

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет  
им. М.К. Аммосова»  
Институт естественных наук  
Химическое отделение

**НИКОЛАЕВА ИЗАБЕЛЛА ЕГОРОВНА**

**СВОЙСТВА И СТРУКТУРА БИОРАЗЛАГАЕМЫХ МАТЕРИАЛОВ НА  
ОСНОВЕ PLA В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание степени магистра

Направление подготовки 04.04.01 Химия.

Химическое материаловедение

Якутск, 2021 г.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность работы.**

Кожа является самым большим органом млекопитающих, служащим защитным барьером на границе раздела между телом человека и окружающей средой. В связи с пограничным расположением кожа постоянно подвергается воздействию потенциально вредных микробиологических, термических, механических и химических факторов.

Среди многочисленных травм одним из самых распространенных являются ожоги. Процесс лечения ожогов является само по себе сложным и высоко затратным процессом. Кроме того, не все остаются довольными результатом лечения, так как высок риск образования шрамов и рубцов. Разработка и внедрение в клиническую практику новых биотехнологических аналогов (эквивалентов) тканей и органов, в частности эквивалентов кожи (ЭК) человека, призванных временно или постоянно заменять поврежденные или разрушенные ткани, остается актуальной задачей регенеративной медицины.

### **Цель и задачи работы**

Разработка нового биodeградируемого дермального эквивалента кожи на основе полилактида и исследование его различных свойств.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Проведение анализа литературных источников;
2. Освоение технологии получения образцов пленок из полилактида методом экструзии;
3. Исследование физико-механических характеристик полученных образцов;
4. Исследование образцов методами ДСК, ИК-спектроскопии и РЭМ;
5. Исследование скорости и степени биорезорбции полученных образцов в среде, приближенной к физиологическому, методом атомно-силовой микроскопии;
6. Разработка клеточной культуры с последующей их адгезией на разработанную полимерную матрицу, оценка количественных и качественных изменений;

7. Исследование степени влияния растворимых компонентов матрицы на жизнеспособность культивируемых клеток;
8. Создание лабораторного образца биотехнологической композитной матрицы – кожного эквивалента на основе биodeградируемого материала.

### **Научная новизна.**

Разработка технологии получения пленок для дермальных эквивалентов кожи методом экструзии. Исследование пролиферативной активности и адгезивной способности культивируемых клеток на полилактидные пленки разной толщины с добавлением адгезивного фактора и без.

### **Практическая значимость**

Разработанные биоразлагаемые матрицы для дермальных эквивалентов (МДЭ) на основе полилактида с улучшенной совместимостью с тканями организма смогут применяться в регенеративной медицине. Использование таких дермальных эквивалентов позволит осуществлять однократное нанесение матрицы на пораженные участки кожи без повторных обработок, что означает безрубцовое заживление кожных тканей организма.

### **Основное содержание работы**

В **первой главе** представлен материал по литературным источникам. Рассматривается полилактид как наиболее альтернативный материал для использования в качестве матрицы дермальных эквивалентов. Рассмотрены улучшение адгезии и пролиферации клеток на поверхность биodeградируемой матрицы из полилактида путем увеличения пористости и шероховатости материала.

Во **второй главе** описаны объекты и методы лабораторных исследований. В качестве полимерной матрицы был выбран ПЛА марки Nature Works 4043D (США). Выбор этой марки обоснован тем, что компания Nature Works является одним из самых крупных производителей ПЛА во всем мире. Марка ПЛА 4043D используется при переработке методом экструзии и при производстве пленок, а также степень чистоты позволяет использовать эту марку для биомедицинских целей.

Была разработана технологическая схема получения пленок из ПЛА, которая представлена на рисунке 1. Технология разработана на основе температурных

режимов переработки полилактида методом экструзии. Полилактидные пленки были получены на экструдере Brabender (Германия). Стадия переработки включает сушку исходного полилактида в сушильной печи ПЭ-0041 при  $T=80^{\circ}\text{C}$  в течение трех часов. Для получения пористого материала в качестве наполнителя использован хлорид натрия, вследствие его характеристик, простоте использования и доступности. Механоактивацию наполнителя проводили в планетарной мельнице «Активатор-2S» в течение двух минут. В результате были получены пленки толщиной от 100 до 200 мкм.

