

Научные исследования Лаборатории биотехнологии новых биоматериалов ИФБиТ, проведенные в 2014 году

Проведены исследования, направленные на модификацию и улучшение адгезионных свойств поверхности полимерных изделий и клеточных носителей (матриксов) из разрушаемых полигидроксиалканоатов (ПГА). Для этого поверхность сконструированной линейки полимерных изделий модифицировали обработкой физическими (воздействие кислородной и аммиачной плазмой, лазерная резка) и химическими методами (обработка поверхности NaOH, H₂SO₄, HCl, HNO₃, NH₃, H₂O₂, NaBH₄). Плазменную обработку проводили на установке DIN A3 (Германия) в плазме тлеющего разряда с частотой генератора 13,56 МГц, используя две реактивные среды (кислород и аммиак). Мощность обработки варьировала от 50 до 250 Вт при давлении 30 Па (300 мкбар) в течение 20 мин. Лазерную резку пленок проводили с использованием CO₂-лазера LaserPro Explorer II (Coherent, США) с длиной волны 10,6 мкм с максимальными мощностью 30 Вт и скоростью 80 дюймов в секунду при варьировании мощности от 5 до 55 % от максимальной и скорость от 40 до 100 % от максимальной; с фокусировкой и в расфокусированном режиме. Второй тип полимерных изделий, обработанных лазерной резкой, представлял собой прессованные пластины, предназначенные для реконструкции дефектов костной ткани. Пластины обрабатывали CO₂-лазером (Laser Pro Explorer II) в режиме растровой и векторной гравировки, при мощности $v=4$ %, скорости $P=100$ %, разрешении ($dpi=1000$). Химическую модификацию поверхности проводили с использованием различных подходов. Первый подход включал обработку окислителями (H₂O₂ в виде 33 % водного раствора), восстановителями (раствор борогидрида натрия в метиловом спирте (3 г/л) или гидролитическими агентами (25 %-ный водный раствор NH₃, концентрированная HNO₃, 1 М водный раствор H₂SO₄, 1 М водный раствор NaOH, 1 М раствор NaOH в этаноле) в течение 30 минут (за исключением спиртового раствора NaOH, при которой время экспозиции составляло 5 минут). Следующий подход был ориентирован на формирование на поверхности пленок карбоксильных и гидроксильных групп, а также двойных связей (за счет конкурирующих реакций гидролиза и элиминирования). Пленки обрабатывали 1 М водным раствором гидроксида натрия в течение двух ч; затем последовательно отмывали в дистиллированной воде, в 1 %-м растворе соляной кислоты и в дистиллированной воде. Обработанные щелочью пленки подвергали дополнительной обработке с целью присоединения на поверхность аминокрупп, для этого пленки погружали в бромную воду на 3 минуты и далее обрабатывали 25 %-ным раствором аммиака, триэтиламинол или аминоэтанолом в течение 3-мин с промывкой в дистиллированной воде. Влияние обработки на поверхностные характеристики исследованных образцов изделий исследовали с помощью электронной микроскопии, измерения свободной поверхностной энергии (СПЭ), ее дисперсной и полярной составляющей (прибор «Krüss DSA-25E» измерением краевых углов капель воды и диодметана методом Оунса-Вендта-Рабеля-Кьельбле) с последующей обработкой данных с помощью программы DSA-4, а также в культуре фибробластов с применением РЭМ, флуоресцентных красителей и МТТ теста. При исследовании способов модификации поверхности полимерных изделий из ПГА лучшие результаты, обеспечившие повышения гидрофильности поверхностей, оцениваемые по величине контактных краевых углов смачивания водой и диодметаном методом Оунса-Вендта-Рабеля-Кьельбле и поверхностной энергии, получены при обработке поверхностей в плазме тлеющего разряда O₂ и NH₃ с частотой генератора 13,56 на установке DIN A3 (Германия); определены условия обработки, обеспечившее снижение величины углов на 25-30° от исходной (до 51 и 45°) при значениях свободной поверхностной энергии по 54 мН/м. Лазерная обработка наливных пленок и прессованных

3D пластин, выполненная с использованием CO₂-лазера LaserPro Explorer II (Coherent, США) с длиной волны 10,6 мкм при варьировании мощности от 1,5 до 16,5 Вт и скорости от 32 до 80 дюймов в секунду в фокусированном и расфокусированном режимах, обеспечила получение перфорированных носителей без существенного изменения величины краевых углов.

