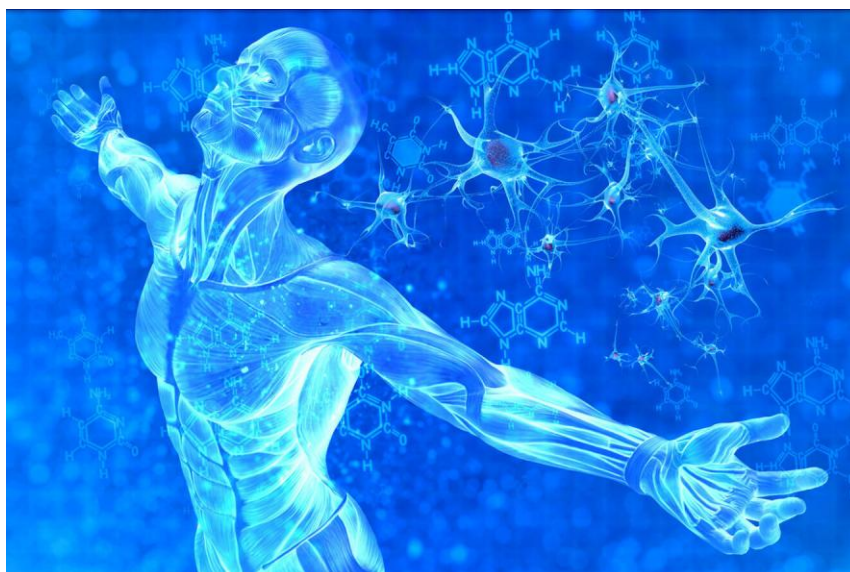


ІІТМО

Е.В. Попова

**ПОЛИМЕРЫ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ
МЕДИЦИНЕ. ПРАКТИКУМ**



**Санкт-Петербург
2023**

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

Е.В. Попова
ПОЛИМЕРЫ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ
МЕДИЦИНЕ. ПРАКТИКУМ

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

РЕКОМЕНДОВАНО К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ В УНИВЕРСИТЕТЕ ИТМО
по направлению подготовки 12.03.04 «Биотехнические системы и
технологии» в качестве Учебно-методического пособия для реализации
основных профессиональных образовательных программ высшего образования
бакалавриата

ИТМО

Санкт-Петербург
2023

Попова Е.В., Полимеры в регенеративной медицине. Практикум– СПб:
Университет ИТМО, 2023. – 51 с.

Рецензент(ы):

Бельтюков Петр Петрович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник, ФГУП НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России;

Учебное пособие адресовано студентам бакалавриата, обучающимся в ИТМО по направлению подготовки 12.03.04 «Биотехнические системы и технологии»; а также преподавателям, ведущим теоретические и лабораторные занятия по курсу «Полимеры в регенеративной медицине». Данная дисциплина опирается на элементы компетенций, сформированные при изучении дисциплин «Биохимия», «Анатомия», «Общая и неорганическая химия», «Органическая химия», «Физика полимеров», «Химия полимеров».

The logo of ITMO University, consisting of the letters 'ITMO' in a bold, sans-serif font. The letter 'I' has a vertical line extending upwards from its top, resembling a stylized '1' or a vertical bar.

Университет ИТМО – ведущий вуз России в области информационных и фотонных технологий, один из немногих российских вузов, получивших в 2009 году статус национального исследовательского университета. С 2013 года Университет ИТМО – участник программы повышения конкурентоспособности российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров, известной как проект «5 в 100». Цель Университета ИТМО – становление исследовательского университета мирового уровня, предпринимательского по типу, ориентированного на интернационализацию всех направлений деятельности.

© Университет ИТМО, 2023
© Попова Е.В., 2023

Содержание

| | |
|---|----|
| Тема 1. Регенеративная медицина..... | 7 |
| Тема 2. Процессы регенерации тканей..... | 13 |
| Тема 3. Полимеры в медицине..... | 17 |
| Тема 4. Микрочастицы в регенеративной медицине..... | 24 |
| Тема 5. Вопросы биоразлагаемости полимеров..... | 28 |
| Тема 6. Полимерные пленки и покрытия..... | 33 |
| Тема 7. Полимерные нити..... | 37 |
| Тема 8. Скаффолды и 3D принтинг..... | 42 |
| Список литературы..... | 48 |

Предисловие

Учебное пособие адресовано студентам бакалавриата, обучающимся в ИТМО по направлению подготовки 12.03.04 «Биотехнические системы и технологии»; а также преподавателям, ведущим теоретические и лабораторные занятия по курсу «Полимеры в регенеративной медицине». Данная дисциплина опирается на элементы компетенций, сформированные при изучении дисциплин «Биохимия», «Анатомия», «Общая и неорганическая химия», «Органическая химия», «Физика полимеров», «Химия полимеров» и направлена на формирование компетенций в «Биоинженерии», «Регенеративной медицине», «Биополимерных имплантатах», «Биоразлагаемых полимерах» и «Биоматериалах».

Пособие состоит из 8 основных разделов. Каждый раздел включает в себя лабораторную работу и практическое задание. Каждый раздел сопровождается кратким лекционным предисловием, позволяющим успешно выполнить предлагаемые в данном пособии задания. Учебный план дисциплины предусматривает чтение лекций и проведение практических и лабораторных занятий, а также самостоятельную работу студентов.

Лекционный курс рассчитан на системное изучение свойств полимеров, применяемых в регенеративной медицине, и включает в себя такие разделы, как «Регенеративная медицина», «Процессы регенерации тканей», «Полимеры в медицине», «Вопросы биоразлагаемости полимеров», «Полимерные пленки и покрытия», «Микрокапсулирование в регенеративной медицине», «Полимерные нити», «Скаффолды и 3D принтинг». Практические и лабораторные работы нацелены на закрепление полученных на лекционных занятиях знаний и на приобретение практических навыков планирования эксперимента, формирования полимерных 2D и 3D скаффолдов, приобретение навыков применения работы с полимерами и исследования их физико-химических свойств.

По окончании изучения лекционного курса студенты должны знать: методики получения микрокапсул; основы формования полимерных нитей; основные принципы включения биологически активных веществ и клеточных культур в полимерные матрицы; основные процессы регенерации тканей в организме; механизмы восстановления тканей при помощи полимерных скаффолдов; свойства природных и синтетических полимеров, применяемых в регенеративной медицине.

По окончании изучения практического курса студенты смогут самостоятельно планировать эксперимент и получать микрокапсулы и полимерные пленки, будут знать основные методы получения полимерных систем доставки, будут предполагать механизмы действия получаемых систем доставки в ходе регенерации тканей, смогут подбирать возможные биологически активные вещества для модифицирования свойств полученных полимерных скаффолдов, овладеют навыками исследования физико-химических показателей

полимеров. Компетенции, приобретенные при изучении данной дисциплины, будут развиваться далее в дисциплине «Smart-полимеры в биоинженерии».

Тема 1. Регенеративная медицина

Регенеративная медицина – относительно молодое направление, формирующееся на стыке биологии, медицины и тканевой инженерии. Впервые данный термин был введен в 1999 году Уильямом Хазелтайном.

Регенеративная медицина — это развивающаяся междисциплинарная область исследований и клинических приложений, направленная на восстановление, замену или регенерацию клеток, тканей или органов для восстановления нарушенной функции, вызванной любой причиной, включая врожденные дефекты, болезни, травмы и старение. Она использует комбинацию нескольких технологических подходов, которые выходят за рамки традиционной трансплантации и заместительной терапии. Эти подходы могут включать, помимо прочего, использование растворимых молекул, генную терапию, трансплантацию стволовых клеток, тканевую инженерию и перепрограммирование типов клеток и тканей [1].

Тканевая инженерия изначально была основана на клеточной биологии и трансплантации, материаловедении и медицинской инженерии в целях разработки биологически инертных материалов и изделий, пригодных для восстановления и поддержания нормальной функции поврежденных тканей и органов. Методы, применяемые в тканевой инженерии, включают в себя введение функциональных клеток в нефункциональный участок для стимуляции регенерации и/или использование биосовместимых материалов для создания новых тканей и органов [2].

Несмотря на молодость, регенеративную медицину можно считать в настоящее время одним из самых современных и перспективных направлений. Оно включает в себя два основных раздела: регенеративную клеточную терапию (стимулирование клеточной и тканевой регенерации с помощью трансплантации стволовых клеток или их ассоциатов с соматическими клетками) и восстановление целостности и функциональности тканей и органов с помощью ткане-инженерных конструкций.

К ткане-инженерным конструкциям относятся в первую очередь клетки, формирующие или дифференцирующиеся в клетки, участвующие в формировании функционирующего внеклеточного матрикса. Например, мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки и дифференцированные клетки. Ткане-инженерной конструкцией называют и подходящий биосовместимый биodeградируемый полимерный носитель для трансплантации клеток. Подобные конструкции, полученные как из природных, так и синтетических полимеров, принято называть “каркасами” [3]. Они являются важными инструментами в регенеративной медицине.

Биологически активные молекулы (например, цитокины, факторы роста, гормоны), которые оказывают биостимулирующее действие на клетки

поврежденной ткани, также можно отнести к представителям второго направления регенеративной медицины.

