На правах рукописи

Гончаров Дмитрий Борисович

БИОСИНТЕЗ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ: ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА НА СВОЙСТВА ПОЛИМЕРОВ И ХАРАКТЕРИСТИКИ НЕТКАНЫХ МАТЕРИАЛОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИМ ФОРМОВАНИЕМ

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Красноярск – 2017

Работа выполнена на базовой кафедре биотехнологии Института фундаментальной биологии и биотехнологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский Федеральный университет»

Научный руководитель: **Волова Татьяна Григорьевна,**
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Кильдеева Наталия Рустемовна**,
доктор химических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Российский государственный университет им. А. Н. Косыгина (Технологии. Дизайн. Искусство)», заведующая кафедрой химии и технологии полимерных материалов и нанокомпозитов

Мухамадияров Ринат Авхадиевич,
кандидат биологических наук, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», старший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»

Защита диссертации состоится «14» июня 2017 года в 10:00 ч на заседании диссертационного совета Д 003.075.04 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН) по адресу: 660036, г. Красноярск, Академгородок д. 50, стр. 50.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биофизики Сибирского отделения Российской академии наук – обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН и на сайте http://www.ibp.ru

Автореферат разослан «___»_____2017 года

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат биологических наук, научный сотрудник Е.Н. Есимбекова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Освоение новых материалов является одним из высокорейтинговых направлений критических технологий мирового уровня. Особо актуален поиск и исследование новых материалов биомедицинского назначения, предназначенных для контакта со средой живого организма и необходимых для восстановления поврежденных тканей и органов [Штильман, 2006]. Ценным продуктом биотехнологии являются полигидроксиалканоаты (ПГА) – полимеры гидроксипроизводных карбоновых кислот, обладающие биоразрушаемостью, биосовместимостью и термопластичностью. ПГА не подвержены быстрому небиологическому гидролизу в водных средах, и их свойства могут существенно варьировать в зависимости от набора и соотношения мономеров [Volova et al., 2013]. Разнообразие ПГА и возможность получения на их основе композитов с различными материалами выдвигает эти биополимеры в разряд наиболее перспективных материалов XXI века. Наиболее перспективными областями применения ПГА являются биомедицинские технологии, связанные с разработкой материалов и устройств для реконструктивной хирургии [Sudesh, 2004; Volova et al., 2013].

Особенностью ПГА является возможность биосинтеза полимеров различного состава, а также переработки в специализированные изделия доступными методами. К перспективным методам получения изделий для биомедицины относится метод электростатического формования (ЭСФ) – «electrospinning». Принцип метода основан на образовании ультратонких вытянутых структур в электростатическом поле, образованном между противоположно заряженными электродами, когда один из них находится в расплаве или растворе полимерного материала, второй размещается на приемном металлическом коллекторе (мишени). Метод ЭСФ получил сильное развитие в последние годы в связи с потребностями новых биомедицинских технологий, в частности, клеточной и тканевой инженерии. Технология ЭСФ позволяет получать ультра- и нанотонкие волокна и пористые нетканые мембраны, приближенные к характеристикам нативных тканей [Shin et al., 2012]. Качество и характеристики ЭСФ изделий существенно варьируются в зависимости от типа используемого материала и параметров процесса ЭСФ (напряжение, скорость подачи и концентрация полимерного раствора, расстояние между электродами, диаметр подающего устройства и др.). При этом необходимые параметры процесса формования, обеспечивающие заданные характеристики получаемых изделий, специфичны для каждого полимерного материала, поэтому требуют изучения в каждом конкретном случае.

Освоение метода электростатического формования применительно к ПГА начато сравнительно недавно, поэтому многие аспекты проблемы получения методом ЭСФ и характеризации изделий из полимеров этого класса не раскрыты. В литературе не представлены фундаментальные и обобщающие работы, характеризующие связь между параметрами процесса

формования, химическим составом, свойствами ПГА и качеством получаемых изделий; не раскрыт потенциал ЭСФ изделий из ПГА применительно к задачам клеточной и тканевой инженерии.

Это определило цель исследования, направленного на синтез и исследование свойств ПГА и разработку технологии электростатического формования полимеров различного химического состава.

Для достижения цели сформулированы **задачи**:

1. Синтезировать образцы ПГА различного химического состава, образованных мономерами 3-гидроксибутирата (3ГБ), 4-гидроксибутирата (4ГБ), 3-гидроксивалерата (3ГВ), 3-гидроксигексаноата (3ГГ).

2. Исследовать влияние набора и соотношения мономеров в ПГА на физико-химические свойства (молекулярно-массовые и температурные характеристики, степень кристалличности).

3. Исследовать биологическую совместимость ПГА различного химического состава в культуре клеток *in vitro*.

4. Изучить влияние химического состава ПГА и параметров процесса ЭСФ (концентрации и скорости подачи раствора, расстояния между электродами, мощности электрического поля, типа принимающей мишени) на структуру, физико-механические и биологические свойства нетканых мембран.

5. Оценить эффективность применения нетканых мембран из ПГА в качестве опорных носителей для культивирования клеток и раневых покрытий.

Научная новизна. Синтезировано семейство ПГА различного химического строения. Изучено влияние набора и соотношения мономеров (4-гидроксибутирата, 3-гидроксивалерата и 3-гидроксигексаноата) на молекулярно-массовые и температурные характеристики, и степень кристалличности полимеров. С применением набора ПГА различного химического строения, характеризующихся различиями степени кристалличности (20-76 %), исследованы условия формования растворов методом электрического формования (ЭСФ). Установлены параметры режимов ЭСФ (напряжение электрического поля, скорость подачи полимерного раствора, расстояние между электродами, тип принимающей мишени), обеспечивающие получение изделий высокого качества. Выявлено влияние состава полимеров и ориентированности волокон на структуру, физико-механические и биологические свойства нетканых мембран. На примере культур фибробластов NIH 3T3 и M-22 показано, что все типы полученных нетканых мембран из ПГА различного химического состава обладают высокой адгезионной способностью и биологической совместимостью при прямом контакте с культивируемыми клетками.

Практическая значимость. Разработана технология электростатического формования растворов ПГА различного химического строения, различающихся физико-химическими свойствами. Получено пионерное семейство нетканых мембран, образованных ультратонкими

волокнами с различной ориентацией, различающиеся структурой поверхности и физико-механическими характеристиками. Полученные ЭСФ изделия из ПГА различного химического состава положительно оценены в качестве опорных носителей для культивирования клеток и раневых покрытий ожоговых ран. Проведена сертификация эластичных нетканых мембран из сополимеров П(3ГБ/4ГБ) в соответствии с разработанными Техническими условиями ТУ 9390-009-02067876-2015 "Материалы медицинские из разрушаемых природных сополимеров 3-гидроксимасляной 4-гидроксимасляной кислот"; серия мембран передана для исследований в клинические учреждения.

Положения, выносимые на защиту:

Синтезированное семейство сополимерных ПГА различного химического состава и исследованные физико-химические и биологические свойства.

Установленные зависимости структуры и физико-механических характеристик ЭСФ нетканых мембран от состава полимеров и режима формования, обеспечивающие получение изделий с контролируемыми характеристиками.

Положительная оценка разработанных ЭСФ изделий из ПГА в качестве опорных носителей для культивирования клеток и раневых покрытий ожоговых ран.

Апробация работы.

Материалы диссертации были представлены на XLIX Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2011); 16-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых (Пущино, 2012); 2-ом научном семинаре с молодежной школой «Биотехнология новых материалов и окружающая среда» (Красноярск, 2012); Международной научно-практической конференции «Инновационные биотехнологии в странах ЕВРАЗЭС» (Санкт-Петербург, 2012); 4th International Congress “Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues”, «BIONANOTOX-2013» (Греция, 2013); конкурсе-конференции молодых учёных и аспирантов ИБФ СО РАН (Красноярск, 2014), Международной конференции «Биотехнология новых материалов-окружающая среда-качество жизни» (Красноярск, 2016).

Работа выполнена при финансовой поддержке мега-гранта "Биотехнология новых биоматериалов" по Постановлению Правительства РФ № 220 от 9 апреля 2010 г. (договор №11.G34.31.0013. 2010–2014 гг.); проекта «Организация исследований, разработок и опытно-промышленного производства материала на основе полимеров микробного происхождения, способных к деструкции» ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности РФ на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (госконтракт № 13411.1008799.13.116. 2013–2014 гг.); гранта Красноярского

краевого фонда науки «Биомедицинские изделия на основе полимеров биологического происхождения» (договор № КФ-368. 2013 г.).

Публикации. По результатам работы опубликованы 16 печатных работ, из них 9 статей в российских и международных журналах из списка ВАК; 7 публикаций в сборниках докладов научных конференций.

Личный вклад автора заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования: от постановки цели и задач, выбора методов исследований до проведения экспериментов с последующей интерпретацией и обобщением результатов, а также в подготовке докладов и публикаций.

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 154 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (объекты и методы исследования, результаты исследований и их обсуждение), выводов, списка литературы и приложения. Работа иллюстрирована 12 таблицами и 55 рисунками. Список литературы включает 188 источников, из них 172 на иностранных языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение. Во введении обоснована актуальность работы, перспективы разработки нетканых материалов методом электростатического формования из ПГА разных типов, для реконструкции кожных дефектов.

Аналитический обзор посвящен анализу литературы по синтезу и свойствам ПГА, способам получения из них специализированных изделий и перспективам применения. Значительное место отведено описанию технологии электростатического формования полимеров для получения нетканых материалов, перспективных для клеточной и тканевой инженерии.

Материалы и методы исследования. Исследован штамм водородокисляющих бактерий *Cupriavidus eutrophus* B-10646, зарегистрированный во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов, обладающий устойчивостью к С-субстратам, необходимым для синтеза ПГА с различным набором мономеров. Синтез полимеров реализован в периодическом режиме при ограничении роста штаммов-продуцентов дефицитом азота в среде по технологии, разработанной в Институте биофизики СО РАН [Volova et al., 2008]. Для выращивания бактерий за основу принята солевая среда Шлегеля с $CO(NH_2)_2$ в качестве источника азота и глюкозой в качестве основного углеродного субстрата. Для синтеза сополимерных ПГА в состав среды в качестве прекурсоров целевых мономеров, отличных от 3-гидроксибутирата, вносили гамма-бутиролактон или соли валериановой и гексановой кислот. Культивирование бактерий проводили в 1- и 2-х литровых колбах с коэффициентом заполнения 0,5 в термостатируемом шейкере-инкубаторе «Incubator Shaker Innova» серии 44 («New Brunswick Scientific», США) при 30 ^{o}C. Для синтеза партий полимеров использовали автоматизированный ферментационный комплекс BioFlo 115 «New Brunswick Scientific» (США) с рабочим объемом 5–7 л.