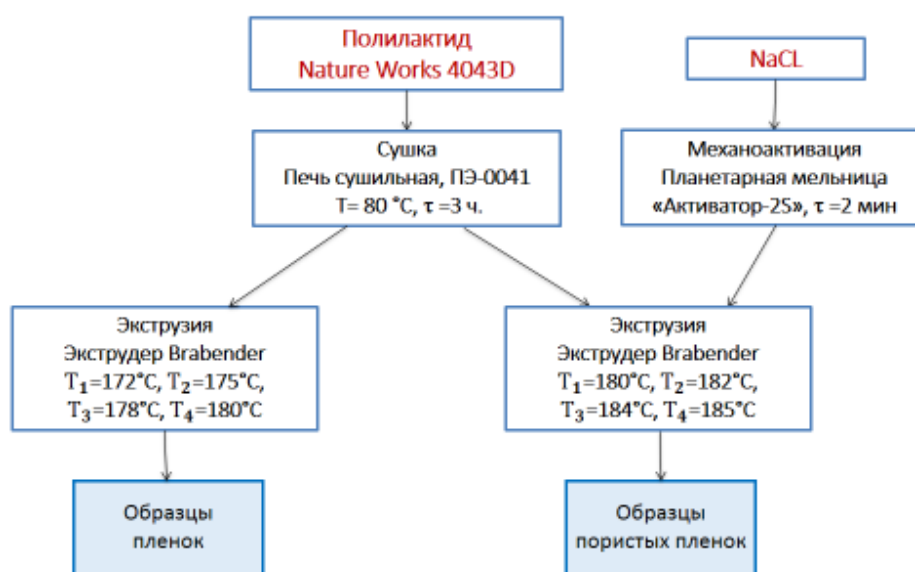


Рисунок 1 – Технологическая схема получения пленок

Исследования физико-механических свойств образцов были проведены по ГОСТ 14236-81 на разрывной машине Autograph фирмы Shimadzu (Япония). Для установления процессов, протекающих при повышении температуры образцы пленок ПЛА исследованы на дифференциально сканирующем калориметре DSC 204 F1 Phoenix «NETZSCH». Структурные исследования образцов МДЭ были проведены методом ИК-спектроскопии на ИК-спектрометре с Фурье-преобразованием Varian 7000 FT-IR (США). Рельеф поверхности образцов был снят на атомно-силовом микроскопе. Исследование пролиферативной активности культивируемых клеток на поверхность полилактидных пленок было проведено на растровом электронном микроскопе JEOL JSM-7800F.

Исследования на пролиферацию культивируемых клеток на пленки из ПЛА разной толщины были проведены методом *in vitro* в НИЛ «Клеточные технологии и регенеративная медицина» МИ СВФУ. Культивируемые фибробласты были

выделены из рыхлой волокнистой соединительной ткани брюшины добровольца. Была исследована пролиферация культивируемых клеток на полилактидные пленки в зависимости от наличия адгезивного фактора АФ. Ежедневный подсчет клеток производился по снимкам инвертированного микроскопа (ЛОМО, Россия) с увеличением в 60 раз (окуляр x15, объектив x 4) и визуализацией 5 полей зрения на каждой лунке. Для подсчета клеток была произведена суправитальная окраска методом Романовского-Гимза (15 мин) с предварительной фиксацией по Майн-Грюнвальду (5 мин).

В третьей главе приведены результаты исследований и их обсуждения.

Для подтверждения адекватности разработанной технологии переработки ПЛА были проведены исследования физико-механических характеристик блочных образцов для сравнения с литературными данными. Результаты исследования физико-механических свойств чистого полилактида в сравнении с литературными данными представлены в табл. 1.

Таблица 1. Физико-механические свойства чистого ПЛА

	Относительное удлинение при разрыве $\Delta\epsilon_r$ , %	Модуль упругости при растяжении E, МПа	Предел прочности при разрыве, МПа
Результаты испытаний	3,5	659,83	55,51
Справочные данные	3,8	350-2800	57,8

Полученные результаты соответствуют данным, которые приводятся в работе авторов Д.В. Севастьянов, И.В. Сутубалов, М.И. Дасковский, Е.А. Шеин. Полимерные биоконпозиты на основе биоразлагаемых связующих, армированных натуральными волокнами (обзор).