Технологии, применяемые в регенеративной медицине, можно разделить соответственно на три группы: биостимуляция регенерации тканей пациента с помощью биоактивных материалов; использование стволовых клеток или сигнальных биомолекул для стимуляции процессов регенерации тканей; использование тканеинженерных конструкций органов и тканей.

Основное ограничение широкого применения различных типов клеток в регенеративной медицине связано со сложностью их выращивания в большом количестве. В регенеративной медицине широко применяются нативные клетки, полученные из конкретного органа пациента.

С целью повышения их пролиферативной активности в состав полимерных конструкций включают различные биологически активные компоненты. Особую роль играют факторы роста. **Факторами роста** называют жидкофазные белки, взаимодействующие с трансмембранными рецепторами на поверхностях клеток-мишеней и участвующие в передаче сигналов, необходимых для регуляции большинства клеточных процессов. Дефицит факторов роста происходит при хронических повреждениях тканей. Основные факторы роста, участвующие в регенерации тканей [4]:

1. **Тромбоцитарный фактор роста.** Стимулирует ангиогенез, стабилизирует сосуды, стимулирует синтез коллагена и гликозамингликанов, стимулирует образование грануляционной ткани, активирует фибробласты и макрофаги, участвует в образовании костной ткани.
2. **Трансформирующий фактор роста.** Поддерживает процесс дифференцировки и способствует миграции стволовых клеток, обеспечивает синтез белков межклеточного матрикса, регулирует метаболизм костной ткани и регенерацию нерва.
3. **Фактор роста эндотелия сосудов.** Регулирует васкуляризацию поврежденных тканей, стимулирует неоангиогенез и митогенез, обеспечивает миграцию эндотелиальных клеток, поддерживает лимфатическую систему.
4. **Эпидермальный.** Регулирует миграцию кератиноцитов, стимулирует митогенез, участвует в ангиогенезе, стимулирует пролиферацию нейронных стволовых клеток.
5. **Фактор роста фибробластов.** Регулирует миграцию, пролиферацию, дифференцировку различных типов клеток. Стимулирует ангиогенез.
6. **Ангиопоэтин-1.** Стимулирует ангиогенез.
7. **Инсулиноподобный фактор роста.** Стимулирует пролиферацию клеток костной и хрящевой ткани, регулирует репарацию мышечной ткани, активирует ангиогенез.

8. **Костные морфогенетические белки.** Индуцируют остео- и хондрогенез, поддерживают гомеостаз костной ткани.

Цитокины также широко применяются в регенеративной медицине.

Цитокины – группа низкомолекулярных регуляторных белков, включающая в себя интерлейкины (регулируют иммунный ответ), интерфероны (прямое и не прямое цитотоксическое действие) и колониестимулирующие факторы (пролиферация и дифференцировка гемопоэтических клеток).

Гормоны – биологически активные вещества, отвечающие за гуморальную регуляцию в организме. Например, в медицинской практике для регенерации костной ткани часто используются синтетические глюкокортикостероиды для стимулирования пролиферации мезенхимальных стволовых клеток. К таким препаратам относится дексаметазон.

В настоящее время особая ниша в регенеративной медицине отведена применению средств доставки лекарственных веществ, хирургии, биосенсорам и восстановлению частей тела. Несколько примеров применения нанотехнологий в регенеративной медицине приведены в таблице 1.

Таблица 1. Применение нанотехнологий в регенеративной медицине [5]

| Применение | Примеры материалов, скаффолдов, систем доставки |
|---|---|
| Таргетная и контролируемая доставка лекарственных средств | <p>Нанооболочки (слоистые коллоиды с непроводящим ядром из наночастиц, покрытым тонкой металлической оболочкой) и наностержни (например, сополимеры, золото)</p> <p>Липосомы (везикулы на основе липидов размером от 50 до 100 нм) и липосомы с модифицированной поверхностью</p> <p>Фуллерены (кластеры из 60 атомов углерода) для внутриклеточной доставки лекарств</p> |
| Медицинские устройства | Контрастные вещества в виде суперпарамагнитных наночастиц (например, FePt, оксид железа, оксид железа с покрытием PLGA размером от 10 до 20 нм) и наночастиц на основе квантовых точек (например, биотинилированный гадолиний-аннексин A5) для использования в магнитно-резонансной томографии (МРТ) |
| Клеточная/тканевая инженерия | <p>Углеродные одностенные нанотрубки (размера <100 нм) для создания искусственных мышц</p> <p>Системы для определения или уменьшения</p> |

| | |
|--|---|
| | <p>иммунного отторжения органов</p> <p>Наноструктурированные материалы для регенерации нервов, костей и хрящей</p> <p>Коллагеново-дендримерные гидрогели для тканевой инженерии глаза</p> |
| Доставка генов | <p>Поликатионные полимеры (например, дендримеры, поли-(l-лизин)) в качестве синтетических невирусных векторов с низкой цитотоксичностью</p> <p>Катионные липосомы для доставки олигонуклеотидов в различные клетки</p> <p>Липосомальные препараты для иницированного высвобождения siRNA</p> |
| Молекулярные метки (визуализация in vitro и in vivo) | <p>Полупроводниковые квантовые точки (например, CdSe, ZnS) и нанокристаллы, флуоресцирующие в зависимости от размеров (для нацеливания на различные типы клеток в живых организмах и мечения рецепторов и визуализации)</p> <p>Наночастицы с флуоресцентной меткой для оценки поглощения клетками</p> |
| Тераностика (т.е. комбинированная терапия и диагностика) | <p>Наносистемы на основе полимеров для лечения и диагностики ряда заболеваний</p> |

Практическое задание №1 «Отекание тканей млекопитающих»

Степень отека тканей зависит не только от их функционального состояния – наличия ожогов, отморожений, воспалений, злокачественных новообразований, но и от солевого состава среды, концентрации водородных ионов и прочих физико-химических факторов. Например, скорость и степень отека тканей зависит от наличия/отсутствия катионов и анионов солей. CNS-ионы увеличивают отек, а ионы SO_4 его уменьшают. Подкисление или подщелачивание среды до определённой границы также способно вызвать увеличение отека [6].

Оценить степень и скорость отека биологических тканей можно весовыми методами.

Цель практической работы. Оценить отекание бедренной мышцы и печени мышцы в кислотном и щелочном растворах.

Ход работы. Взять два образца печени. Взвесить образцы на аналитических весах. Положить образцы в две емкости, содержащие 0.1 Н соляную кислоту и фосфатный буфер. Через каждые 5 мин образцы вынимать, подсушивать фильтровальной бумагой, взвешивать и возвращать в раствор. Взвешивать до тех пор, пока вес образца не перестанет меняться.

Сделать вывод на основании полученных результатов.

Лабораторная работа № 1 «Вязкость полимерных гелей»

Карбопол 940 – редкосшитый акриловый мукоадгезивный полимер, часто применяемый в регенеративной медицине и косметологии в качестве гелеобразователя. В основном его используют в производстве матричных таблеток и капсул для модификации высвобождения, а также в производстве пероральных мягких пролонгированных форм. Карбопол 940 относится к рН-чувствительным смарт-полимерам [7]. В воде он способен за счет большого количества карбоксильных групп (более 50%) образовывать гели с низким значением рН. Водные дисперсии карбопола в концентрации 1% имеют величину рН от 2,5 до 3,5. Кроме того, его широко используют для создания увлажняющих пленок. Карбопол проявляет высокую загущающую способность в различных полярных средах – вода, спирт. Для получения определенного значения рН карбопол требует предварительной нейтрализации аминами (триэтанолламин, этанолламин, и т.д.). При подведении рН аминами до 4,0-7,0 карбоксильные группы карбопола ионизируются, происходит взаимное отталкивание. В результате этого отталкивания молекула карбопола разворачивается в растянутую структуру, образуя гель.

Задача. Оценить изменение динамической вязкости карбопола 940 при его нейтрализации триэтанолламином.

Реактивы и оборудование: карбопол 940, триэтанолламин, вода, бюкс на 100 мл, электронные весы, ротационный вискозиметр Brookfield с набором шпинделей, рН-метр, автоматическая пипетка на 1 мл.

Принцип работы вискозиметра Brookfield (Рис. 1) основан на измерении закручивания калиброванной пружины при вращении шпинделя в тестируемом образце с постоянной скоростью. Диапазон измерения вязкости образца зависит от скорости вращения шпинделя, а также его размеров и формы:

- Шпиндель №2, диапазон измерений (100 – 20 000) мПа*с;
- Шпиндель №3, диапазон измерений (100 – 80 000) мПа*с;
- Шпиндель №4, диапазон измерений (100 – 200 000) мПа*с;
- Шпиндель №5, диапазон измерений (200 – 400 000) мПа*с.



Рисунок 1 – Схема ротационного вискозиметра Brookfield

Ход работы:

Навеску карбопола 940 5 мг взвесить в бюксе с точностью до 0,2 мг. Пробу залить водой в количестве 50 мл. Размешать и дать смеси разойтись. Измерить вязкость и рН. Прикапать 1 мл триэтаноламина. Размешать и дать смеси разойтись. Измерить вязкость и рН. Прикапать 1 мл триэтаноламина. Размешать и дать смеси разойтись. Измерить вязкость и рН. Повторять итерации до момента выхода значений вязкости на плато. По полученным данным построить график зависимости вязкости от значений рН.