Экстракцию полимеров из биомассы клеток проводили хлороформом с последующим осаждением экстракта в гексане. Повторение процедур

перерастворения полимеров и осаждения позволило получить гомогенные образцы. Химический состав полимеров определяли после предварительного метанолиза хроматографией, совмещенной с масс-спектрометрией с использованием хроматографа «Agilent Technologies» 7890A (США), а также по ^{1}H-ЯМР спектрам растворов полимеров в $CDCl_3$ с использованием ЯМР-спектрометра Advance III 600 («Bruker», Германия). Исследование физико-химических свойств включали определение молекулярно-массовых характеристик гель-проникающей хроматографии «Agilent Technologies» 1260 Infinity (США), температурных свойств методом ДСК с использованием прибора фирмы «NETZCH» (Германия). Рентгеноструктурный анализ и определение степени кристалличности образцов ПГА выполнены на рентгеноспектрометре D8 ADVANCE «Bruker» (Германия). Реологические свойства растворов ПГА исследовали с помощью вискозиметра Гепплера HAAKE тип C с падающим шариком («Thermo Scientific», Германия). Нетканые материалы получали методом электростатического формования (ЭСФ) растворов полимеров на автоматической установке «Nanon 01A». (Япония). Морфологию полимерных пленок и ЭФС нетканых мембран изучали с применением электронной микроскопии – растровый микроскоп TM-3000 «HITACHI» (Япония); свойства поверхности – на базе измерения краевых углов смачивания на приборе DSA-25E «Krüss» (Германия); физико-механические характеристики (модуль Юнга, относительное удлинение при разрыве, напряжение при разрыве) – с применением универсальной тестовой разрывной машины (Instron 5565 KN, Великобритания); паропроницаемость – на установке Mocon Permatran W 3/31 (Миннеаполис, Миннесота, США).

Для исследования биологической совместимости ПГА получены наливные пленки из 2-%-х растворов полимеров в хлороформе и образцы ЭСФ мембран, которые стерилизовали обработкой H_2O_2-плазмой (стерилизатор Sterrad NX, «Johnson & Johnson», США). Исследование адгезионных свойств поверхности образцов и способности поддерживать клеточную пролиферацию проводили в культуре фибробластов мыши линии NIH 3T3 с регистрацией морфологии клеток (растровый микроскоп «HITACHI» TM-3000) окрашенных флюоресцентными красителями DAPI и FITC, учет количества жизнеспособных клеток (MTT-тест). Оценку нетканых мембран в качестве раневых покрытий проводили на лабораторных животных (беспородные белые мыши) на модели ожоговой раны II степени площадью 2% поверхности тела. Критериями оценки служили выраженность воспалительной реакции в ране и окружающих мягких тканях, скорость и полноценность восстановления кожного покрова. Эксперименты проведены в соответствии с Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (разрешение от комиссии СФУ по биоэтике). Для статистической обработки полученных данных использовали стандартный пакет программы Microsoft Exel.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Биосинтез и свойства ПГА различного химического состава

Специфика биосинтеза ПГА, аккумулируемых бактериями в условиях лимитированного роста и утилизируемых клетками в качестве эндогенного депо энергии и углерода, диктует необходимость разработки специализированных режимов выращивания с целью одновременного получения высокого урожая биомассы клеток и выхода полимеров.

Выращивание бактерий *C. eutrophus* B-10646 в контролируемой двустадийной периодической культуре на солевой среде с глюкозой при ее текущей концентрации в среде не менее 5 г/л, при лимитировании роста бактерий дефицитом азота на первом этапе (25–35 ч) и в безазотной среде – на втором, обеспечивает синтез гомополимера 3-гидроксибутирата [П(3ГБ)] с высокими выходами (75–90 %) (Рисунок 1 а). Для биосинтеза сополимеров, в которых вторым мономером является 3-гидроксивалерат [П(3ГБ/3ГВ)], на первой стадии процесса в культуру вносили субстрат – предшественник мономеров 3ГВ – валерат натрия в концентрации 1–2 г/л. Динамика накопления мономеров 3ГБ в сополимере показана на рисунке 1 б, из которого следует, что максимальное включение мономеров 3ГВ в цепь 3ГБ имеет место спустя 16 ч после добавки; далее концентрация валерата падала на фоне повышения содержания мономеров 3ГБ.

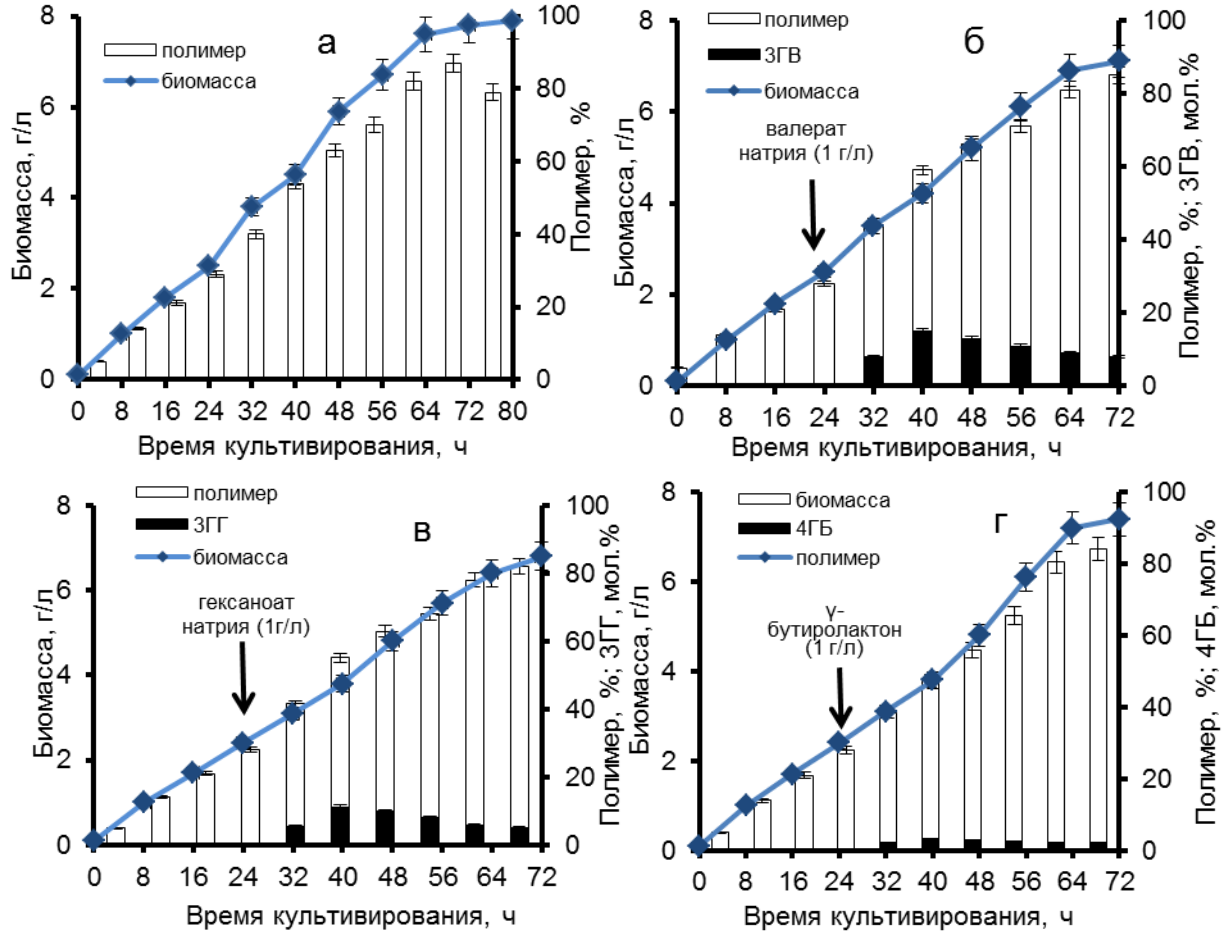


Рисунок 1 – Динамика урожая биомассы клеток, общего выхода ПГА и его состава в культуре C. eutrophus B-10646: а – [П(3ГБ)], б – [П(3ГБ/3ГВ)], в – [П(3ГБ/3ГГ)], г – [П(3ГБ/4ГБ)]

Аналогичная динамика получена при синтезе сополимеров, в которых вторым мономером является 3-гидроксигексаноат [П(3ГБ/3ГГ)] (Рисунок 1 в) и 4-гидроксибутират [П(3ГБ/4ГБ)] (Рисунок 1 г), для которых в качестве предшественников в среду вносили, соответственно, гексаноат натрия или гамма-бутиролактон.

Варьирование количества добавок С-субстратов-предшественников в культуре бактерий, выращиваемой в режиме синтеза полимеров, и последующее время после внесения добавок в среду обеспечило синтез семейства ПГА, представленного гомополимером поли(3ГБ); сополимерами 3-гидроксимасляной кислоты и 4-гидроксимасляной кислот (П(3ГБ/4ГБ)) с содержанием мономеров 4ГБ 6,1-48,3 мол.%; сополимеры 3-гидроксимасляной и 3-гидроксивалериановой кислот (П(3ГБ/3ГВ)) с содержанием 3ГВ 4,5-60 мол.%; сополимеры 3-гидроксимасляной и 3-гидроксигексановой кислот (П(3ГБ/3ГГ)) с содержанием 3ГГ 4,9-24 мол.% (таблица 1). Химический состав полимеров подтвержден хроматографией с хромато-масс-спектрами и ^{1}Н-ЯМР спектрами (Рисунок 2, 3).