Далее были проведены физико-механические исследования ПЛА пленок, результаты которых приведены в табл.2

Таблица 2. Физико-механические характеристики пленок из ПЛА

Толщина пленок, мкм	Удлинение, %	Модуль упругости при растяжении E, МПа	Макс напряжение, МПа	Предел прочности при разрыве, МПа
100	3,5	3540,9	68,4	64,3
150	3,5	2775,5	47,5	45,8
200	3,5	2629,7	49,3	52,8

Анализ результатов позволяет сделать заключение, что наиболее высокими прочностными характеристиками обладает пленка толщиной 100 мкм. Повышение модуля упругости при растяжении от большей толщины к меньшему объясняется тем, что у пленок с толщиной 100 мкм более уплотненная структура, характеризующаяся упорядоченным расположением структурных образований.

Для установления фазовых переходов в полученных пленках из полилактида проведены исследования термодинамических характеристик образцов методом ДСК. Термограммы фазовых переходов ПЛА при нагревании образца в ячейке калориметра представлены на рис. 2.

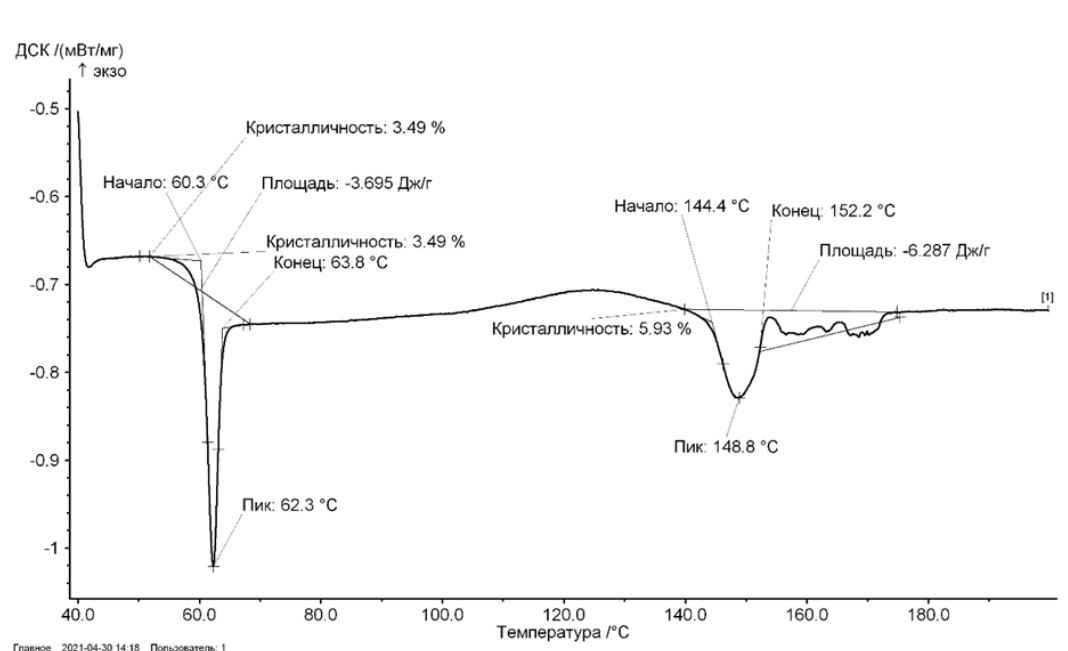


Рисунок 2 – Кривая ДСК полученного образца из полилактида

Как видно из кривой ДСК образец пленки из ПЛА имеет два эндотермических пика. Первый пик в диапазоне от 60 до 63 °С соответствует температуре стеклования, второй эндотермический пик при 144-152 °С отвечает температуре плавления полимера, кроме того, между 100 и 140°С наблюдается экзотермический пик кристаллизации. В соответствии с литературными данными, значение температуры плавления указывает на то, что используемый полилактид получен из смеси L- и D-изомеров. Достаточно низкая степень кристалличности указывает на высокое содержание D-изомеров. С другой стороны довольно высокий уровень температуры стеклования свидетельствует об отсутствии мезоформ молочной кислоты в структуре полилактида. Таким образом, данная марка ПЛА относится больше к полимеру с аморфной структурой, чем с кристаллической, что однако не является ограничивающим фактором для создания матриц, подходящих в качестве дермальных эквивалентов.