Написать эссе на тему «Изучение стабильности гелей на основе биополимеров».

Вопросы для самоконтроля

1. Что изучает регенеративная медицина?
2. Что можно называть ткане-инженерной конструкцией? Приведите примеры таких конструкций.
3. Назовите основные факторы роста, участвующие в процессах регенерации ткани.
4. Приведите примеры применения биоинженерных конструкций в регенеративной медицине.

Тема 2. Процессы регенерации тканей

Регенерация - процесс восстановления структурных элементов клеток и тканей взамен частично или полностью утраченных, свойственный практически всем млекопитающим. Скорость обновления тканей и органов различных видов неодинакова. При клеточной форме регенерации происходит обновление клеток, а в тканях и органах обновляются внутриклеточные структуры. Клеточная форма регенерации свойственна костям, эпителию кожи, слизистым оболочкам. Внутриклеточная форма регенерации универсальна и свойственна всем органам и тканям без исключения. Клеточная и внутриклеточная регенерации свойственны печени, поджелудочной железе, легким, вегетативной нервной системе. Форма регенерации определяется функциональным назначением ткани и органа, а также их структурно-функциональной специализацией [8].

Различают три формы регенерации: полная (новая ткань полностью соответствует утраченной), неполная (нарастание соединительной ткани на месте утраченной), избыточная (новая ткань по объему больше утраченной).

Эпителий желудочно-кишечного тракта человека обновляется в течение 5-6 дней, гиппокамп (часть головного мозга, отвечающая за память) в течение 1 дня, костные и мышечные ткани в течение 10-15 лет, эпидермис кожи за 2 недели, эритроциты в течение полугода, клетки печени за полтора года.

Регенерация может протекать **тремя путями**: 1 - рост тканей на раневой поверхности, 2 - перестройки оставшейся части органа в новый, 3 - рост остатка органа без изменения его формы.

У млекопитающих **регенерируют четыре вида тканей**: соединительная ткань (высокая способность к регенерации), эпителиальная ткань, мышечная ткань (меньшая способность к регенерации), нервная ткань (плохая способность к регенерации).

Физиологическая регенерация – восстановление клеток, тканей и органов, утраченных в процессе жизнедеятельности естественным путем. По механизмам физиологической регенерации разные ткани организма можно разделить на три группы. **К первой группе** относятся ткани, для которых характерно наличие стволовых клеток и их высокая митотическая активность (например, эпидермис кожи, эпителий кишечника, клетки крови). **Ко второй группе** относятся ткани, в состав которых входят нечасто делящиеся клетки (например, эпителий печени, почек, легких). В **третьей группе** присутствует только внутриклеточная форма физиологической регенерации.

Репаративный процесс состоит из двух фаз – пролиферации (деление молодых недифференцированных клеток) и дифференцировки (созревание клеток и их структурно-функциональная специализация).

Рассмотрим процессы регенерации на примере кожи человека. **Повреждающим фактором** может являться любой процесс: механическая

травма, оперативное вмешательство, действие ядовитых веществ, ожог, обморожение, лучевое воздействие.

Кожа человека состоит из эпидермиса и дермы (Рис. 2). Эпидермис – тонкий поверхностный защитный слой, состоящий из эпителиальных клеток и не имеющий сосудов. Дерма – слой, содержащий функциональные элементы кожи (соединительная ткань, сосуды, нервные окончания и потовые железы).

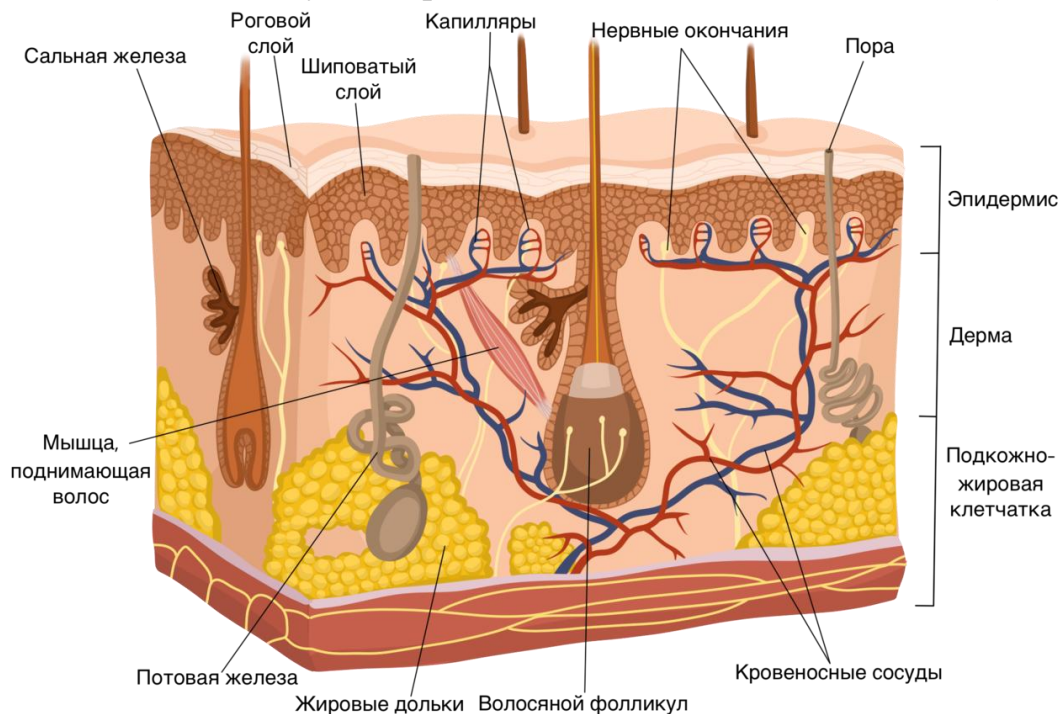


Рисунок 2 – Строение кожи человека

Ожог - повреждение тканей кожи, вызванное термической, химической, электрической или лучевой энергией [9]. Ожоги в зависимости от источника могут быть термическими (в результате действия высоких температур или пламени), химическими (в результате действия химических веществ), электрическими (в результате действия электрического заряда) и лучевыми (в результате действия радиации). Выделяют также комбинированные и сочетанные ожоги.

Степень повреждения при ожоге зависит от глубины расположения пострадавших тканей, природы источника, температуры и времени воздействия.

Комбустиологи выделяют **четыре степени ожога**. Для ожогов **I степени** характерны покраснения и отеки кожи. **II степень** ожогов характеризуется поражением эпидермиса и частично подлежащей дермы до росткового слоя. Для ожогов данной степени характерны покраснения, отеки, образования пузырей с прозрачной желтоватой жидкостью. При ожогах **степени IIIA** сохраняется жизнеспособность росткового слоя дермы с частичками эпидермиса. Такая рана еще может самостоятельно эпителизироваться. При ожогах **степени IIIB**

происходит поражение всей дермы. При заживлении таких ран остается грубый рубец. Ожоги IV степени сопровождаются струпом и поражениями мышц, костей. Такие ожоги практически не восстанавливаются самостоятельно.

Порез – любое механическое повреждение тканей, вызванное контактом с любыми режущими предметами и сопровождающееся нарушением целостности кожных и слизистых покровов [10]. К главным признакам пореза можно отнести наличие кровотечения, вызванного повреждением сосудов, и зияние раны, вызванное сокращением эластических волокон кожи.

При порезе рана имеет ровные края. Окружающие ее ткани повреждаются незначительно, кровоснабжение не нарушено, а некротизированных тканей практически нет. Как правило, болевой синдром выражен умеренно и зависит, как и степень кровотечения, от глубины повреждений. Резаные раны - наиболее благоприятные повреждения по своему течению и прогнозу.

Как правило, любой раневой процесс протекает в 3 фазы. I фаза (**фаза воспаления**) длится до 5 дней и зависит от двух периодов: сосудистых изменений и очищения раны от некротических тканей. Данная фаза начинается с сосудистых изменений. В первую минуту повреждения происходит спазм сосудов. Затем происходит их расширение, повышается степень проницаемости стенок сосудов и начинается отёк. В результате тромбирования и снижения насыщения тканей кислородом происходит нарушение обмена веществ в области раны. Развивается вторичный отек. После сосудистых изменений начинается очищение раны от некротических тканей: в первые сутки в ткани через сосудистую стенку проникают форменные элементы, лейкоциты, а на 2-3 сутки мигрируют лимфоциты и макрофаги. Начинается процесс фагоцитоза микробов и некротизированных масс. Затем II фаза (**процесс регенерации**) сменяет фазу воспаления и длится от 6 до 14 дней. На данном этапе происходит образование и созревание грануляционной ткани (Рис. 3). III фаза (**реорганизации рубца и эпителизации**) может продолжаться до 6 месяцев в зависимости от глубины пореза, осложнений и характера нанесенных повреждений.