Из исследованных химических реагентов наибольшей активностью обладал спиртовой раствор NaOH, приводивший к увеличению СПЭ до 41 мН/м. Более мягким воздействием обладал водный раствор NaOH, также приводящий к значительному возрастанию полярной составляющей СПЭ при длительной обработке (30 минут – 2 ч) при сохранении механических характеристик образцов. При использовании H₂SO₄ незначительно увеличивалась только полярная составляющая СПЭ. При обработке концентрированным раствором HCl, напротив, отмечено уменьшение СПЭ до 33 мН/м за счет дисперсной составляющей. Для образцов, обработанных HNO₃ и NH₃, достоверных отличий по сравнению с контролем не выявлено. Культивирование фибробластов линии NIH 3T3 на поверхности обработанных полимерных изделий показало существенное изменение их отношения к поверхности в зависимости от способов обработки. После обработки NaOH пленки заселяются фибробластами наиболее интенсивно; после обработки кислотами количество адгезированных фибробластов ниже, но больше, чем в контроле. Клетки имели распластанную форму, что показывает их хорошую адгезию на поверхности. Данные электронной микроскопии подтверждены результатами МТТ-теста, который показал, что исследованные методы модификации (за исключением обработки HCl) повышают адгезионные свойства поверхности, стимулируют прикрепление и рост клеток.

С применением полимерных растворов (ПЗГБ) различной плотности исследованы способы формирования покрытий на поверхности полипропиленовых сетчатых эндопротезов «Эсфил» (фирмы «Линтекс», Россия). Выбор в качестве модели сетчатых эндопротезов обусловлен масштабами применения (только в РФ – свыше 200 000 операций в год) и накопленными данными о том, что в области их установки развивается хроническая вялотекущая реакция на инородное тело, не затухающая годами, в результате – в 25 % случаев возможно возникновение эндопротез-ассоциированных осложнений. Покрытия наносили: 1) техникой испарения растворителя многократным погружением сеток в 1% раствор полимера с последующим высушиванием в ламинарном потоке воздуха при комнатной температуре; 2) нанесением раствора полимера на поверхность изделия под давлением с применением техники аэрографии; 3) с предварительным нанесением на поверхность первичного слоя разрешенного комиссией F.D.A. (США) для клинического применения поли-п-ксилена («Parylen N» - Vitek Res. Corp, США) из газовой фазы при давлении 10-20 атм в установке Labcoater PDS 2010 (США) с последующим формированием второго слоя покрытия из ПЗГБ. Для повышения степени адгезии покрытия к эндопротезу исследована техника ускоренного формирования покрытия за счет применения растворов осадителей (изопропанол, этанол, гексан). Полимер наносили методом испарения растворителя (хлороформ), методом осаждения полимера из раствора (добавлением гексана к хлороформному раствору), а также комбинированным методом, когда на уже сформированную после испарения растворителя полимерную поверхность наносился и осаждался слой растворенного полимера, осаждавшийся затем гексаном. Разработаны методы формирования биосовместимых полимерных покрытий (использован поли-3-гидроксипропанат) на поверхности полипропиленовых сетчатых эндопротезов «Эсфил» (фирмы «Линтекс», РФ) и хирургических спиц, применяемых в ортопедии и травматологии. При использовании техники испарения растворителя и поли-п-ксилена получены лучшие результаты, обеспечившие формирование однородных покрытий, равномерных по толщине, стойких к истиранию. В культуре фибробластов NIH 3T3 и экспериментах на лабораторных животных показано, что применение покрытий повышает биосовместимость эндопротезов, стимулируя адгезию и рост клеток и снижая реактивные

изменения тканей. Выполненными исследованиями обоснованы и экспериментально реализованы различные способы модификации поверхности изделий медико-биологического назначения из разрушаемых ПГА с помощью физических и химических методов, позволяющие позитивно влиять на свойства поверхности без разрушения материала.