Структурные исследования полученных пленок включали исследование образцов методом ИК-спектроскопии, результаты которой представлены на рис. 3.

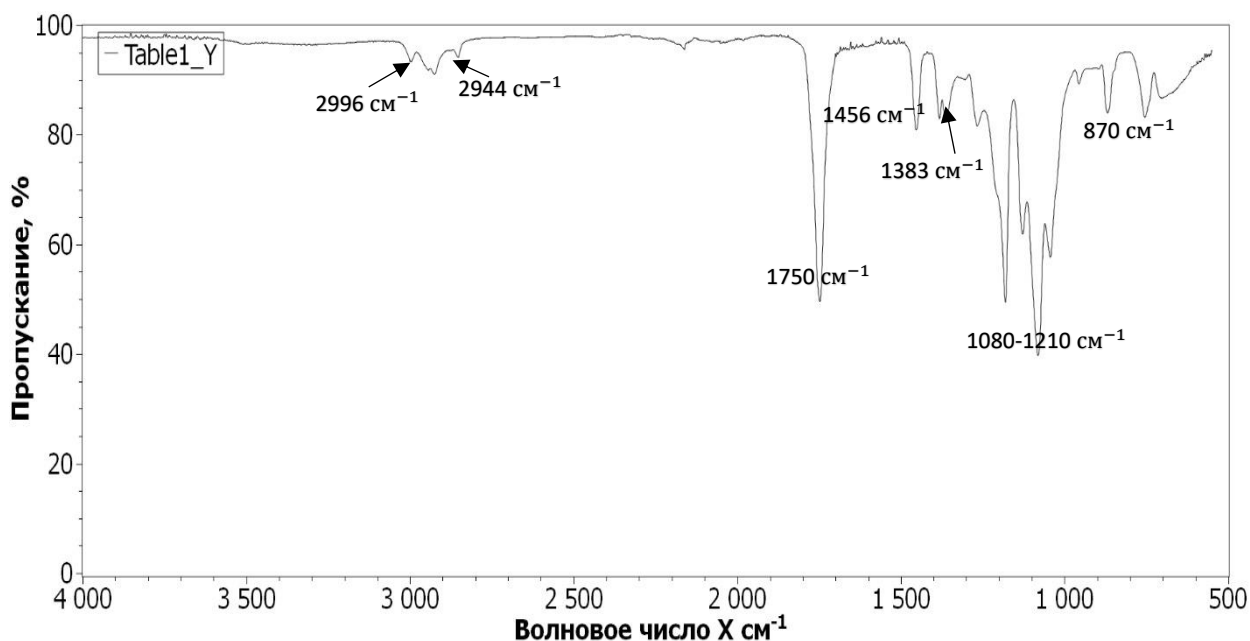


Рисунок 3 – ИК-спектры полученного образца из полилактида

В таблице 3 приведены характеристические полосы полилактида, обнаруженные на ИК-спектрах образцов, которые соответствуют литературным данным.

Таблица 3 - Полосы характеристических колебаний ИК-спектра пленок из ПЛА

Диапазон частот, см <sup>-1</sup>	Отнесение
2944, 2996	Валентные симметричные и ассиметричные колебания $\nu$ СН группы, связанной с СН <sub>3</sub> группой
1750	Валентные колебания карбонильной группы С=О
1383, 1456	СН <sub>3</sub> деформационные колебания
870, 1080-1210	Валентные симметричные и ассиметричные колебания в С-О-С группе

Был проведен сравнительный анализ культивируемых клеток на пленки из ПЛА разной толщины в течение 4-х дней в зависимости от наличия адгезивного фактора АФ. Подсчитывалось количество округлых (не прикрепившихся) и вытянутых (прикрепившихся) фибробластов, а также их сумма – общее число клеток (рис. 4).