Отморожение – поражение тканей, вызванное воздействием низких температур [9]. Отморожения можно классифицировать на вызванные морозом, контактные отморожения (контакт кожи с объектом сверхнизкой температуры), ознобление. Выделяют 4 степени отморожения. Отморожение **I степени** (кратковременный контакт с холодом) сопровождается бледностью кожи, сохранением тактильной и болевой чувствительности, умеренным отеком в границах гиперемии. Отморожение **II степени** протекает с образованием пузырей, наполненных прозрачной жидкостью и наличием синюшного оттенка кожи. При отморожениях **III степени** кожные покровы имеют багрово-синюшную окраску, отсутствует болевая чувствительность, образуются пузыри, наполненные кровянистым содержимым. При поражениях третьей степени поражена дерма до подкожно-жировой клетчатки. Отморожение **IV степени**

проходит на уровне костей и суставов с развитием отека и последующей муфификацией или гангреной.

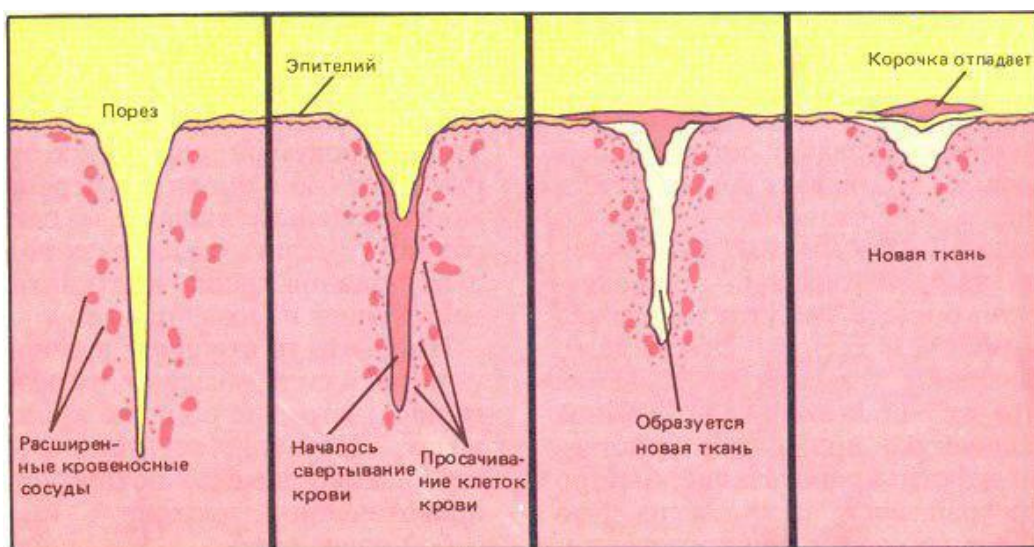


Рисунок 3 – Этапы заживления порезов

Практическая работа № 2

Используя дополнительную литературу, заполните таблицу.

| Виды заживления раны | Условия, при которых возможно | Этапы заживления | Сроки заживления |
|------------------------|-------------------------------|------------------|------------------|
| Первичное натяжение | | | |
| Вторичное натяжение | | | |
| Заживление под струпом | | | |

Лабораторная работа № 2 «Получение коллагена из свиной кожи»

Задача. Получить из образца свиной кожи высококонцентрированный раствор коллагена.

Оборудование и реактивы: сито, рН-метр, магнитная мешалка, весы, блендер, стакан стеклянный на 1 л, полимерная чаша, кусок свиной кожи, гидроокись натрия, 3% ледяная уксусная кислота, борная кислота, сульфат натрия, вода, марля.

Ход работы: На весах взвесить 100 г предварительно нарезанных кусочков свиной кожи. Навеску поместить в полимерную чашу и замочить в воде на 1 ч. Приготовить 1 л щелочного раствора. Для этого 110 г гидроокиси натрия и 100 г сульфата натрия растворить в дистиллированной воде. Из полимерной чаши с

кожей слить воду через сито. Кусочки кожи замочить в 400 мл щелочного раствора на 48 часов. Раз в 6 часов перемешивать.

Спустя 48 часов: 100 г сульфата натрия растворить в 1 л воды. Слить щелочной раствор через сито. Залить кусочки кожи 500 мл раствора сульфата натрия и оставить на 3 часа.

Спустя 3 часа: Приготовить раствор борной кислоты. Для этого 30 г сухой навески растворить в 1 л воды. Слить солевой раствор через сито. Залить кусочки 500 мл раствора борной кислоты. Измерить рН. Перемешивать каждые 10 минут. Измерять рН до тех пор, пока значение не станет нейтральным. Слить раствор борной кислоты. Куски промывать проточной водой в течении 5 ч.

Спустя 5 часов: Замочить кусочки на 6 часов в дистиллированной воде.

Спустя 6 часов: Слить дистиллированную воду. Кусочки измельчить в блендере и залить 1 л ледяной уксусной кислоты и оставить на 24 часа в холодильнике.

Спустя 24 часа: Кусочки продавить через марлю и сито. В результате образуется высококонцентрированный раствор коллагена.

Вопросы для самоконтроля

1. Что такое регенерация? Назовите ее формы.
2. Какими путями может протекать процесс регенерации?
3. Какие типы тканей способны к регенерации у млекопитающих?
4. Из чего состоит репаративный процесс?
5. Как различаются между собой степени ожога?
6. Как протекает раневой процесс?
7. Как различаются между собой степени отморожения?

Тема 3. Полимеры в медицине

Полимеры - высокомолекулярные соединения, макромолекулы которых имеют цепное строение и состоят из отдельных групп атомов-звеньев, соединённых друг с другом химическими связями. Молекулярная масса полимеров от нескольких тысяч до многих миллионов дальтон. Полимерная химия выделяет **природные** и **синтетические** полимеры.

Применение полимеров в медицине определяется их физическими, химическими и механическими свойствами, отсутствием токсичного и канцерогенного воздействия на живые организмы [11]. Полимерные материалы, применяемые в регенеративной медицине, должны быть обязательно биологически совместимыми с контактирующими тканями и индифферентными по отношению к организму в целом.

Биосовместимость – интегральная характеристика естественного или искусственного трансплантата, позволяющая ему приживаться в организме реципиента.

Выбор полимера для медицинских изделий в первую очередь зависит от цели его применения [12]. Например, возможность применения полимера для эндопротезирования определяется биологической инертностью, прочностными свойствами и биомеханическими особенностями предполагаемой эксплуатации. Для внутритканевого применения разрешены только отдельные марки полиэтилена, полиамида, полиметилметакрилата, полиэтиленфталата и политетрафторэтилена. В сердечно-сосудистой хирургии и трансплантологии полимеры должны быть не только биосовместимы, но и обладать гемосовместимостью. **Гемосовместимость** – это свойство материала не вызывать изменений функции крови, трансформации ее компонентов и образование тромба. В хирургии полимеры используют для замены утраченных тканей или органов. Требования к таким полимерам наиболее высокие – полимеры должны быть биоинертными и медленно деградирующими.

Выбор материала для регенеративной медицины также напрямую зависит от области применения: костная ткань, кровеносные сосуды, кожа, мышечная ткань, нервные волокна [5]. Материалы, используемые в регенеративной медицине, весьма разнообразны: металлы, керамика, полимеры. Для решения задач данного направления в некоторых случаях рекомендуется применять смарт-полимеры.

Смарт-полимеры – полимеры, способные обратимо реагировать на незначительные изменения свойств среды. Иными словами, для того, чтобы полученное изделие (скаффолд, пленка и т.д.) стало «умным», необходим фазовый переход первого рода. Стимулы для этого перехода могут быть физическими (температура, свет, магнитное поле) и химическими (pH, ионная сила). Например, термочувствительные полимеры можно применять в качестве скаффолдов, обеспечивающих рост и пролиферацию клеток, а также в качестве инъекционных гелей для создания каркаса *in situ* [13]. В этом случае термозависимый полимер, как правило, смешивается при комнатной температуре с клетками и затем вводится в организм. За счет температуры тела человека (до 37°C), которая превышает нижнюю критическую температуру растворения полимера, образуется физический гель. Клетки оказываются инкапсулированными в трехмерную структуру геля.

Создание саморегулируемых биоматериалов базируется на химических и биотехнологических методах и включает различные подходы, среди которых наиболее перспективными признаны следующие:

- синтез смарт-материалов, содержащих биологически активные соединения;
- синтез гибридных материалов;
- получение материалов со специальными свойствами поверхности для возможности контакта с кровью и тканями организма человека;

- получение материалов на основе модифицированных тканей человека и животных;
- синтез биосовместимых биodeградируемых материалов и композитов с контролируемым высвобождением.

Природные полимеры широко используются в фармакологии при разработке систем доставки лекарственных средств и в регенеративной медицине. Молекулы природных полимеров биохимически схожи с компонентами внеклеточного матрикса человека и, следовательно, хорошо усваиваются организмом. Кроме того, природные полимеры обладают рядом преимуществ: доступность, относительная простота выделения и возможность химической модификации. Природные полимеры подвергаются ферментативному и гидролитическому разложению в биологических средах с образованием безопасных для организма продуктов разложения.