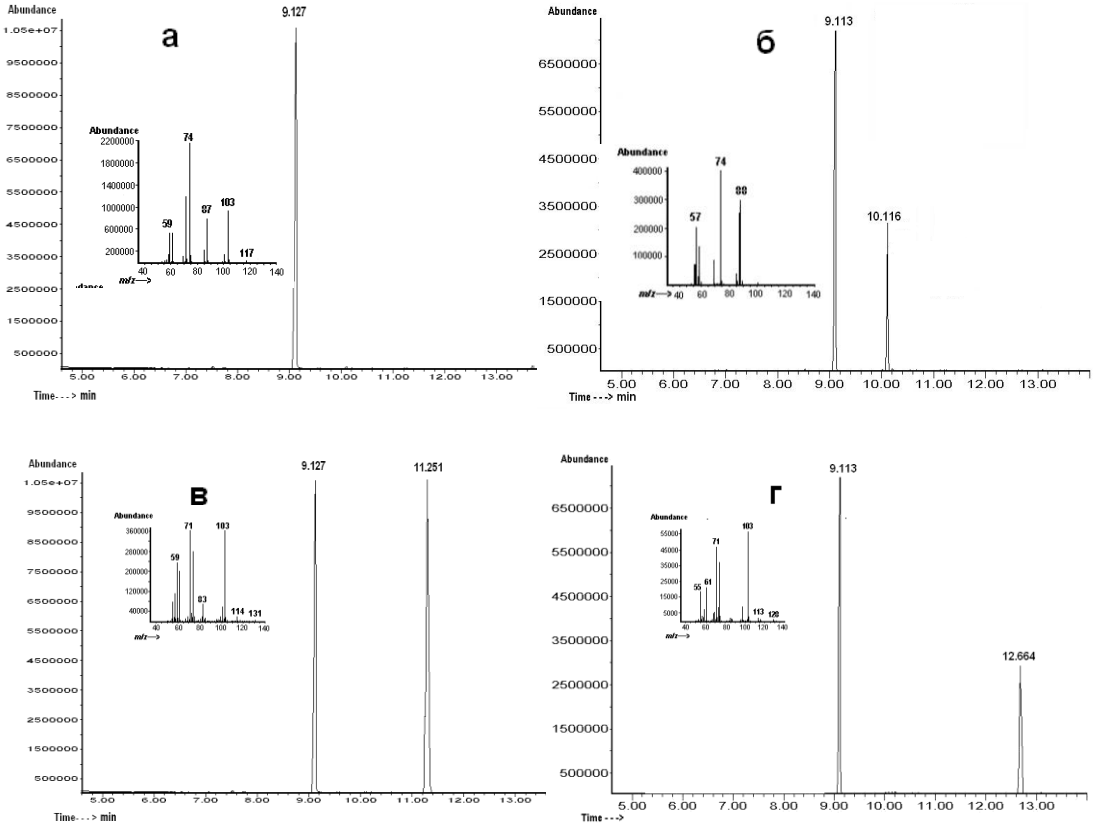


Рисунок 2 – Хроматограммы и масс-спектры метиловых эфиров мономеров, входящих в состав ПГА: а – П(3ГБ), б – П(3ГБ/-3ГВ), в – П(3ГБ/4ГБ), г – П(3ГБ/3ГГ), с временами удерживания: метил-3-гидроксибутират (3ГБ) – 9,113; метил-3-гидроксивалерат (3ГВ) – 10,116; метил-4-гидроксибутират (4ГБ) – 11,251; метил-3-гидроксигексаноат (3ГГ) – 12,664 мин

Результаты сравнительного исследования физико-химических свойств образцов полимеров с различным набором и соотношением мономеров представлены в таблице 1. Показано, что молекулярно-массовые характеристики ПГА – вариабельные параметры, при этом не выявлено прямой связи между составом полимеров и значениями средневесовой молекулярной массы ($M_в$). В целом, у сополимерных ПГА отмечена тенденция к снижению среднечисловой молекулярной массы ($M_ч$) и, как следствие, возрастания полидисперсности (Đ). Диапазон температуры плавления у П(3ГБ) составил 168-179 ^oC; диапазон термического разложения – лежал в интервале 273-287 ^oC. Наличие выраженного диапазона между температурой плавления и температурой начала разложения является важным технологическим свойством полимера, так как делает возможным получение изделий из расплавов.

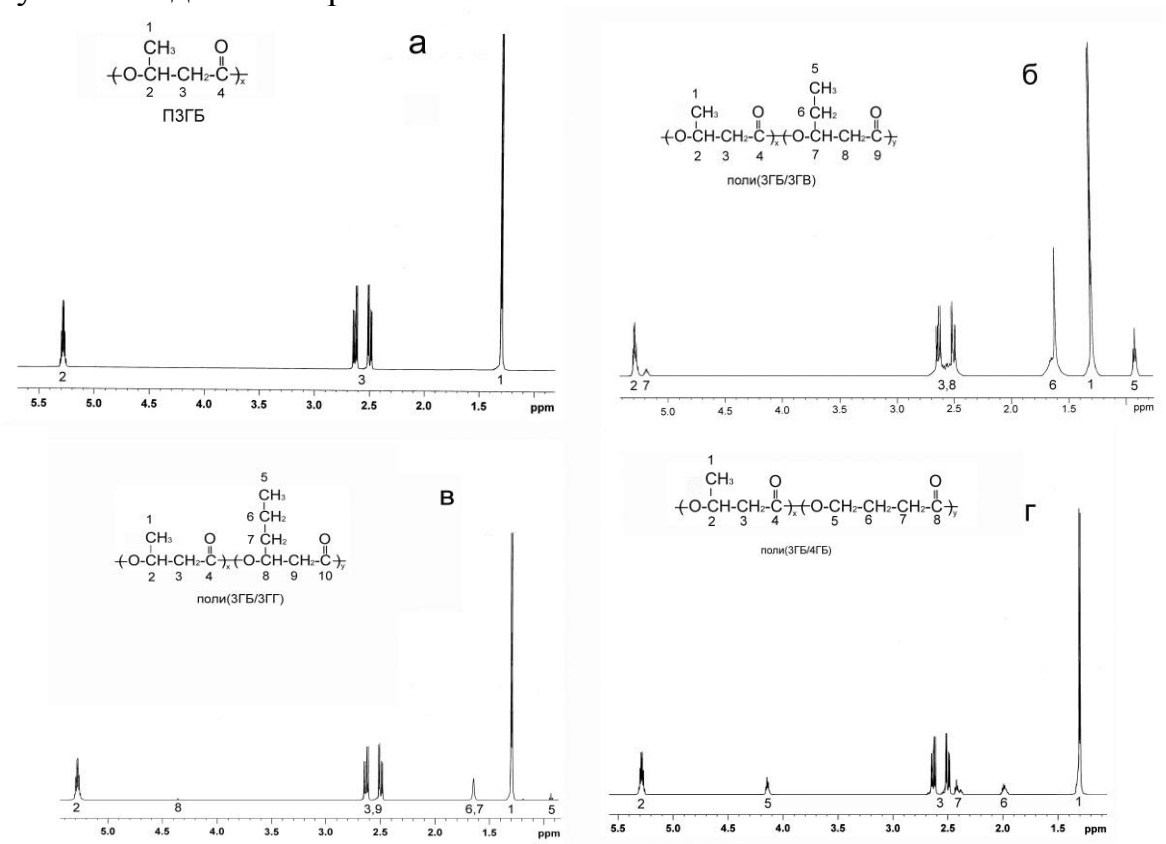


Рисунок 3 – ^{1}H-ЯМР спектры ПГА: а – П(3ГБ), б – П(3ГБ/3ГВ), в – П(3ГБ/3ГГ) г – П(3ГБ/4ГБ)

У сополимеров оба параметра, $T_{пл}$ и $T_{дегр}$ имели более низкие значения; пики плавления и термической деградации относительно П(3ГБ) незначительно сдвинуты влево. Важно отметить сохранение разрыва между температурой плавления и сохранением термопластичности.

ПГА относятся к полукристаллическим материалам. Связано это с тем, что процессы кристаллизации в них, как правило, захватывает не весь объем материала, который представлен как упорядоченной (кристаллической) фазой, так и неупорядоченной (аморфной). В П(3ГБ) выявлено доминирование кристаллической фазы над аморфной. Разброс величин,

полученных на серии из нескольких десятков образцов, лежал в диапазоне 66–78%. В сополимерных образцах отмечено выравнивание соотношения кристаллической и аморфной фаз, выраженное в разной степени у образцов с различным типом второго мономера (таблица 1).

Таблица 1 – Химический состав и свойства ПГА различного химического состава

Состав полимеров, мол.%	Свойства полимеров					
	$М_ч$, кДа	$М_в$, кДа	Đ	$С_{х,\%}$	$Т_{пл}$, $^oС$	$Т_{degr}$, $^oС$
П(3ГБ) 100	706	1200	1,7	76	179,7	276,0
100	410	820	2,0	66	180,2	287,4
100	306	490	1,6	78	168,1	273,2
П(3ГБ/4ГБ) 93,9/6,1	144	473	3,2	50	153,8	286,3
90/10	262	810	3,1	53	171,9	268,0
86,4/13,6	144	605	4,2	38	167,8	288,0
84/16	373	970	2,6	38	167,8	288,0
79,7/20,3	112	418	3,7	35	169,64	287,55
76/24	152	548	3,6	30	170,5	287,0
62/38	133	507	3,8	51	167,76	289,14
51,7/48,3	165	710	4,3	23	173,0	270,6
П(3ГБ/3ГВ) 95,5/4,5	489	1184	2,4	67	146,2	281,1
93/7	405	890	2,2	67	173,2	283,5
89,5/10,5	467	840	1,8	60	175,1	283,9
80/20	271	650	2,4	54	178,6	284,4
67,2/32,8	199	527	2,6	64	169,4	278,1
63/37	396	1030	2,6	56	170,0	271,3
37/60	252	980	3,9	50	167,8	278,4
П(3ГБ/3ГГ) 95,1/4,9	197	647	3,3	75	173,8	246,1
93/7	342	890	2,6	74	169,4	283,2
90/10	334	970	2,9	68	167,8	270,0
86,4/13,6	167	547	3,3	40,2	169	284,3
82/18	225	924	4,1	60	174,8	265,8
76/24	151	590	3,9	63	165,7	262,0

Включение мономеров 3ГВ в цепь 3ГБ существенно влияло на степень кристалличности ($С_х$) сополимеров П(3ГБ/3ГВ), снижая величину параметра. Линейность зависимости $С_х$/3ГВ получена только в диапазоне включения мономеров 3ГВ до 35-40 мол.%. Образцы с более высоким содержанием 3ГВ имели значения кристалличности порядка 50%. Это связано с тем, что сополимеры этого типа изодиморфны вследствие сокристаллизации мономерных единиц. Известно, если содержание мономеров 3ГВ в

сополимере менее 35-40 мол.%, эти мономеры могут кристаллизоваться в решетке 3ГБ; а когда содержание мономеров 3ГВ превышает 40 мол.%, они могут кристаллизоваться в решетке 3ГВ. Вероятно, в образцах с высоким содержанием мономеров 3ГВ происходила со-кристаллизация мономерных единиц в одну решетку, что, по всей видимости, не повлияло на кристалличность П(3ГБ/3ГВ), несмотря на рост мономеров 3ГВ. Аналогичное изменение величины C_x характерно для сополимеров П(3ГБ/3ГГ). Включения мономеров 3ГГ в цепь 3-гидроксибутирата влияло на соотношение аморфной и кристаллической фаз в сополимере П(3ГБ/3ГГ) аналогично 3ГВ, выравнивая их соотношение. С увеличением содержания 3ГГ в исследованном диапазоне (от 4,9 до 24,0 мол.%) степень кристалличности сополимера падала от 75 до 63%. Еще более выраженное снижение степени кристалличности получено при исследовании образцов П(3ГБ/4ГБ). Включение мономеров 4ГБ в полимерную цепь 3ГБ резко (существенно в большей степени по сравнению с 3ГВ и 3ГГ) влияло на соотношение кристаллической и аморфной фаз в сополимере, значительно снижая кристалличность последнего. Самые низкие значения степени кристалличности зарегистрированы у этого типа ПГА. Даже при относительно невысоком (10 мол.%) содержании мономеров 4ГБ в сополимере, C_x составила 53%. При дальнейшем увеличение фракции 4ГБ от 10 до 48 мол.% степень кристалличности монотонно снижалась, минимальный состав 23% при содержании мономеров 4ГБ в сополимере, равным 48 мол.%. Таким образом, в наибольшей степени амморфизация ПГА происходит при наличии в полимере мономеров 4-гидроксибутирата. Выраженность влияния на соотношение аморфной и кристаллических фаз у сополимерных образцов усиливается в ряду 3ГВ→3ГГ→4ГБ

Биологическая совместимость ПГА

Для исследования биологической совместимости ПГА получены пленки, различающиеся морфологией и характеристиками поверхности (Рисунок 4).