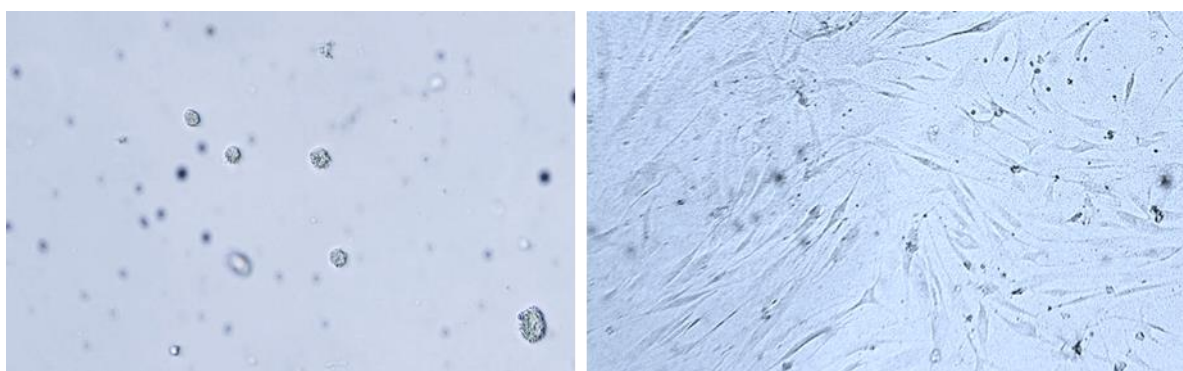


Рисунок 4 - Округлые не прикрепившиеся фибробласты в день посадки (слева) и на 4-й день культивирования (справа) – веретенообразные прикрепившиеся клетки

Сравнительный анализ общего числа клеток (круглые и вытянутые клетки) в исследуемых лунках в зависимости от обработки АФ выявил, что наличие адгезивного фактора увеличивает рост количества клеток в 1,98 раз (рис. 5).



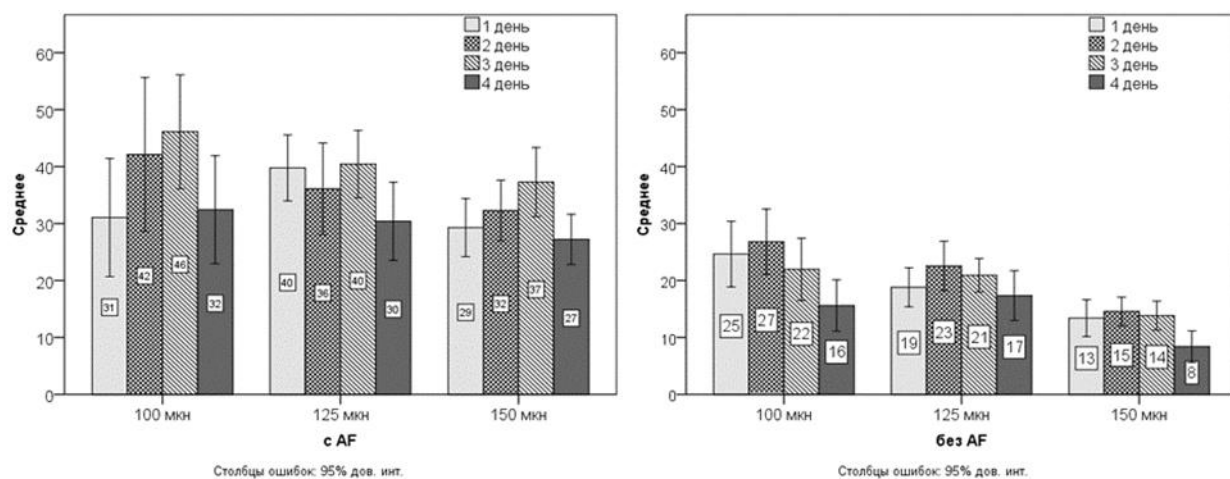


Рисунок 5 - Общее количество клеток в лунках с AF и без AF в динамике

При ежедневном подсчете под инвертированным микроскопом количества клеток в лунках в зависимости от толщины полилактидных пленок были выявлены следующие особенности:

- наибольшее количество прикрепленных фибробластов (вытянутых клеток) в лунках с AF на первый день культивирования зафиксировано на пленках толщиной 125 мкм;
- на второй и третий день культивирования количество прикрепленных фибробластов в лунках с AF стало наибольшим на пленках толщиной 100 мкм;
- отмечена тенденция достижения наибольшего количества прикрепленных фибробластов на всех подложках в лунках с AF на третий день культивирования;
- для лунок без AF наибольшее количество прикрепленных клеток отмечается на всех пленках независимо от их толщины на 2 день культивирования (рис.5).