По происхождению природные полимеры делятся на полимеры **растительного** происхождения (целлюлоза, гемицеллюлоза, глюкоманнан, агар, крахмал, пектин, инулин, канифоль) и полимеры **животного** происхождения (хитин, альгинаты, каррагинан, подорожник, ксантановая камедь). Помимо классификации по происхождению (Таблица 2), природные полимеры можно классифицировать в соответствии с их **химическим составом** на полисахариды, белки и сложные полиэфиры.

Таблица 2. Биополимерные материалы, наиболее часто используемые в регенеративной медицине [14]

| Наименование полимера | Источник |
|------------------------------|---|
| Альгинат | Полисахарид из бурых морских водорослей |
| Хитозан | Производное хитина |
| Коллаген | Белок внеклеточного матрикса |
| Желатин | Термически денатурированный коллаген |
| Фиброин шелка | Белок кокона |
| Спидроин | Белок паутины |
| Гиалурионовая кислота | Компонент внеклеточного матрикса |

Приведем примеры некоторых природных полимеров. Шелковая нить тутового шелкопряда состоит из **фибрина** (биосовместимый фибриллярный белок) и водорастворимого клееобразного белка – серицина [15]. Под воздействием спиртов фиброин способен к быстрому фазовому переходу в нерастворимое состояние из водных растворов. Интерес к нему связан с возможными перспективами получения прочных и одновременно гибких структур. Фиброин шелка термостабилен, устойчив к действию протеолитических ферментов, что очень важно для белков. Серицин обеспечивает сшивку волокон фибрина в шелковые нити, но ввиду его высокой аллергенности применение их в регенеративной медицине ограничено.

Пуллулан - нейтральный, линейный и биосовместимый полисахарид, получаемый в результате ферментации крахмала *Aureobasidium pullulan*. Ввиду его способности к образованию пленок и адгезивным свойства пуллан нашел применение в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности. Биодegradация пуллулана в организме происходит за счет ферментативного расщепления. В регенеративной медицине применяется с простагландином E1 для заживления ран в форме наногидрогелей, регенерации сосудистой ткани, а также в инженерии костной ткани. В последнем случае используются скаффолды, пористость которых можно контролировать за счет изменения условий сублимационной сушки [16, 17].

Природные полимеры могут быть выделены из организма человека. Одним из наиболее распространенных таких полимеров является белок **коллаген** [18]. В разных тканях содержатся различные типы коллагена. Другой полимер на белковой основе, **фибрин**, образуется из фибриногена в результате активации свертывания крови. Как фибрин, так и коллаген часто используются для восстановления поврежденного хряща.

Применение синтетических полимеров в регенеративной медицине качестве скаффолдов в ряде случаев является более перспективным по сравнению с природными полимерами [19]. Синтетические полимеры практически не подвергаются ферментативному разложению, а их механические и химические свойства легче адаптировать.

Общая характеристика большинства **недеградируемых синтетических полимеров** – их биологическая инертность [11]. Одна из задач таких полимеров – нивелирование реакций организма на изделие. Недеградируемые синтетические полимеры являются основой для некоторых медицинских приборов, ортопедических имплантов, устройств для фиксации переломов, катетеров и трубок [12]. Данный класс полимеров также применяются при разработке имплантируемых носителей для пролонгированной доставки лекарственных средств. К синтетическим небиодegradируемым полимерам можно отнести полиэтилен, полипропилен, поли(метил)метакрилат, поли(N-изопропилакриламид), полиметакрилат, полиакриламид, полисилоксаны и т.д.

Поли(N-изопропилакриламид) (PNiPAAm) – синтетический термозависимый полимер, образующий непрозрачный гидрогель при температуре выше 32°C. Часто применяется для доставки лекарственных препаратов и клеточных культур [19]. Терморреактивность полимера является результатом сильных водородных связей между ним и молекулами воды, а также их специфической молекулярной ориентации. Гидрогели, образованные линейным PNiPAAm при 32°C, нестабильны и существенно разрушаются при повышении температуры. Для регенерации суставного хряща PNiPAAm часто применяют в паре с акриловой кислотой, ПЭГ, гиалуроновой кислотой и желатином.

Поли(метилметакрилат) - это неразлагаемый полиакрилат, наиболее часто применяемый для костной пластики, при фиксации ортопедических протезов для бедер, коленей и плеч в ортопедии и в качестве основного ингредиента для изготовления зубных протезов в стоматологии [12].

Полисилоксаны, или силиконы, представляют собой группу биосовместимых кремнийорганических полимеров. Благодаря хорошей гемосовместимости материалы из силикона используются в медицине в составе различных изделий: сердечных клапанов и компонентов для диализа почек, оксигенаторов крови и аппаратов искусственного кровообращения. Силиконовые эластомеры можно встретить в катетерах, шунтах, дренажах и трубчатых имплантатах (например, искусственной уретре). В ортопедии полисилоксаны применяются в имплантатах суставов кистей и стоп [20]. Однако наиболее заметным остается их широкое применение в косметических имплантатах в эстетической и реконструктивно-пластической хирургии.

Биоразлагаемые синтетические полимеры (как и неразлагаемые) можно синтезировать с воспроизводимым качеством и чистоты, достигая желаемых физико-химических свойств. Клинические применения биоразлагаемых синтетических полимеров весьма разнообразны: рассасывающиеся шовные материалы, системы доставки лекарственных средств, ортопедические фиксирующие устройства, матрицы для тканевой инженерии [21]. Для создания скаффолдов используется широкий спектр биоразлагаемых полимеров, начиная от гибких, пластичных материалов для регенерации мягких тканей и заканчивая жесткими материалами, которые могут быть использованы в несущих нагрузку тканях, таких как кость. Одним из наиболее изученных семейств биоразлагаемых синтетических полимеров являются полиэферы. Семейство сложных полиэфиров состоит из различных подсемейств в зависимости от структуры мономеров.

Поли(α -гидроксикислоты) представляют собой линейные термопластичные эластомеры, в которых каждый мономер имеет две функциональные группы: карбоновую кислоту и гидроксильную группу, расположенную у атома углерода рядом с карбоновой кислотой (α -положение), которые образуют сложноэфирные связи [19].

Наиболее известный представитель семейства полилактонов является поли(ϵ -капролактон) (PCL). **Поли(ϵ -капролактон) (PCL)** – биосовместимый алифатический полукристаллический полиэфир с низкой температурой стеклования (60°C) и температурой плавления ($59\text{-}64^{\circ}\text{C}$). Применяется PCL в системах доставки лекарств и электроспиннинге при изготовлении нетканых сеток из нано/микроволокон [22].

Практическая работа № 3 «Полимеры в медицине»

Задание 1. Какие полимеры называют биоинертными? Опишите их свойства и примеры их возможного применения в регенеративной медицине.

Задание 2. Какой из перечисленных имплантатов нельзя изготавливать из биodeградируемого полимера?

- 1) ортопедическая пластина;
- 2) зубы;
- 3) ортопедические винты;
- 4) протез для прорастивания хряща.

Задание 3. По каким критериям происходит отбор полимеров при разработки медицинских изделий?

Задание 4. Заполните таблицу

| Полимер | Применение |
|--|------------|
| Полиакрилаты, полисилоксаны, полиамиды | |
| Полиуретаны, полиэтилентерефталат | |
| Полиэтилентерефталат, поливинилхлорид | |
| Полиэтилен, полипропилен | |
| Полисилоксаны, поливинилхлорид, полиамиды | |
| Полиэтилентерефталат, политетрафторэтилен, полипропилен | |
| Полиакрилаты, полиамиды, полиэтилен, полиуретаны, полипропилен | |
| Полисилоксаны, полиэтилен (сверхмолекулярный) | |
| Полиэтилентерефталат, полиамиды | |

Варианты применения (при протезировании):

- а) кости и суставы;
- б) части пищевода;
- в) трахея;
- г) связки и сухожилия;
- д) части легкого, почки и печени;
- е) суставы пальцев рук;
- ж) кровеносные сосуды;
- з) сердце и его части.

Задание 5. Распределите по группам

| Полимер | Применение |
|------------------------------|------------|
| Полиэтилен высокой плотности | |
| Полиамиды | |
| Поликарбонат | |
| Фторопласт-4 | |
| Пластикат | |
| Полистирол | |

Варианты применения:

- 1) лабораторное оборудование, пробирки, пипетки и др.;
- 2) медицинские воронки и трубки;
- 3) бужи пищеводные;
- 4) соединительные трубки, протезно-ортопедические изделия;
- 5) зонды, катетеры.

Лабораторная работа №3 «Исследование растворимости полимеров медицинского назначения»

Полимеры не способны к растворению в абсолютно любой жидкости. Для растворения полимер и растворитель должны иметь высокое сродство. Растворы полимеров характеризуются высокой вязкостью и медленной диффузией. Растворимость полимеров зависит от многих факторов - например, от природы полимера и растворителя. Если полярность полимера и растворителя близки, можно ожидать от полимера набухание и растворение. В противном случае растворение происходить не будет. Гибкость цепи полимера также оказывает влияние на растворимость. В случае жесткоцепных полимеров растворение возможно в сильно взаимодействующих с ними растворителях или при повышенной температуре. Гибкоцепные полимеры легко диффундируют в растворитель. Кроме того, практически у всех полимеров растворимость снижается с увеличением молекулярной массы. На растворимость полимера влияет количество функциональных групп и равномерность их распределения (чем выше, тем лучше растворение) [23].