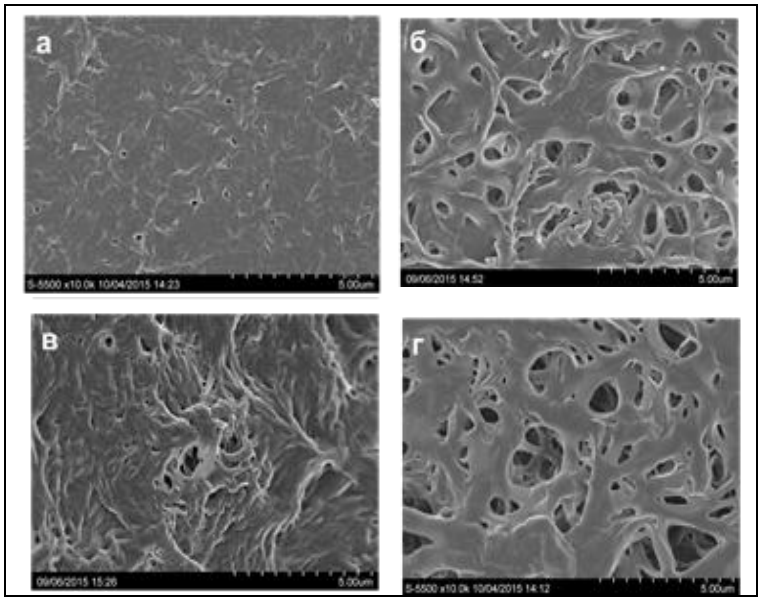


Рисунок 4 – РЭМ снимки поверхности пленочных образцов ПГА: А – П(3ГБ), Б – П(3ГБ/4ГБ) В – П(3ГБ/3ГВ) Г – П(3ГБ/3ГГ) с близким содержанием второго мономера (порядка 10 мол.%)

Поверхность пленок, полученных из П(3ГБ), имела минимальную рельефность, практически

не имела пор. На поверхности образцов, полученных из сополимера П(3ГБ/4ГБ), видны множественные поры размером около 1 мкм. У пленок, изготовленных из сополимера 3ГБ и 3ГГ, поверхность наиболее рельефная с многочисленными порами различного диаметра, от 0,5 до 3,0 мкм. Значимым показателем, характеризующим гидрофильно/гидрофобный баланс поверхности, служит величина краевого угла смачивания водой. Измерение этой величины позволяет вычислить также такие важные характеристики поверхности, как величину сил сцепления, поверхностное натяжение и свободную энергию межфазовой поверхности. Самое высокое значение краевого угла имели пленки, полученные из П(3ГБ) (70,0±0,4°). Сополимерные пленки имели величину краевого угла существенно меньшую; полученные из П(3ГБ/3ГВ) и П(3ГБ/3ГГ) по этому показателю практически не различались (60-62,5°). Величина краевого угла поверхности мембран из сополимера П(3ГБ/4ГБ) была достоверно ниже и составляла 57,4 ± 0,6 °. Наиболее низкие значения поверхностного натяжения и величины сил сцепления характерны для мембран из П(3ГБ) (порядка 31-32 и 95-97 эрг/см^2), имеющих самую низкую гидрофильность; у сополимерных мембран эти значения выше, соответственно, 38,9-43,1 и 106,4–112,0 эрг/см^2.

Адгезионные свойства пленок, исследованные в культуре фибробластов мыши линии NIH 3T3, показали, что количество клеток, окрашенных флюоресцентными красителями DAPI и FITC, прикрепленных и растущих на пленках из ПГА различного состава, не выявили отличий между образцами и контролем (полистирол). Результаты подтверждены в МТТ тесте, показавших, что количество жизнеспособных фибробластов на полимерных пленках из всех исследованных ПГА было сопоставимо с контролем (Рисунок 5).

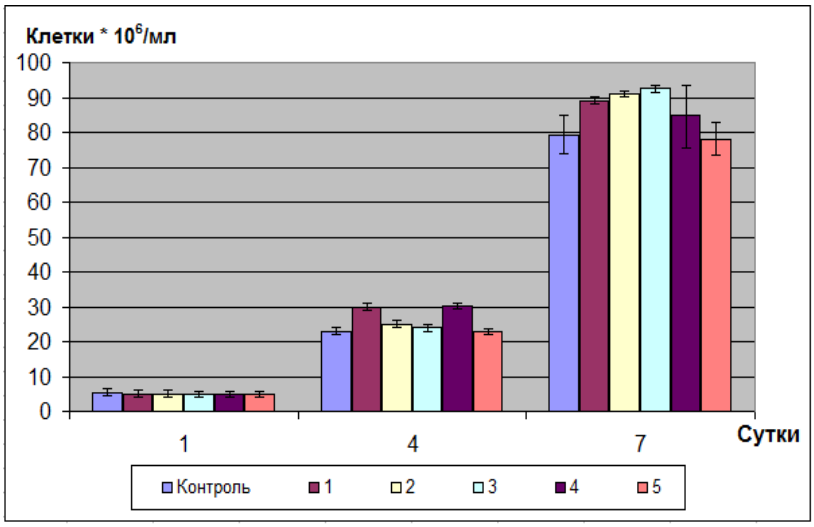


Рисунок 5 – Количество жизнеспособных фибробластов NIH 3T3, *культивируемых на полимерных пленках по результатам МТТ-теста:1 – П(3ГБ); 2 – П(3ГБ/4ГБ) (13 мол.%); 3,4 – П3ГБ/3ГВ (10,5 и 32,8 мол. %); 5 – П3ГБ/3ГГ (7 мол. %) (Контроль-полистирол)*

Все исследованные типы ПГА обладают высокой биологической совместимостью, сопоставимой с полистиролом, и не проявляют цитотоксичности в культуре при прямом контакте с фибробластами.

Исследование параметров процесса электростатического формования растворов ПГА и характеристик получаемых изделий

Знание реологических характеристик растворов необходимы для получения полимерных изделий растворными технологиями. Для отработки технологии формования из образцов ПГА различного химического состава получены и исследованы полимерные растворы с концентрациями (С,%) от 1 до 10 вес.% с использованием в качестве растворителей хлороформа и дихлорметана. Динамическая вязкость измерена при изменении температуры от 5 °С до 60 °С для хлороформа, и от 5 °С до 40 °С для дихлорметана, с шагом изменения температуры 5 °С. Выявлена линейная прямопропорциональная зависимость вязкости от температуры. Для каждого раствора исследованных ПГА выявлено увеличение значений динамической вязкости с повышением концентрации полимерного раствора. Самые высокие значения показателя (39906,17 сП) зафиксированы для растворов П(3ГБ). Увеличение доли мономеров 3ГВ в сополимере П(3ГБ/3ГВ) приводило к снижению показателя до (9012,159 сП). Для образцов П(3ГБ/3ГГ) с 4,9 и 10 мол.% 3ГГ и П(3ГБ/4ГБ) (3,4 мол.%) динамическая вязкость не превышала 1500 сП при самой высокой используемой концентрации. Самые низкие показатели вязкости (500 сП) зафиксированы для сополимера П(3ГБ/4ГБ) с содержанием мономеров 4ГБ 13,6 мол.%. Аналогичные измерения проведены для растворов ПГА разных типов в дихлорметане. Полученные значения динамической вязкости для этого растворителя были значительно ниже по сравнению с вязкостью аналогичных полимерных растворов приготовленных с использованием хлороформа и лежали у разных образцов в диапазоне от 15536,25 сП до 320,97 сП. В целом, динамическая вязкость растворов ПГА в хлороформе в 3–3,5 раза выше, чем у растворов на основе дихлорметана. Растворы ПГА по убыванию величины динамической вязкости можно расположить в следующем порядке: П(3ГБ) – П(3ГБ/3ГВ) – П(3ГБ/3ГГ) – П(3ГБ/4ГБ). Полученные результаты позволяют получать растворы ПГА с различными реологическими характеристиками, что важно для получения полимерных изделий растворными технологиями. Наиболее пригодными для процесса ЭСФ являются растворы ПГА в диапазоне концентраций от 2 до 8 % (по весу), с показателями динамической вязкости от 10 до 10500 сП.

Влияние концентрации растворов ПГА и параметров процесса ЭСФ на структуру и свойства нетканых мембран, образованных ультратонкими волокнами (УВ)

Изучено влияние параметров процесса ЭСФ (концентрация растворов. напряжение поля, скорость подачи раствора и расстояние между электродами) на морфологию и физико-механические свойства полученных образцов. Исследованы растворы с концентрацией П(3ГБ) в хлороформе от 1 до 10 весовых % при стабилизации параметров процесса: диаметр иглы – 1 мм, приложенное напряжение – 30 кВ, скорость подачи раствора – 5 мл/ч, рабочее расстояние – 15 см, коллектор – стальная плоская пластина. Диапазон получения качественных бездефектных волокон лежал в пределах

от 2 до 8 весовых процентов %. Полученные волокна в основном имели гладкую поверхность и правильную цилиндрическую форму (Рисунок 6).