Снижение пролиферативного потенциала фиброластов на 4-й день культивирования очевидно связано с истощением энергетических ресурсов и накоплением продуктов обмена (в течение 5 дней не обновлялась питательная среда), что может привести к задержке пролиферативной активности, а также с прикреплением клеток на верхней стороне полилактидной пленки и, соответственно, с недостаточно четкой визуализацией (из-за толщины пленки) под инвертированным микроскопом.

В последний день культивирования, не прикрепленные к пленкам клетки были удалены фосфатно-солевым буфером (PBS). Подсчет прикрепившихся клеток проводился с помощью суправитального окрашивания по методу Романовского-Гимзе.

Сравнительный анализ адгезивной способности фибробластов в зависимости от толщины полилактидной пленки показал статистически значимые различия. Количество клеток, прикрепившихся на поверхность пленок с толщиной 125 мкм, выше, чем на двух других (рис. 5). Кроме того, следует отметить, что в случае пленок с толщинами 100 и 150 мкм количество прикрепившихся клеток оказалось больше на дне лунок, чем на самих пленках.

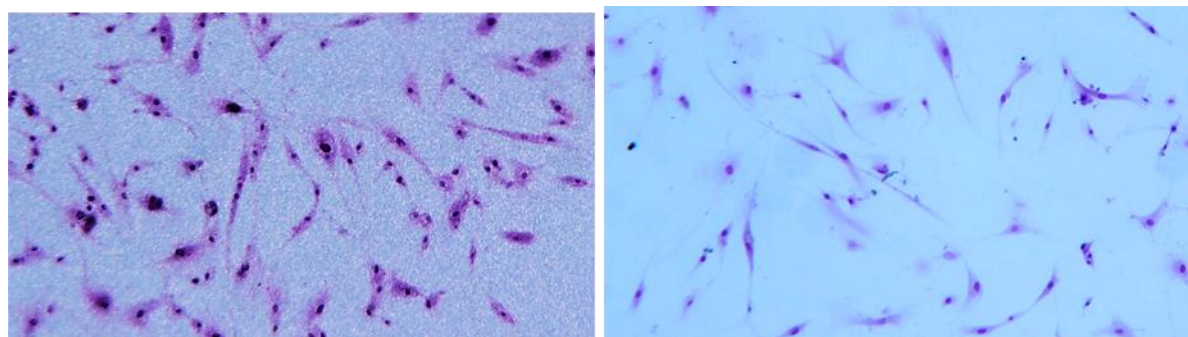


Рисунок 6 - Окрашенные фибробласты на 4 день культивирования: (слева – клетки на поверхности пленки толщиной 125 мкм, справа – на дне лунки)

Исследование морфологии поверхности образцов МДЭ исходной и после насаждения культивируемых клеток (рис. 7) методом АСМ показало значительную разницу в шероховатости поверхности пленок.

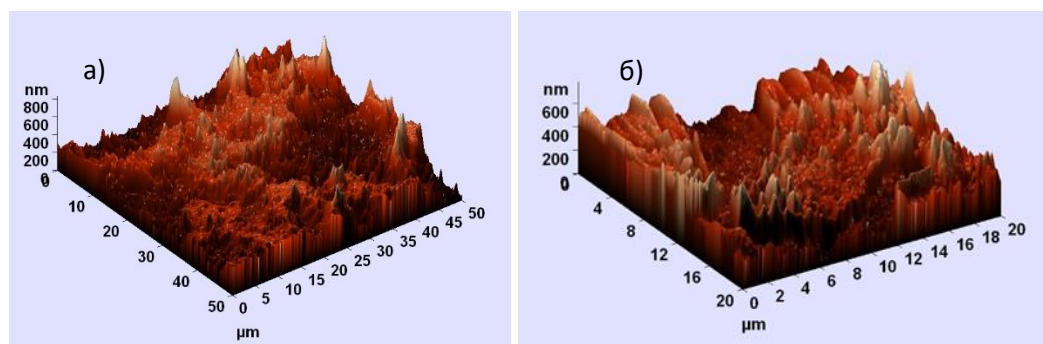


Рисунок 7 – АСМ-изображения поверхности пленки: а) в культуральной среде, без клеток; б) с культивируемыми клетками и адгезионным фактором АФ.