Задача. Качественно оценить растворимость предложенных природных и синтетических полимеров в различных растворителях.

Реактивы и оборудование.

Растворители: этиловый спирт, формальдегид, ДМСО, ацетон, вода.

Полимеры: хитозан, плюроник, альгинат, PLA, полиэтилен

Оборудование: Пробирки, пробки, автоматическая пипетка емкостью 2-5 мл, термостат.

Ход работы.

Навеску 10 мг сухого полимера поместить в пробирку. Автоматической пипеткой налить по 2 мл растворителя. Пробирки закрыть пробками и выдерживать 1-2 ч при комнатной температуре, периодически встряхивая. Полимер считается растворимым в растворителе при условии образования однородного раствора без видимых примесей.

Визуально оценить состояние полимера, не растворяющегося в данном растворителе (набухание, осадок).

Нерастворившийся полимер нагревать до температуры кипения растворителя. В случае растворения полимера раствор охладить. Оценить выпадение осадка после охлаждения.

Написать отчет по проделанной работе.

Вопросы для самоконтроля

1. Чем определяется возможность применения полимера в регенеративной медицине?
2. Какой полимер можно считать биосовместимым?
3. Какой полимер можно называть гемосовместимым?
4. Какие полимеры можно называть «смарт-полимерами»? Как они применяются в регенеративной медицине?
5. Какие природные полимеры вы знаете? Приведите примеры их применения в регенеративной медицине.
6. Где применяются биоразлагаемые синтетические полимеры? Приведите примеры таких полимеров.

Тема 4. Микрочастицы в регенеративной медицине

Микрокапсулирование известно в первую очередь в фармакологии благодаря разработкам в области систем доставки лекарственных средств с контролируемым высвобождением (обезболивающие, противовоспалительные и противоопухолевые препараты, терапевтические пептиды) [14]. Примерами таких препаратов могут служить микрокапсулированные трипторелин (компания Pfizer) и октреотид (компания Novartis).

Микрокапсулирование некоторых клеточных культур (например, МСК) имеет два основных преимущества: возможность трансплантации без применения дополнительных иммуносупрессивных препаратов и возможность применения клеток, выделенных из различных источников [24].

Под **микрокапсулами** в регенеративной медицине (как и в фармакологии) подразумевают полимерные частицы размером до 2000 мкм с ядром из биологически активного вещества, окруженным защитной полимерной оболочкой [25]. Микрокапсулы иногда путают с микросферами, также широко распространенными в медицинской практике. **Микросферы** – пористые частицы до 200 мкм, в которых биологически активное вещество распределено по полимеру равномерно. Активное вещество может быть связано с полимером микросферы ковалентно или нековалентно. При нековалентном связывании осуществляется пассивная адсорбция вещества на поверхность полимера микросферы. Также при таком типе связывания может иметь место физический захват вещества за счет образования водородных связей, ионных и гидрофобных взаимодействий с носителем.

Активное вещество классифицируется по источнику получения, химическому строению, фармакологической и нозологической группе [26]. Носитель для активного вещества подбирается исходя из знания о его природе и назначении, а также исходя из предполагаемого пути введения системы в

организм пациента. Кинетика высвобождения активного вещества также зависит от свойств полимера микрочастицы.

Природные полимеры ввиду своей биосовместимости и биodeградируемости очень часто используются для микрокапсулирования клеточных культур. Примеры таких полимеров представлены на Рис. 5 [27].

Агароза – биосовместимый природный полисахарид, способный образовывать термически обратимые гели. При низких температурах из агарозно-клеточных суспензий могут быть получены микросферы.

Хитозан – полимер, получаемый из хитина. В отличие от большинства природных полимеров, хитозан – положительно заряженный полимер с выраженными мукоадгезивными свойствами. Он широко применяется для регенерации тканей. Например, для лечения травм позвоночника используют микросферы хитозана со стволовыми клетками и факторами роста [28].

Альгинат – один из наиболее распространенных природных полимеров, применяемых в регенеративной медицине для микрокапсулирования клеток. Его биосовместимость доказана как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*. Одним из главных и наиболее ярких его свойств является способность к сшиванию двухвалентными катионами (например, Ca^{2+}), с образованием ионных межцепочечных мостиков. Сшивание полимера в капсулы при этом возможно при умеренных значениях pH, температуре и концентрации соли, не влияющих на жизнеспособность клеток. Выбор сшивающего катиона оказывает влияние на механическую прочность капсулы. Схематически процесс получения микрокапсул с культурой клеток описан на Рис. 6 [29].

Подобные микрокапсулы уже нашли свое применение в лечении сахарного диабета 1 типа. Если β -клетки поджелудочной железы в значительной степени разрушены иммунной системой, то это ведет к диабету 1 типа. Трансплантация микрокапсулированных β -клеток позволяет восполнить их недостаток в организме.

Как в регенеративной медицине используются нано- и микрочастицы? Во-первых, нано- и микросферы можно использовать самостоятельно для высвобождения биологически активных веществ или для интернализации клеток. Во-вторых, включение нано- и микрочастиц в 3D-скаффолды может улучшить их свойства (как физико-химические, так и биологические). В-третьих, полые капсулы, полученные методом полиэлектролитной сборки (LbL), могут содержать среду с клетками или инкапсулированные биологически активные вещества для контролируемого высвобождения. Кроме того, наночастицы можно включать также при формировании в полимерные нити.

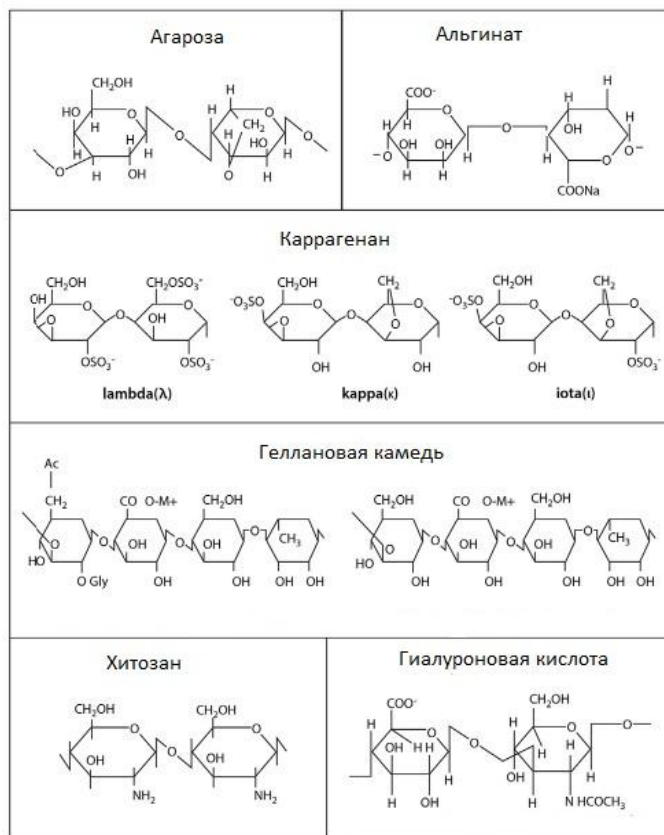


Рисунок 5 – Природные полимеры, используемые в микрокапсулировании клеточных культур

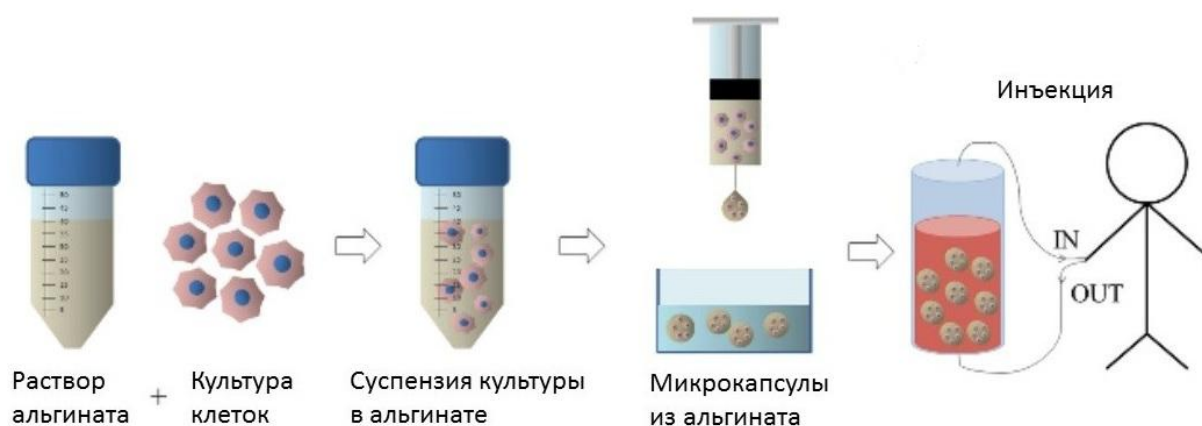


Рисунок 6 – Получение альгинатных микрокапсул с культурой клеток

Проверочная работа № 4 «Методы микрокапсулирования»

Используя дополнительную литературу, опишите методы получения микрокапсул из полимеров. Для каждого из методов укажите диапазоны размеров микрокапсул, от чего он зависит и наиболее часто используемые полимеры.