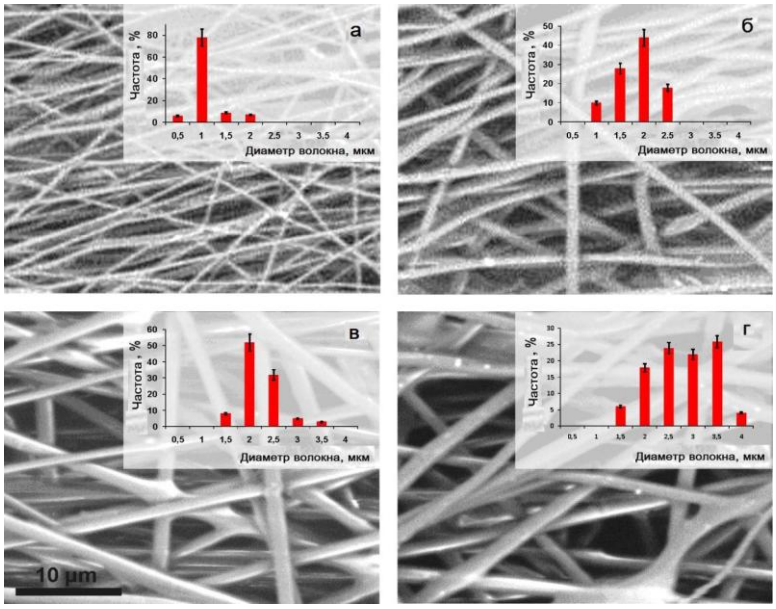


Рисунок 6 – РЭМ снимки нетканых мембран, сформированных УВ методом ЭСФ из растворов П(3ГБ) различной концентрации, соответственно, а, б в, г – 2, 4, 6, 8 (вес.%)

Выявлено значительное влияние концентрации полимерного раствора на диаметр образующихся УВ, который варьировал от 0,45 до 3,14 мкм. В исследованном диапазоне концентраций растворов П(3ГБ) зависимость диаметра волокон от плотности раствора линейна. С увеличением диаметра волокон отмечено увеличение пространства между отдельными волокнами в формирующейся нетканой мембране от 2 до 7 мкм и толщины изделия от 0,010 до 0,075 мкм. Качественные волокна получены при увеличении электростатического поля в диапазоне от 15 до 30 кВ; с соответственным изменением диаметра от 1,25 до 2,5 мкм. Рабочий диапазон скорости подачи раствора может составлять от 1 до 8 мл/ч. Изучение свойств поверхности полученных образцов ЭСФ изделий, показали, что мембраны образованные волокнами меньшего диаметра (0,45–1,29 мкм) при толщине от 10 до 30 мкм, имели самые низкие значения краевого угла смачивания водой (51,20^{o}–56,57^{o}).

Установлено значительное влияние диаметра УВ на физико-механические характеристики нетканых мембран (Рисунок 7). С увеличением диаметра ультратонких волокон от 0,45 до 3,14 мкм отмечено повышение эластичности, показателем которого служит величина удлинения при разрыве, которая возросла более чем в 2 раза (от 4,5 до 10,6 %) на фоне снижения прочности, характеризуемой напряжением при разрыве (снижение от 23,16 до 6,65 МПа) и модулем Юнга (снижение от 1,16 до 0,3 ГПа).

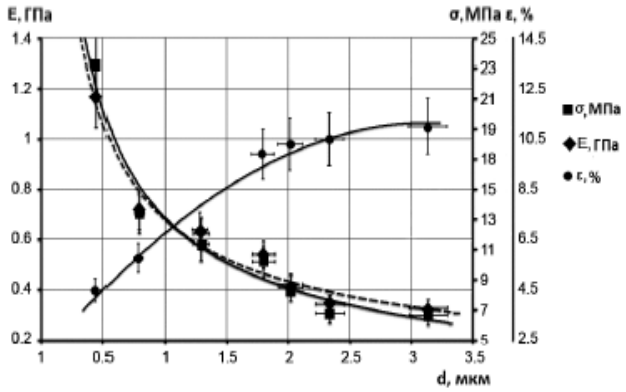
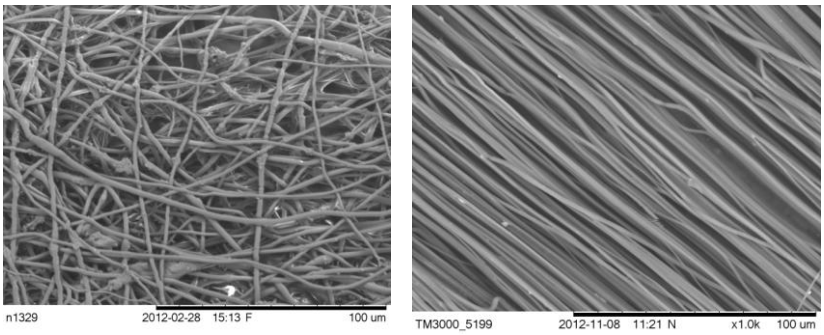


Рисунок 7 – Влияние диаметра УВ на физико-механические свойства нетканых мембран: модуль Юнга (E, ГПа), напряжение (σ, МПа) и удлинение при разрыве (%)

Изменение типа принимающего коллектора позволило получить нетканые

мембраны с различной ориентацией ультратонких волокон. Для формования неориентированных УВ использована плоская стальная пластина; для ориентированных – крутящийся барабан (скорость 1000 об./мин). РЭМ снимки неориентированных и неориентированных волокон представлены на рисунке 8.



а б

Рисунок 8 – РЭМ снимки нетканых мембран, из П(3ГБ) с неориентированными (а) и ориентированными (б) УВ

Установлено, что мембраны из П(3ГБ), сформированные ориентированными УВ, характеризуются более высокими показателями механической прочности. Модуль Юнга у ориентированных мембран составил 637 МПа, это в 1,8 раза выше, чем у неориентированных; напряжения при разрыве – 6,17 МПа, то есть также выше. При этом ориентированность волокон практически не влияла на эластичность материала. Таким образом, исследованы и определены условия и факторы, влияющие на свойства нетканых изделий из П(3ГБ) и показана возможность получения изделий хорошего качества, с различными характеристиками.

Биосовместимость нетканых мембран, полученных методом ЭСФ из растворов П(3ГБ) различной концентрации

Среди основных требований, предъявляемым к материалам и изделиям биомедицинского назначения относят следующие: материалы и изделия должны быть абсолютно безвредными для организма, иметь необходимые физико-механические характеристики, стерилизоваться общепринятыми методами.

Выполнено сравнительное исследование влияния двух методов стерилизации (автоклавирования и обработки плазмой пероксида водорода) на свойства поверхности нетканых мембран и биологическую совместимость по отношению к культивируемым клеткам. Метод стерилизации оказывал влияние на гидрофильность поверхности и, независимо от типа изделия, обработка H_2O_2 вызывала увеличение смачиваемости поверхности волокон. Это проявлялось в снижении краевого угла до 36,43^o. Стерильные мембраны исследованы в качестве опорных клеточных носителей в культуре фибробластов NIH 3T3. Подсчёт клеток через 3 ч после посева показал, что на образцах обработанных плазмой, количество адгезированных клеток выше, чем на автоклавированных и сопоставимо с контролем. Количество клеток на пленках и нетканых мембранах обработанных плазмой H_2O_2 составляло (до 28–29 в поле зрения). Фибробласты, культивируемые на мембранах, проникли в толщу носителя, их рост сопровождался

образованием межклеточного вещества (Рисунок 9). На автоклавированных изделиях клеток было значительно меньше, и они характеризовались неправильной формой. Результаты МТТ-теста подтвердили, что при стерилизации полимерных носителей H_2O_2-плазмой, количество метаболически активных клеток, адгезированных на поверхности выше, чем после автоклавирования.

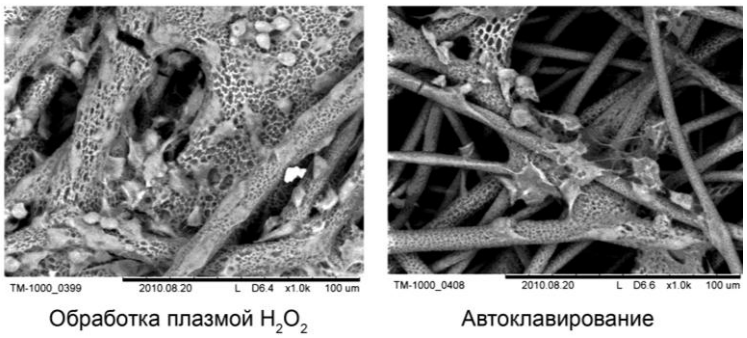


Рисунок 9 – РЭМ снимки фибробластов NIH 3T3 на поверхности нетканых мембран из П(3ГБ) после стерилизации автоклавированием и H_2O_2-плазмой

Влияния структуры нетканых мембран, образованных УВ разного диаметра, на количество жизнеспособность клеток, выполненное в культуре фибробластов NIH 3T3, не выявлено. По результатам МТТ-теста (Рисунок 10), значительной разницы в количестве жизнеспособных клеток в 3-х суточной культуре на мембранах с разным диаметром волокон, полученных из растворов разной концентрации (2-8 %) не выявлено. Однако на менее качественных мембранах, образованных УВ диаметром 3,14±0,38 мкм, количество клеток было ниже практически в 2 раза.

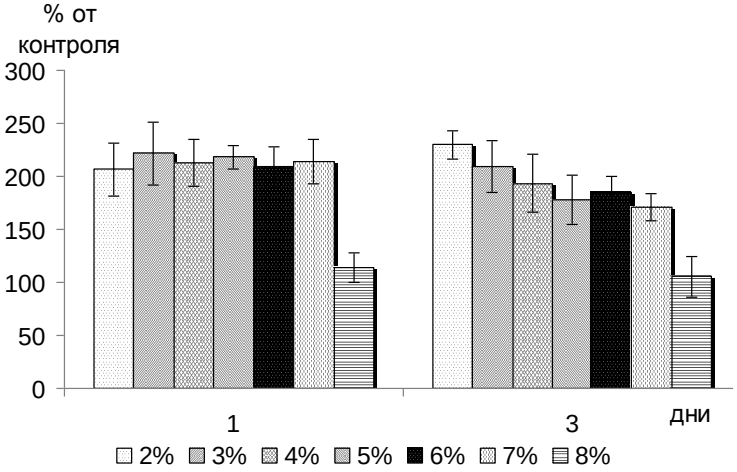


Рисунок 10 – Количество жизнеспособных фибробластов NIH 3T3 на мембранах, сформированных УВ, полученных методом ЭСФ из растворов П(3ГБ) различной концентрации; (контроль – полистирол)

Клетки формировали межклеточное вещество на всех образцах, но особенно значительно на мембранах, образованных УВ диаметром от 0,45 до 1,8 мкм. На образцах, полученных из более плотных растворов (6–8 %) при диаметре УВ 2,02–3,14 мкм, отложение белков происходило с ориентацией вдоль волокон, и было менее выраженным. В культуре через 7 суток результат был близким, с некоторой тенденцией снижения количества жизнеспособных клеток. В целом, показано, что нетканые мембраны из П(3ГБ) не проявляют ингибирующего воздействия на культивируемые клетки и благоприятны для их роста.