По сравнению с АСМ-изображением пленки без клеток, на поверхности пленки с культивируемыми клетками появились небольшие углубления. Это позволяет сделать вывод о биологическом разложении полилактидной пленки в ходе клеточной пролиферации.

Для установления непосредственного влияния культивируемых клеток на поверхность полилактидной пленки были проведены исследования методом электронной микроскопии (рис. 8).

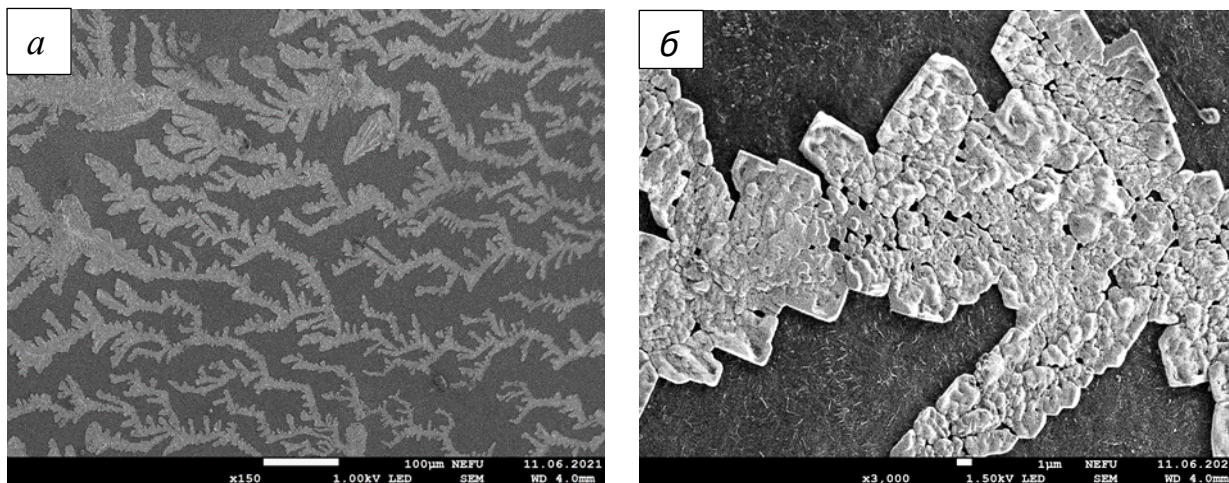


Рисунок 8 – Надмолекулярная структура полилактидной пленки с культивируемыми клетками: а - увеличение микроскопа  $\times 150$ , размерный отрезок 100 мкм; б – увеличение в  $\times 3000$  раз, размерный отрезок 1 мкм

На микрофотографиях поверхности пленок ПЛА видно, что после культивирования на них фибробластов, клетки не только прикрепились, но и активно разрастаются.

## Заключение

В результате проведенных исследований можно сделать следующие выводы.

- Установлено, что наиболее оптимальными физико-механическими свойствами обладают пленки ПЛА с толщиной от 100 до 150 мкм;
- Исследованиями методом ДСК установлено, что используемая марка ПЛА синтезирована из смеси L- и D- оптических изомеров, при этом выявлено высокое содержание D-изомеров, а также отсутствие мезоформ молочной кислоты в структуре ПЛА;
- Методом ИК-спектроскопии выявлены характерные для полилактида ИК-спектры;
- Показано, что добавление в питательную среду адгезионного фактора АФ активирует повышение пролиферации фибробластов на пленки ПЛА в 2 раза, чем без АФ;
- По суправитально окрашенным образцам установлено, что адгезия фибробластов на пленках толщиной 125 мкм является наибольшей. Зафиксирована тенденция к повышению содержания клеток на пленках толщиной между 125 -150 мкм. Таким образом, получена корреляция между физико-механическими характеристиками и способностью к размножению фибробластов у пленок одной и той же толщины.
- По микрофотографиям сделанными методами АСМ и РЭМ установлено что на полученных пленках клетки не только успешно прикрепляются, но и разрастаются, Установлен факт начала биодegradации;
- По полученным данным можно сделать вывод, что пленки толщиной от 125 до 150 мкм больше подходят в качестве матрицы для дермальных эквивалентов.