Для конструирования опорных клеточных носителей в виде эластичных пленок, нетканых мембран, пористых 3D конструкций, использовали ПГА различной химической структуры, исследованы различные методы (поливом с испарением растворителя, ЭСФ, контактного прессования). С применением современных методов исследовали структуру, физико-химические, физико-механические и биологические свойства изделий. Методы дифференцировки клеток предшественников в клетки эпидермального и остеобластического ряда обрабатывали с использованием ММСК костного мозга и из жировой ткани. Для подтверждения дифференцировки клеток использовали метод ПЦР «в реальном времени» в комбинации с методом обратной транскрипции (ОТ) для количественной оценки экспрессии генов к факторам дифференцировки: коллаген 1-го типа (Col-1), кератин 10 (K10), кератин 14 (K14), остеокальцин (BGP). Для восстановления реконструктивного тканеогенеза конструировали гибридные тканеинженерные конструкции (графты) в виде: 1) пленочных и мембранных систем, образованных ультратонкими волокнами, полученные методом ЭСФ, несущими дифференцированные эпидермальные или остеобластические клетки, предназначенные для восстановления дефектов кожных покровов, и 2) 3D пористые имплантаты в комбинации с остеобластами для реконструктивного остеогенеза. Сконструировано семейство биорезорбируемых клеточных носителей, в т.ч. из новых типов ПГА: 3-х компонентных сополимеров, образованных мономерами 3ГБ/3ГВ/4ГВ и 3ГБ/3ГВ/3ГГ с макровключениями 4-гидроксипутирата и 3-гидроксигексаноата и двух компонентных ПЗГБ/4ГБ. Показано, что клеточные носители, сконструированные из двух- и трехкомпонентных полимеров (ПГА) с макровключениями мономеров 4ГБ и 3ГГ, характеризующиеся пониженной степенью кристалличности и большей эластичностью, обеспечивают высокие адгезию и пролиферацию клеток, а также дифференцировку клеток предшественников в остеогенном и эпидермальном направлениях. Оработаны методы дифференцировки клеток предшественников (ММСК костного мозга и жировой ткани); получены дифференцированные клетки остеобластического и эпидермального ряда. Дифференцировка клеток подтверждена методом ПЦР «в реальном времени» в комбинации с методом обратной транскрипции (ОТ) в области количественной оценки экспрессии генов к факторам (коллаген 1-го типа (Col-1), кератин 10 (K10) и кератин 14 (K14), остеокальцин (BGP). Гибридные тканеинженерные конструкции (графты) в виде: 1) пленочных и мембранных систем, образованных ультратонкими волокнами, полученные методом ЭСФ, несущих дифференцированные эпидермальные клетки или культуру диплоидных клеток эмбриона человека (ЛДКЧ) – фибробласты линии М-22, предназначенные для восстановления дефектов кожных покровов и 2) 3D пористые имплантаты в комбинации с остеобластами, дифференцированными из жировой ткани, для реконструктивного остеогенеза.

Доклинические исследования включали оценку эффективности применения разработанных из разрушаемых ПГА изделий для реконструктивной хирургии. Эксперименты выполнены в соответствии с ГОСТ Р ИСО 10993-1-2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий». Содержание и использование лабораторных животных соответствовало правилам, принятым в РФ. Собственно полимерные нетканые мембраны, образованные ультратонкими волокнами, полученные методом электростатического формования (ЭСФ) из 3-компонентных ПГА новых типов, образованных мономерами 3ГБ/3ГВ/4ГБ и 3ГБ/3ГВ/3ГГ и аналогичные