Влияние состава полимеров и способа электростатического формования на структуру и свойства нетканых мембран, образованных ультратонкими волокнами

Структура и свойства полимерных изделий могут зависеть как от способа их получения, так и от характеристик используемого материала. В работе впервые исследовано влияние химического состава ПГА с различным соотношением мономеров на структуру и свойства нетканых мембран, получаемых методом ЭСФ. Применение принимающих мишеней различных типов (плоского коллектора и вращающегося барабана) позволяет получать изделия с различной компоновкой ультратонких волокон (УВ), определяющей структурную ориентацию нетканого материала.

Исследовали набор полимеров, различающихся базовыми физико-химическими свойствами (Таблица 1). Формование растворов ПГА в хлороформе (5 %) проводили при следующих режимах: диаметр иглы – 1 мм, приложенное напряжение – 30 кВ, скорость подачи раствора – 5 мл/ч, рабочее расстояние – 15 см, коллектор – плоская стальная пластина и барабан со скоростью вращения 1000 об./мин., для изготовления ориентированных ультратонких волокон. Химический состав полимеров, влиял на структуру и характеристики получаемых ЭСФ изделий. На рисунке 11 даны РЭМ снимки неориентированных и ориентированных УВ, полученных из растворов в хлороформе различных ПГА, в которых содержание второго мономера (3ГБ, 3ГВ, 4ГБ, 3ГГ) было близким (порядка 10,0 мол.%). В основном, все мембраны были хорошего качества, однако отличались по диаметру УВ. Средний диаметр волокон мембран, полученных из П(3ГБ) составил 2,9 мкм, толщина мембраны 30 мкм. Средний диаметр УВ в мембране из П(3ГБ/3ГВ) составил 2,3 мкм, а из П(3ГБ/4ГБ) был достоверно ниже (1,7 мкм). Напротив, диаметр волокон, полученных также из 5%-го раствора П(3ГБ/3ГГ) был выше в 2 раза (4,2 мкм).

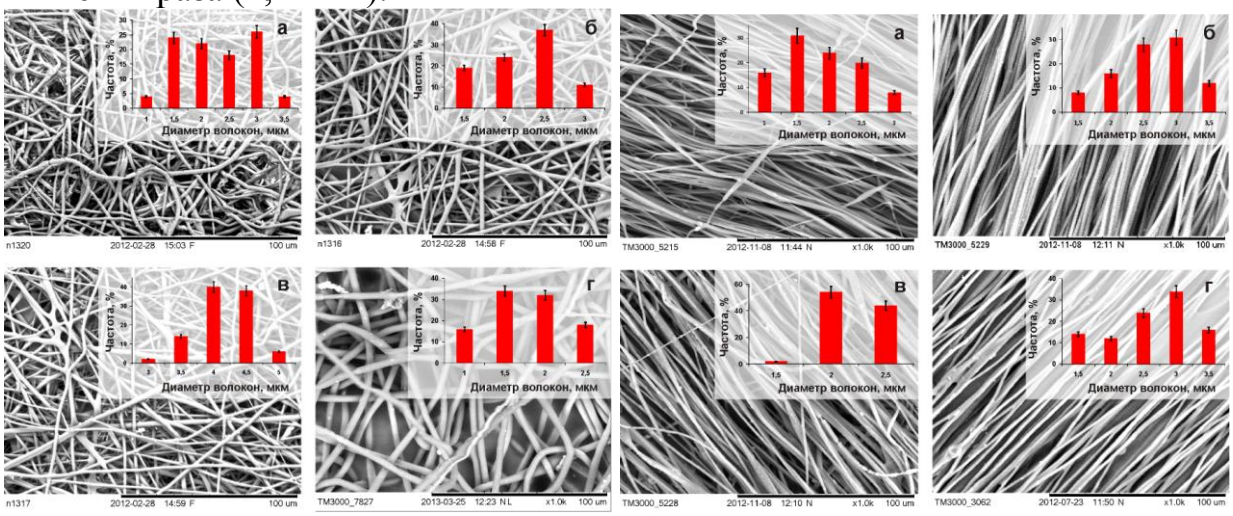


Рисунок 11 – РЭМ снимки структуры нетканых мембран, образованных неориентированными (слева) и ориентированными (справа) УВ из ПГА состава: а – П(3ГБ); б – П(3ГБ/10,5 мол.%-3ГВ); в – П(3ГБ/10,0 мол.%-4ГБ); г – П(3ГБ/10,0 мол.%-3ГГ)

Результаты сопоставления физико-механических характеристик УВ, полученных из ПГА различного химического состава (таблица 2), показали, что, независимо от химического состава, все сополимерные изделия, в отличие от полученных из П(3ГБ), имели более высокие показатели удлинения при разрыве, что говорит об их повышенной эластичности, при этом характеризовались значительно сниженной прочностью по двум показателям (модуль Юнга и разрывная нагрузка). Сопоставление образцов с равным содержанием второго мономера показало, что выраженность влияния химического состава сополимеров ПГА на эти показатели различна. Наличие мономера 4ГБ в ПГА в наибольшей степени по сравнению с 3ГВ и 3ГГ мономерами снижало механическую прочность изделий относительно П(3ГБ): по модулю Юнга от 356,23±40,62 до 1,59±0,30 МПа; по разрывной прочности – от 9,32±2,54 до 0,42±0,08 МПа; далее следуют 3ГВ, соответственно, до 5,81±1,06 и 0,67±0,06 МПа и 3ГГ – до 18,68±2,85 и 0,76±0,10 МПа.

Обратное по выраженности влияние обнаружено для влияния этих же мономеров относительно разрывного удлинения, значение которого составило у П(3ГБ) 13,3±3,11 и было существенно выше у сополимерных изделий: возросло у сополимеров П(3ГБ/10,0 мол.%-3ГГ) до 29,45±4,61 %; у П(3ГБ/10.5мол.%-3ГВ) – до 40,72±6,20 % и у П(3ГБ/10,0 мол.%-4ГБ) – наиболее значительно, до 72,98±10,33 %. Таким образом, при анализе влияния величины фракции второго мономера на изменения механических характеристик образцов неориентированных волокон однозначной картины не получено.

Далее из набора образцов ПГА, аналогичных по составу предыдущим исследованиям было получено семейство ориентированных волокон. У ориентированных волокон, полученных из П(3ГБ), средний диаметр составил 2,1 мкм. Диаметр сополимерных ориентированных волокон в отличие от неориентированных имел близкие значения. Волокна из сополимера П(3ГБ/3ГВ) по диаметру были сопоставимы с неориентированными (около 2,5 мкм); средний диаметр волокон из П(3ГБ/3ГГ) составил 2,2 мкм, а из П(3ГБ/4ГБ) – 2,7 мкм. Ширина распределения диаметра волокон у всех ориентированных образцов была близка 2 мкм, что сопоставимо с этим показателем для неориентированных образцов. Толщина ЭСФ мембран, сформированных ориентированными волокнами, составила 25–30 мкм, что сопоставимо с этим параметром для неориентированных, полученных при одинаковых условиях формования. Первое, что отличает ориентированные УВ, от неориентированных, это значительно более высокие значения показателей механической прочности (таблица 2). Второе, в отличие от характера влияния типа второго мономера на характеристики неориентированных матов у ориентированных образцов, полученных из сополимеров, содержащих мономеры 3ГВ и 3ГГ значения разрывного удлинения и модуля Юнга, были близки и не на много снижались по сравнению с показателями у П(3ГБ), при этом в 2 раза отличались по

эластичности. И самое существенное, – в отличие от неориентированных, для сополимерных ориентированных мембран с ростом фракции второго мономера наблюдали выраженную зависимость измеряемых показателей. Рисунок 11 наглядно иллюстрирует влияние ориентированности УВ в мембранах на разрывную прочность.

Таблица 2 – Физико-механические характеристики нетканых мембран, полученных из ПГА различного химического строения и сформированных УВ разной структурной ориентации

№ п/п	Состав ПГА, мол.%	Модуль Юнга, Е, МПа	Напряжение при разрыве, σ, МПа	Удлинение на разрыв ε, %
неориентированные УВ				
1	П(3ГБ) (100 мол.%)	356,23±40,62	9,32±2,54	13,3±3,11
2	П(3ГБ/4,5 мол.%-3ГВ)	9,61±1,85	0,75±0,08	47,36±7,21
3	П(3ГБ/10,5 мол.%-3ГВ)	5,81±1,06	0,67±0,06	40,72±6,20
4	П(3ГБ/32,8 мол.%-3ГВ)	13,91±2,07	0,80±0,09	38,33±5,34
5	П(3ГБ/4,9 мол.%-3ГГ)	22,58±3,24	0,94±0,12	63,25±9,85
6	П(3ГБ/10,0 мол.%-3ГГ)	18,68±2,85	0,76±0,10	29,45±4,61
7	П(3ГБ/13,6 мол.%- 3ГГ)	21,28±3,64	0,58±0,11	21,59±3,17
8	П(3ГБ/6,1 мол.%-4ГБ)	3,61±0,85	0,82±0,09	58,95±8,51
9	П(3ГБ/10,0 мол.%-4ГБ)	1,59±0,30	0,42±0,08	72,98±10,33
10	П(3ГБ/13,6 мол.%-4ГБ)	2,91±0,75	1,26±0,23	102,37±12,55
11	П(3ГБ/20,3 мол.%-4ГБ)	2,32±0,62	1,01±0,15	117,33±14,30
12	П(3ГБ/38,0 мол.%-4ГБ)	1,22±0,36	1,46±0,21	177,74±20,67
13	П(3ГБ/48,3 мол.%-4ГБ)	1,60±0,54	0,81±0,09	118,93±15,76
ориентированные УВ				
1	П(3ГБ) (100 мол.%)	543,03±72,45	11,17±2,33	9,90±3,21
2	П(3ГБ/4,5 мол.%-3ГВ)	824,04±78,23	14,18±2,17	10,11±1,24
3	П(3ГБ/10,5 мол.%-3ГВ)	463,52±49,08	12,26±2,65	11,56±2,10
4	П(3ГБ/32,8 мол.%-3ГВ)	321,90±27,33	14,13±2,05	91,16±7,32
5	П(3ГБ/4,9 мол.%-3ГГ)	563,61±61,56	16,27±1,91	14,83±2,13
6	П(3ГБ/10,0 мол.%-3ГГ)	431,04±38,42	10,26±2,23	20,69±3,61
7	П(3ГБ/13,6 мол.%- 3ГГ)	479,95±52,62	12,71±2,32	50,00±4,66
8	П(3ГБ/6,1 мол.%-4ГБ)	817,50±76,81	15,33±3,71	13,10±2,00
9	П(3ГБ/10,0 мол.%-4ГБ)	193,70±22,30	5,70±0,82	52,46±6,32
10	П(3ГБ/13,6 мол.%-4ГБ)	113,54±9,85	9,30±1,24	180,33±20,71
11	П(3ГБ/20,3 мол.%-4ГБ)	77,94±8,41	15,74±2,12	262,29± 32,41
12	П(3ГБ/38,0 мол.%-4ГБ)	5,50±4,22	11,91±1,56	245,90± 22,54
13	П(3ГБ/48,3 мол.%-4ГБ)	4,12±1,68	4,92±0,62	311,47± 44,37