Подумайте и предположите, возможно ли применять каждый из данных методов для инкапсулирования клеточных культур:

1. Механическое нанесение оболочки на пористое ядро с его последующим растворением в органическом растворителе
2. Микроинкапсулирование в псевдооживленном слое
3. Экструзия
4. Распылительная сушка
5. Простая коацервация
6. Межфазные химические процессы

Лабораторная работа № 4 «Получение микрокапсул из биосовместимых полимеров»

Задача. Отработать способы получения микрокапсул из биосовместимых полимеров

Реактивы и оборудование:

1. Раствор 0,1% альгината натрия
2. Раствор 0,1% хитозана
3. Раствор 0,1% карбопола 940
4. 0,5 М раствор хлорида кальция
5. Закрытые пробирки с резиновой крышкой
6. Шприц на 1 мл
7. Чашки Петри
8. Термостат суховоздушный
9. Родамин В

Ход работы:

Сухую навеску полимера необходимой массы растворить в 50 мл воды при постоянном перемешивании. В раствор альгината натрия добавить 1 мг родамина в качестве имитации включения биологически активного вещества. Формирование микрокапсул происходит за счет соединения раствора альгината натрия и раствора карбопола/хитозана с последующим их осаждением в растворе хлорида кальция. Прикапывание водного раствора полимеров осуществлять при помощи шприца объемом 5 мл при постоянном перемешивании на 300 об/мин. Смесь перемешивать на магнитной мешалке при 300 об/мин в течение 20 минут. Полученные микрокапсулы отфильтровать, а затем троекратно промыть водой в целях очистки от непрорегировавших полимеров. Высушить микрокапсулы при 60°C в термостате.

Написать отчет по полученным результатам. Микрокапсулы сохранить для лабораторной работы №5.

Вопросы для самоконтроля

1. Как применяются в регенеративной медицине полимерные микрокапсулы? Опишите наиболее известные методы их получения.

2. Что может являться активным веществом?
3. Какие вы знаете полимеры, используемые в микрокапсулировании? По каким критериям они подбираются?

Тема 5. Вопросы биоразлагаемости полимеров

В фармацевтической разработке полимеры принято классифицировать не только по химическому строению и источнику получения (Рис. 7), но и по воздействию на организм. Примером такой классификации могут быть биологически инертные и биологически активные полимеры, биологически совместимые и биологически несовместимые полимеры.



Рисунок 7 – Классификация биосовместимых полимеров

Биодеградируемыми биосовместимыми материалами называются материалы, способные разрушаться после определенного времени имплантации с образованием нетоксичных продуктов, которые выводятся организмом или усваиваются им. В регенеративной медицине допускается использование только биологически совместимых полимеров.

В организме биосовместимые полимеры подвергаются **биодegradации** (разрыву его основной цепи с превращением в олиго- или мономер) или **биоэрозии** (частичная потеря полимера, частный случай биодegradации). В свою очередь, биодеструкция полимерных 3D скаффолдов, капсул и имплантатов протекает за счет **растворения (гетерогенный механизм разрушения), диффузии (гомогенный механизм разрушения)** или воздействия ферментов ткани. Довольно часто биодegradация протекает следующим образом: молекулы среды диффундируют в полимерную матрицу изделия, разрушая его изнутри. Гидролиз полимера происходит также на поверхности изделия. Таким образом, полимер деградирует и внутри, и снаружи. Это значит, что активное вещество высвобождается за счет и диффузии, и растворения. Одним из недостатков

подобного явления может быть внезапное разрушение изделия и резкое высвобождение большой дозы активного вещества в организм.

Биоразлагаемость полимеров – главный критерий, по которому выбирается материал. Биоразлагаемость определяется химической (молекулярная масса, химический состав, фазовое состояние, растворимость, температурные характеристики) и надмолекулярной структурой полимеров. Биоразлагаемыми могут быть как гидрофильные, так и гидрофобные полимеры. Гидрофильным полимерам свойственно объемное разрушение (т.е. когда молекулы среды диффундируют внутрь быстрее, чем происходит сама деструкция), а гидрофобным полимерам свойственно и поверхностное (т.е. когда гидролиз полимера происходит на его границе со средой), и объемное разрушение.

Все полимерные структуры, используемые в регенеративной медицине для доставки клеточных культур и биологически активных веществ, можно разделить на неконтролируемые и контролируемые. В **неконтролируемых** системах скорость высвобождения включенных веществ и клеток зависит от деградации материала и скорости диффузии. В **контролируемых** системах высвобождение вещества регулируется такими внешними факторами, как растворение полимера ферментами в ране, изменениями pH и температуры.

С развитием полимерной химии особый интерес стали представлять **биоразлагаемые синтетические полимеры** [21]. В настоящее время они нашли широкое применение при создании скаффолдов. Ключевые преимущества таких полимеров - возможность адаптировать их механические свойства и контролировать кинетику деградации индивидуально для каждого скаффолда. Синтетические полимеры не менее привлекательны, чем природные полимеры, поскольку также позволяют изготавливать системы различной формы с желаемыми морфологическими особенностями пор, способствующими прорастанию в них тканей. Кроме того, такие полимеры могут быть получены с требуемыми реакционными функциональными группами.

Наиболее известные биоразлагаемые синтетические полимеры - полигликолевая кислота (PGA), полимолочная кислота (PLA) и их сополимеры (PLGA), поли(п-диоксанон) и сополимеры триметиленкарбоната и гликолида. Основные области применения этих полимеров в регенеративной медицине включают изготовление рассасывающихся швов и систем доставки лекарственных препаратов, разработку ортопедических фиксирующих устройства. Интерес к применению синтетических полиэфиров в первую очередь связан с легкостью их биоразложения путем гидролиза сложноэфирных связей. Продукты, полученные в результате этого разложения, в большинстве случаев подвергаются метаболическим превращениям до простейших конечных продуктов обмена или до продуктов, которые в зависимости от растворимости могут элиминироваться через выделительную систему (почки, легкие, потовые железы, кишечник).

Полимолочная (полиоксипропионовая) кислота - это термопластичный нетоксичный биосовместимый смарт-полимер, широко используемый для создания нано- и микроносителей лекарственных средств [30]. Деструкция PLA может протекать благодаря гидролизу под действием воды, деполимеризации по типу «расстегиваемой молнии» (катализируемая остатками катализатора полимеризации), хаотичной окислительной деструкции основной полимерной цепи, межмолекулярной переэтерификации с участием олигомерных и мономерных сложных эфиров, внутримолекулярной переэтерификации (с образованием олигомерных или мономерных лактидов с более низкой молекулярной массой).

На биодеструкцию PLA влияют ее молекулярная масса и степень кристалличности и определяется условиями среды (pH, ионная сила раствора). Например, частично кристаллический *поли-L*-лактид разрушается от нескольких месяцев до нескольких лет. При этом в основной среде его гидролиз протекает заметно быстрее, чем в кислой. А при pH, близких к нейтральной значению, наблюдается тенденция к возрастанию молекулярной массы полимера. В случае с *поли-L*-молочной кислотой разложение в организме займет несколько недель. Деструкция высокомолекулярной полностью аморфной D,L-PLA протекает от нескольких недель до нескольких месяцев. Наличие лекарственного вещества также может влиять на деструкцию PLA. Некоторые лекарственные препараты-амины катализируют гидролиз ее основной цепи.

Основным продуктом биодеструкции PLA является молочная кислота. А конечными продуктами метаболизма молочной кислоты в организме являются углекислый газ и вода, которые, в свою очередь, выводятся выделительной системой из организма.

Полигликолевая кислота – биodeградируемый жесткий термопластичный смарт полимер с высокой степенью кристалличности. Ее применение ограничено плохой растворимостью в большинстве органических растворителей (исключение – высокофторированные). Для скаффолдов на основе PGA характерным является гомогенный механизм разрушения, состоящий из двух стадий. Первая стадия (21 день) характеризуется простой гидролитической деструкцией полимера по типу разрыва цепи вследствие диффузии воды в аморфные области матрицы [31, 32]. На второй стадии (28 дней) большая часть аморфной фазы разрушена, и начинают разрушаться большие кристаллические области полимера.

Основным продуктом биодеструкции PGA при этом становится гликолевая кислота, которая в организме превращается в глиоксиловую кислоту, а после ее реакции с глицинтрансамилазой образуется глицин.

