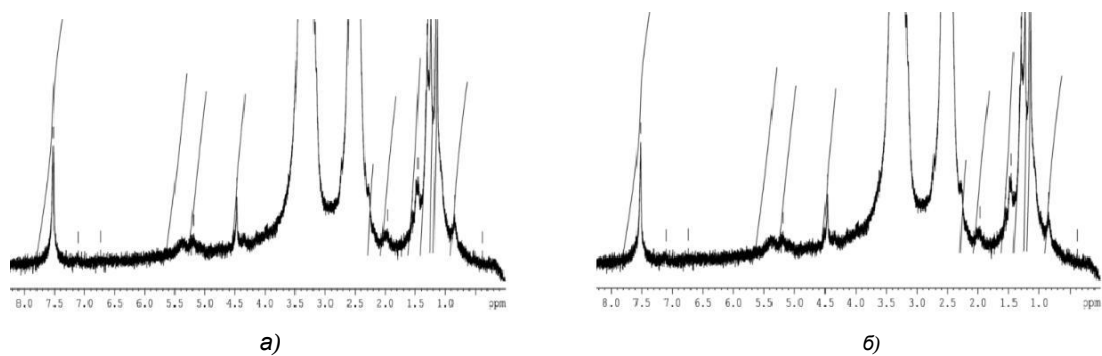


Рисунок 2. Спектры ЯМР ^1H : а) образца контрольной группы и б) образца, обработанного гиалуроновой кислотой с концентрацией 0,1 %. Сигналы, соответствующие гиалуроновой кислоте, находятся в областях 2-2,5 ppm и 4-4,5 ppm

В работе было показано, что модифицирование поверхности скаффолдов полимолочной кислоты плазмой атмосферного давления приводит к резкому увеличению смачиваемости поверхности, обуславливающееся образованием свободных радикальных связей на поверхности образца. Также, данный способ модифицирования не приводит к изменению морфологии поверхности скаффолда.

Вследствие образования свободных радикальных связей присоединение молекул гиалуроновой кислоты возможно, о чем свидетельствуют спектры ЯМР H^1 .

Список литературы

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