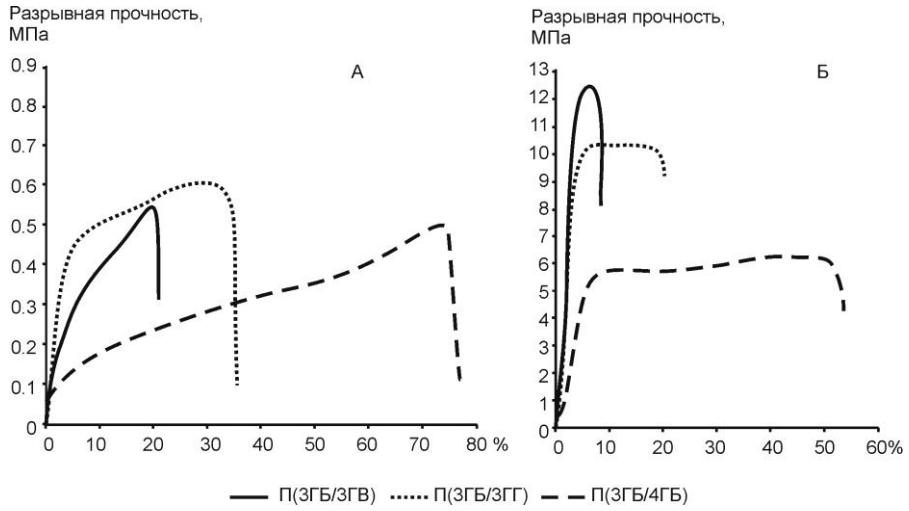


Рисунок 11 – Разрывная прочность неориентированнных (А) и ориентированных (Б) ультратонких волокон, полученных методом ЭСФ из ПГА различного химического состава, но с близким содержанием второго мономера: П(3ГБ/10,5 мол.% 3ГВ); П(3ГБ/10,0 мол.% 4ГБ); П(3ГБ/10,0 мол.% 3ГГ)

При увеличении содержания мономера 3ГВ в сополимере П(3ГБ/3ГВ) от 4,5 мол.% до 32,8 мол.%, модуль Юнга закономерно уменьшался от 824,04±78,23 до 321,90±27,33, при этом разрывная прочность практически не менялась и составляла 14 МПа, при этом удлинение при разрыве увеличилось от 10,11±1,24% до 91,16±7,32%. Для П(3ГБ/4ГБ) при увеличении фракции мономеров 4ГБ от 6,1 до 48,3 мол.%, также наблюдали постепенное и более выраженное уменьшение модуля Юнга от 817,50±76,81 до 4,12±1,68 МПа при незначительном снижении разрывной прочности на фоне увеличения показателя удлинения на разрыв от 13,10±2,00 до 311,47±45,37%. В случае мембран из сополимера П(3ГБ/3ГГ) с увеличением включения мономера 3ГГ от 4,9 до 13,6 мол.% достоверных изменений модуля Юнга выявлено не было, показатель постепенно увеличился в 3 раза. Самые высокие показатели удлинения при разрыве характерны для ориентированных УВ, сформованных из сополимера П(3ГБ/10,5 мол.% 3ГВ), а самая высокая эластичность – для неориентированных УВ, полученных из П(3ГБ/10,0 мол.% 4ГБ). По степени влияния на физико-механические характеристики наибольшее влияние на диаметр и морфологию волокон оказывает плотность полимерных растворов и в меньшей степени – химический состав ПГА.

Таким образом, показано, что, используя разные типы ПГА и принимающей мишени, можно получать ЭСФ изделия с различными показателями механической прочности и эластичности.

Результаты исследования биологической совместимости нетканых мембран из ПГА различного состава в культуре клеток in vitro

Биологические свойства полимерных УВ, полученных методом ЭСФ из ПГА различного химического строения с разной структурной ориентацией, исследованы в культуре фибробластов NIH 3T3 (Рисунок 12). Значительные отличия по отношению к культивируемым фибробластам выявлены при

сравнении влияния химического состава ПГА. При этом количество клеток в контроле (полистирол) по сравнению с ПГА было ниже в 2 и более раза.

Результаты анализа количества жизнеспособных клеток в МТТ тесте показали, что сополимеры, содержащие в качестве второго мономера 3ГВ и 4ГБ, обеспечили более высокий (примерно в 1,4 раза) прирост клеток на неориентированных УВ по сравнению с результатом, где был использован П(3ГБ). Клетки, выращиваемые на ориентированных УВ, были распределены вдоль волокон, преимущественно веретеновидной формы. На неориентированных УВ клетки также распределялись по волокнам, преобладали клетки треугольной или прямоугольной формы. Ориентация волокон также влияла на количество жизнеспособных фибробластов (Рисунок 13).

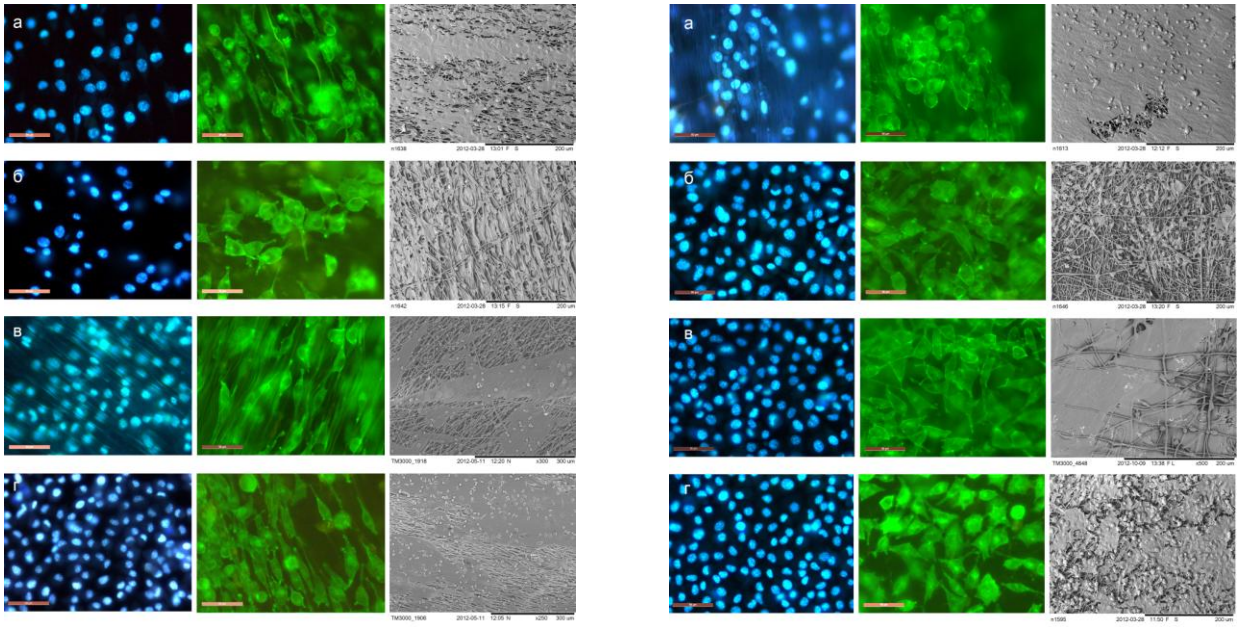


Рисунок 12 – Морфология фибробластов NIH 3T3 (7-ми суточная культура), выращиваемых на неориентированных (слева) и ориентированных (справа) мембранах, образованных УВ из ПГА различного химического состава: а – П(3ГБ); б – П(3ГБ/10,5 мол.% 3ГВ); в – П(3ГБ/10,0 мол.% 4ГБ); г – П(3ГБ/10,0 мол.% 3ГГ). Окраска DAPI, маркер – 50 мкм; FITC, маркер 50 мкм, РЭМ снимки, маркер 200 мкм

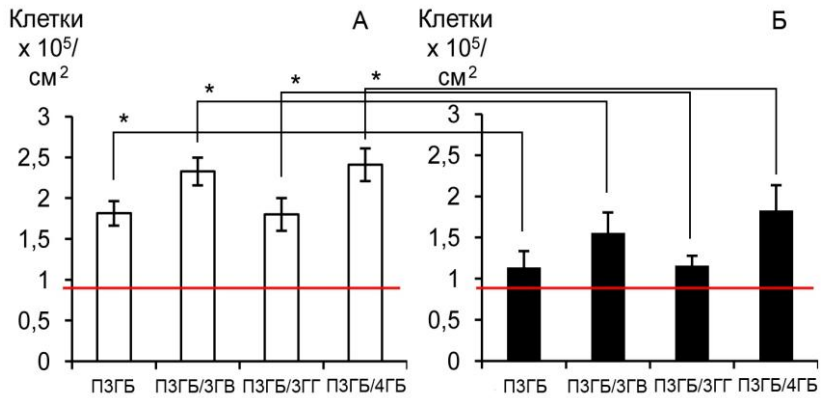


Рисунок 13 – Количество клеток (МТТ тест) в культуре фибробластов NIH 3T3 (7 суток): А – неориентированные; Б – ориентированные УВ из ПГА: (красная линия – контроль полистирол)

Количество жизнеспособных фибробластов на всех типах ориентированных УВ было ниже, чем на неориентированных. Влияние химического состава ПГА на количество клеток на ориентированных УВ было таким же, как и на неориентированных, и также достоверно самый высокий прирост клеток получен на сополимерах П(3ГБ/4ГБ). В целом, все типы полученных методом ЭСФ изделий из ПГА обеспечивают лучший рост фибробластов по сравнению с контролем и пригодны в качестве опорных носителей для выращивания клеток.