изделия в сочетании с дифференцированными эпидермальными клетками (графты), исследовали в качестве раневого покрытия для восстановления хирургических повреждений дермы лабораторных животных в сравнение с коммерческой раневой повязкой «Воскопран». Гидрофобные неприлипающие к ранам эластичные прозрачные пленки и нетканые мембраны из сополимеров 3ГБ/4ГБ исследовали на модели ожоговой раны II лабораторных животных в сравнении с лиофилизированной коллагеной повязкой, применяемой в комбустиологии. Пористые 3D имплантаты из ПЗГБ и полимерные конструкции в сочетании с остеобластами, дифференцированными из ММСК жировой ткани, исследованы в течение 120 суток на модели дефекта плоских костей черепа в теменной области крыс Вистар. Эффективность применения разработанных сетчатых эндопротезов, модифицированных биосовместимым покрытием из ПГА, в сравнении с коммерческими сетками «Эсфил» («Линтекс», РФ) и «VYPRO II» (Johnson & Johnson, ETHICON США) исследованы при имплантации кроликам в ретромускулярном расположении. В серии выполненных доклинических исследований на лабораторных животных установлено, что полимерные нетканые мембраны из 3-х компонентных ПГА и аналогичные мембраны в сочетании с дифференцированными кератиноцитами более эффективны для восстановления хирургических повреждений дермы по сравнению с коммерческими повязками «Воскопран», обеспечивая более раннее и полное восстановление дефекта при меньшем воспалительном ответе тканей на фоне более активных васкуляризации и формировании новой соединительной ткани в месте повреждения. Гидрофобные неприлипающие к ранам эластичные прозрачные пленки и нетканые мембраны из сополимеров 3ГБ/4ГБ положительно оценены в ходе сравнительного исследования на модели ожоговой раны II лабораторных животных в сравнении с лиофилизированной коллагеной повязкой, применяемой в комбустиологии; регенерация кожи под экспериментальными полимерными покрытиями по срокам и течению процесса были сопоставима с коллагеновой повязкой и пригодны в качестве ее эквивалента при лечении ожоговых ран II степени. Пористые 3D имплантаты из ПЗГБ и полимерные конструкции в сочетании с остеобластами, дифференцированными из ММСК жировой ткани, исследованы на модели дефекта плоских костей черепа лабораторных животных по сравнению с костнопластическим материалом «Коллапол»; по результатам компьютерной томографии спустя 120 суток полное закрытие дефекта произошло только при использовании 3D имплантата в сочетании с клетками; при применении полимерного имплантата и коммерческого препарата закрытие дефекта зарегистрировано, соответственно, на уровне 85-90 и 70 %. Оценка эффективности применения разработанных сетчатых эндопротезов, модифицированных биосовместимым покрытием из ПГА, в сравнении с коммерческими сетками «Эсфил» («Линтекс», РФ) и «VYPRO II» (Johnson & Johnson, ETHICON, США) при имплантации кроликам в ретромускулярном расположении, по результатам гистологических и морфометрических исследований показала, что применение разработанных сеток позволяет при меньшем воспалительном ответе тканей достичь более быстрого укрепления передней брюшной стенки. Таким образом, доклиническими исследованиями, выполненными на лабораторных животных, установлены позитивные качества и эффективность применения всех разработанных из ПГА изделий.

В 2014 г. продолжена передача разработанных по планам НИР проекта экспериментальных и опытных образцов изделий медицинского назначения из разрушаемых полимеров (ПГА) для исследований в клинических условиях. Семейство опытных образцов изделий из ПГА (торговая марка материала и изделий «Биопластотан»), на которые на предыдущем этапе были разработаны и зарегистрированы в органах Росстандарта Технические условия (Технические условия ТУ 9390-006-38580845-2012 «Пленочные системы «Биопластотан». Технические условия ТУ 9390-004-38580845-2012 «Материалы хирургические стерильные «Биопластотан – в виде порошка,

гранул, пластин») прошли сертификацию в органах Росстандарта. На основе анализа выполненных комплексных экспериментальных и ограниченных клинических исследований разработаны практические рекомендации для проведения многоцентровых клинических испытаний изделий и конструкций из разрушаемых ПГА, предназначенных для реконструктивных технологий.