Исследование нетканых мембран из ПГА в качестве раневых покрытий

Нетканые неориентированные ЭФС мембраны из сополимера П(3ГБ/4ГБ), которые показали наиболее высокие показатели по адгезии и количеству жизнеспособных фибробластов в культуре, исследованы в качестве раневых покрытий на лабораторных животных с модельными ожогами кожных покровов II степени. Экспериментальным животным дефект закрывали экспериментальной ЭСФ полимерной мембраной; в контроле – лиофилизированной коллагеновой повязкой. После формирования ожогов гибели среди животных не отмечено. Признаков гнойных осложнений в сроки 3 суток не выявлено. Визуальный осмотр ран у животных обеих групп показал наличие местных признаков воспаления в виде незначительной отёчности и гиперемии окружающих мягких тканей. Гистологическая картина поверхности раны у контрольных и у экспериментальных животных была сходной. Эпидермальный слой с базальной мембраной и сосочковый слой дермы в области раны отсутствовали, в сетчатом слое дермы наблюдали деформацию; волосяные фолликулы отсутствовали; отмечена высокая уплотненность волокон межклеточного матрикса, что сопровождалось нарушением архитектоники коллагеновых волокон. Морфология ран свидетельствовала о воспалительном процессе. Через 7 суток признаки гнойных осложнений отсутствовали. В области раневой поверхности у всех животных отмечена нормализация структуры сетчатого слоя дермы и активное формирование сосочкового слоя дермы, сопровождающееся активным формированием дериватов кожи. Архитектоника волокон межклеточного матрикса дермы имела такое же строение, что и в неповрежденных участках кожи Формирование дермы в области раны было в значительной степени завершено в обеих группах животных. У всех животных, независимо от типа раневой повязки, наблюдали активную регенерацию кожи; под экспериментальной ЭСФ мембраной, полученной из сополимера П(3ГБ/4ГБ) показатели восстановления дермы были сопоставимыми с коллагеновой повязкой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезировано семейство ПГА разного химического состава с различным набором и соотношением мономеров. Исследованы свойства полимеров и показана значительная вариабельность степени

кристалличности (20-76 %) и в меньшей – степени температурных характеристик в зависимости от соотношения мономеров. Исследованы условия и разработана технология получения нетканых мембран методом электростатического формования растворов (ПГА) с учетом плотности полимерных растворов, химического состава полимеров и параметров формования. Определены режимы, обеспечившие получение нетканых мембран, сформированных ориентированными и неориентированными ультратонкими волокнами различного диаметра, различающиеся структурой поверхности и физико-механическими характеристиками. Нетканые мембраны из всех типов ПГА обладают биологической совместимостью, обеспечивая высокую адгезию и пролиферацию фибробластов NIH 3T3 в культуре *in vitro*. Разработанные и охарактеризованные ЭСФ мембраны из ПГА положительно оценены в качестве опорных носителей для культивирования клеток и в качестве раневых покрытий ожоговых ран. Проведена сертификация эластичных нетканых мембран из сополимеров П(3ГБ/4ГБ) в соответствие с разработанными Техническими условиями ТУ 9390-009-02067876-2015 «Материалы медицинские из разрушаемых природных сополимеров 3-гидроксимасляной 4-гидроксимасляной кислот»; серия мембран передана для исследований в клинические учреждения. Результаты являются составной часть проекта НИОКР «Организация исследований, разработок и опытно-промышленного производства материала на основе полимеров микробного происхождения, способных к деструкции» вошли в Технологический регламент получения материалов на основе полимеров, способных к деструкции.

ВЫВОДЫ

1. В периодической культуре *Cupriavidus eutrophus* B-10646 при изменении условий углеродного питания с контролируемой подачей субстратов-предшественников синтезировано семейство полигидроксиалканоатов различного химического состава: гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты [П(3ГБ)] и сополимеры 3ГБ с 4-гидроксибутиратом [П(3ГБ/4ГБ)], 3-гидроксивалератом [П(3ГБ/3ГВ], 3-гидроксигексаноатом [П(3ГБ/3ГГ)] с варьированием соотношения мономеров в широких пределах.

2. Исследованы физико-химические свойства полимеров с различным набором и соотношением мономеров и показано, что химический состав мономеров наиболее значительное влияние оказывает на степень кристалличности, которая у сополимерных образцов составляет от 20 до 50% относительно гомополимера П(3ГБ) (70-76%). Включение в С-цепь поли-3-гидроксибутирата исследованных мономеров 4ГБ, 3ГВ или 3ГГ незначительно снижает температуру плавления ($T_{пл}$) и термической деградации (T_{degr}) относительно этих величин у гомогенного П3ГБ (175±5 и 275±5 ^{o}C, соответственно), и эти изменения тем более значительны, чем выше содержание в цепи П(3ГБ) второго мономера, без сокращения разрыва между этими показателями, который составляет 90-100 ^{o}C.

3. В культуре фибробластов NIH 3T3 *in vitro* показано, что все типы синтезированных и исследованных пленочных ПГА не проявляют токсичности при прямом контакте с клетками, обладают высокой биологической совместимостью, сопоставимой с полистиролом, и обеспечивают высокую адгезию и пролиферацию фибробластов.

4. Исследованы параметры процесса ЭСФ растворов ПГА с различным набором и соотношением мономеров и получено пионерное семейство ЭСФ мембран, образованных ориентированными и неориентированными ультратонкими волокнами. Показано, что сополимерные мембраны обладают повышенной эластичностью, но сниженной прочностью; самые высокие показатели напряжения при разрыве (16,27±1,91 МПа) характерны для ориентированных мембран П(3ГБ/3ГГ), самая высокая эластичность (удлинение при разрыве – 177,74±20,67 %) – у неориентированных мембран из П(3ГБ/4ГБ).

5. Установлено, что все типы ЭСФ-мембран из ПГА различного химического состава обладают высокой адгезионной способностью и биологической совместимостью по отношению к культивируемым фибробластам и пригодны в качестве опорных носителей для клеточных технологий.

6. В экспериментах на лабораторных животных с модельными ожогами кожных покровов показана пригодность эластичных нетканых ЭСФ-мембран из сополимеров П(3ГБ/4ГБ) в качестве раневых покрытий; которые обеспечивают активную регенерацию раны, сопоставимую с коллагеновой повязкой.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. **Гончаров Д.Б.** Реология растворов полигидроксиалканоатов / Д.Б. Гончаров, А.Г. Суковатый // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2016. – Т. 8. – № 2. – С. 190–197.

2. **Гончаров Д.Б.** Свойства нетканых изделий из поли-3-гидроксибутирата, полилактида, полигликолида и поли(лактид-гликолида) при различных способах электростатического формования / Д.Б. Гончаров, А.Г. Суковатый // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2016. – Т. 8. – № 2. – С. 212–222.

3. Боровкова Н.В. Исследование биологической совместимости плёнок и нетканых мембран из сополимера 3-гидроксимасляной и 4-гидроксимасляной кислот в культурах клеток in vitro / Н.В. Боровкова, А.К. Евсеев, М.С. Макаров, И.В. Горончаровская, О. Н. Виноградова, Е.Д. Николаева, **Д.Б. Гончаров** // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2016. – Т. 8. – № 1. – С. 86–92.

4. Боровкова Н.В. Конструирование и оценка нетканых мембран из разрушаемых природных полимеров полигидроксиалканоатов (ПГА) в качестве раневых покрытий / Н.В. Боровкова, А.К.Евсеев, Ю.В. Андреев,

Д.Б. Гончаров, Е.И. Шишацкая // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2016. – Т. 8. – № 1. – С.110–117.

5. **Гончаров Д.Б.** Влияние ориентированности на свойства ультратонких волокон, полученных методом электростатического формования из поли-3-гидроксибутирата / **Д.Б. Гончаров**, А.Г. Суковатый // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2014. – Т.7. – № 2. – С. 186–194.

6. Volova T. G. Electrospinning of polyhydroxyalkanoate fibrous scaffolds: effects on electrospinning parameters on structure and properties / T.G. Volova, **D.B. Goncharov**, A.G. Sukovatyi, A.V. Shabanov, E. D. Nikolaeva, E.I. Shishatskaya // Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. – 2014. – № 25. – С. 370–393.

7. Волова Т.Г. Влияние параметров электростатического формования на характеристики наноматриксов из разрушаемых полиэфиров «Биопластотан» / Т.Г. Волова, **Д.Б. Гончаров**, А.Г. Суковатый, Е.И. Шишацкая // Пластические массы. – 2013. – № 7. – С. 52–56.

8. **Гончаров Д.Б.** Характеристики ультратонких волокон, полученных методом электростатического формования из поли-3-гидроксибутирата/ Д.Б. Гончаров, Е.Д. Николаева, А.Г. Суковатый, А.В. Шабанов, Е.И. Шишацкая, Н.М. Маркелова // Journal of Siberian Federal University. Biology. – 2012. – Т. 4. – № 5. – P. 418–427.

9. Николаева Е.Д. Влияние обработки H_2O_2-плазмой на свойства клеточных носителей из резорбируемых полиэфиров «Биопластотан» / Е.Д. Николаева, **Д.Б. Гончаров**, Е.И. Шишацкая // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. VI. – № 2. – С. 65–70.

Тезисы докладов и материалов конференций:

10. **Гончаров Д.Б.** Влияние способов стерилизации на свойства поверхности полигидроксиалканоатов / Д.Б. Гончаров, Е. Д. Николаева // Материалы XLIX Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс». Новосибирск. – 2011. – С. 191.

11. Николаева Е.Д. Влияние обработки плазмой H2O2 на свойства опорных клеточных матриксов из полигидроксиалканоатов / Е.Д. Николаева, **Д.Б. Гончаров** // Материалы 16-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых. Пущино. – 2012. – С. 409.

12. **Гончаров Д.Б.** Конструирование опорных клеточных матриксов из полигидроксиалканоатов с различной ориентацией ультратонких волокон / Д.Б. Гончаров // Материалы международного научного семинара с молодежной школой «Биотехнология новых материалов и окружающая среда». Красноярск. – 2012. – С. 43-46.

13. **Гончаров Д.Б.** Сравнительное исследование матриксов разной геометрии, полученных из сополимеров поли-(3-гидроксибутирата-со-4-гидроксибутирата) / Д.Б. Гончаров, Е. Д. Николаева // Материалы международного научного семинара с молодежной школой «Биотехнология новых материалов и окружающая среда». Красноярск. – 2012. – С. 46-49.

14. **Гончаров Д.Б.** Влияние ориентации ультратонких волокон на свойства опорных клеточных матриксов из полигидроксиалканоатов / Д.Б. Гончаров, Е. Д. Николаева // Тезисы докладов Международной научно-практической конференции «Инновационные биотехнологии в странах ЕВРАЗЭС». Санкт-Петербург. – 2012. – С. 123-124.

15. **Goncharov D. B.** Electrospinning of polyhydroxyalkanoate fibrous scaffolds: effects on electrospinning parameters on structure and properties / D. B. Goncharov, A. G. Sukovatyi, E. D. Nikolaeva, E. I. Shishatskaya, T. G. Volova // 4th International Congress “Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues”, «BIONANOTOX-2013». Greece, Heraklion, Crete. – 2013. – P. 36.

16. **Гончаров Д.Б.** Электростатическое формование нетканых матриксов из ПГА: влияние параметров процесса на структуру и свойства / Д.Б. Гончаров // Тезисы конкурса-конференции молодых учёных и аспирантов ИБФ СО РАН. Красноярск. – 2014. – С. 4.