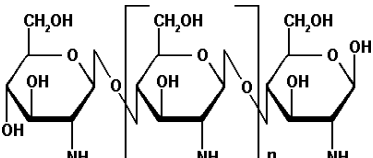
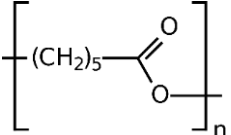
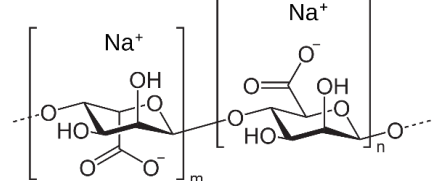
Сополимеры молочной и гликолевой кислот (PLGA) – термопластичные смарт полимеры, применяемые для создания микрокапсул пролонгированного действия. Свойства данного полимера зависят от его молекулярной массы и

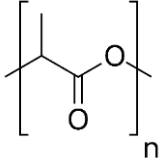
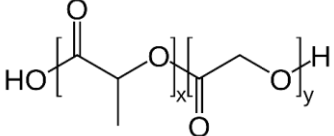
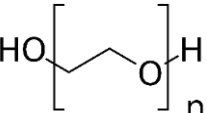
соотношения мономерных звеньев. Например, увеличение количества мономерных звеньев молочной кислоты в PLGA способствует гидрофобизации сополимера и уменьшению скорости биодеструкции. С уменьшением молекулярной массы полимера общее время деструкции изделия снижается.

Изделиям из PLGA присущ гомогенный механизм разрушения. Сам процесс биодеструкции PLGA проходит в три стадии: деструкция полимерной цепи с уменьшением молекулярной массы, которая сопровождается быстрой потерей веса образца с образованием водорастворимых олигомерных и мономерных продуктов и их последующим растворением.

Практическая работа № 5

Заполнить таблицу. Выделить функциональные группы полимеров, из предложенного списка расставить по таблице основные свойства, присущие полимеру. Используя дополнительную литературу, описать свойства, которые можно придать материалу при его модификации.

| Полимер | Основные свойства материала | Дополнительные свойства материала, получаемые в ходе его модификации |
|--|-----------------------------|--|
| <p>Хитозан</p>  | | |
| <p>Поликапролактон</p>  | | |
| <p>Альгинат натрия</p>  | | |
| <p>Полимолочная кислота (PLA)</p> | | |

| | | |
|---|--|--|
|  | | |
| Поли (молочно-гликолевая кислота) (PLGA)  | | |
| Полиэтиленгликоль  | | |

Варианты:

- 1) Биodeградируемость
- 2) Карбонильная функциональная группа, способная к гидролизу
- 3) Водорастворимость
- 4) Гелеобразование в присутствии катионов
- 5) Способен электростатически связываться с отрицательно заряженными поверхностями
- 6) Способность к образованию водородных связей
- 7) Способен к связыванию с белками за счет гидроксильных групп и карбонильных оксигенов
- 8) Гемосовместимость

Лабораторная работа № 5 «Исследование деградации микрокапсул в зависимости от условий среды»

Задача. Оценить деградацию микрокапсул в имитаторах сред желудка и кишечника

Реактивы и оборудование:

Микрокапсулы, полученные в лабораторной работе №4.

Имитаторы сред желудочно-кишечного тракта: 0.1 М соляная кислота, фосфатный буфер (рН 8), вода

Оборудование: магнитная мешалка, термостат суховоздушный, пробирки, пипетки автоматические на 5 мл, чашки Петри, микроскоп, спектрофотометр.

Ход работы.

Исследование растворения микрокапсул в имитаторе среды желудка:

Среду желудка моделировать раствором 0.1 М HCl. Через определенные промежутки времени отобрать аликвоты суспензии 1 мл и оценить наличие пика на длине волны 610 нм. В систему вернуть взятый объем 0.1 М HCl.

Эффективность высвобождения включенного объекта оценивать по наличию пика на спектре. Спустя 1 час целостность микрокапсул оценить на микроскопе.

Исследование растворения микрокапсул в имитаторе среды кишечника: Среду кишечника моделировать раствором фосфатного буфера. Через определенные промежутки времени отобрать аликвоты суспензии 1 мл и оценить наличие пика на длине волны 610 нм. В систему вернуть взятый объем буфера. Эффективность высвобождения включенного объекта оценивать по наличию пика на спектре. Спустя 2 часа целостность микрокапсул оценить на микроскопе.

Написать отчет о полученных результатах.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие классификации биосовместимых полимеров вы знаете?
2. Какие полимеры являются биodeградируемыми? Чем биodeградация отличается от биоэрозии?
3. Чем с точки зрения биodeградации различаются неконтролируемые и контролируемые полимерные структуры?
4. Какие биоразлагаемые синтетические полимеры вы знаете? Каково их применение в регенеративной медицине?

Тема 6. Полимерные пленки и покрытия

Классификация раневых покрытий осуществляется по нескольким признакам: составу и природе полимеров, используемых для их изготовления (например, природные или синтетические), структуре и форме (например, волокнистые, пленочные, гидроколлоидные), по назначению и функциональным свойствам (например, сорбционные, ранозаживляющие, защитные) [33].

По механизму действия на раневой процесс раневые покрытия и пленки могут быть пассивные (например, марля, вата), интерактивные (пленки, гели, коллоидные повязки), активные (повязки с лекарственными препаратами).

Интерактивные повязки способны поддерживать оптимальную для заживления раневую среду. Отдельную нишу занимают повязки комбинированного действия. Такие повязки накладывают с целью оптимизации заживления ран и ожогов. Они, как правило, являются многослойными и содержат различные лекарственные препараты (например, антисептики и глюкокортикоиды).

В идеале любое раневое покрытие должно быть по структурным и функциональным качествам схоже с кожей человека. При разработке раневого покрытия следует также помнить, что каждая стадия раневого процесса требует своего подхода.

Ранний этап раневого процесса (Рис. 8.1) протекает с большим количеством раневого отделяемого, что повышает риск возникновения инфекции. На данной

стадии целесообразно использовать адсорбционные повязки и покрытия, позволяющие с экссудатом удалить из раны еще и бактерии. Однако следует также помнить, что заживление раны происходит во влажной среде, а это значит, что повязка не должна способствовать полному удалению экссудата. На ранней стадии необходима частая смена повязки, что накладывает на материал одно важное свойство – его атравматичность. При создании комбинированных повязок, на данной стадии возможно также использовать лекарственные препараты антимикробного, дегидратирующего, некролитического или обезболивающего действия.

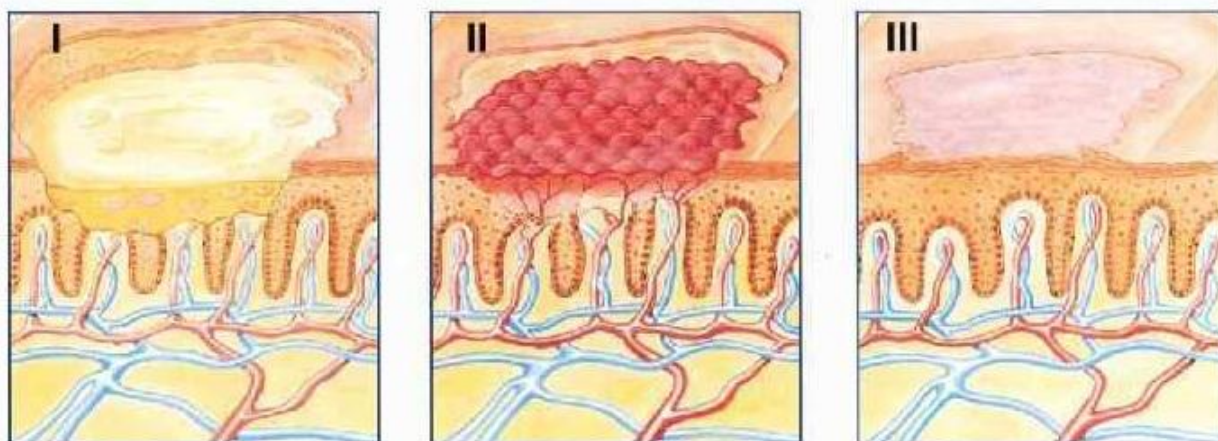


Рисунок 8 – Стадии заживления раны: I – стадия экссудации, II – стадия грануляции, III – стадия эпителизации [10]

На стадии грануляции раневого процесса (Рис. 8. II) начинается процесс регенерации. На данном этапе образуется соединительная ткань с новообразованными капиллярами, которая в дальнейшем трансформируется в более плотную рубцовую. На данном этапе повязка должна оставаться атравматичной. При комбинированном использовании лекарственных препаратов в повязке следует отдавать предпочтение тем, которые стимулируют процессы регенерации.

На стадии эпителизации (Рис. 8. III) необходима гидроактивная и атравматичная повязка или пленка, способная предотвратить чрезмерное пересыхание раны.

В качестве основы для раневых покрытий могут быть использованы текстильные полотна (тканевые, трикотажные и нетканые), полимерные материалы (сетки, пленки, губки, гидрогели, гидроколлоиды), высокомолекулярные порошки, пасты, мази, эмульсии, кремы, аэрозоли [33].

К атравматичным раневым покрытиям относятся различные сеточные материалы (марля) и перфорированные пленки. Марлевые покрытия могут быть предварительно пропитаны гидрофобными веществами (например, вазелином

или ланолином) или антибиотиками [34]. Это позволяет покрытию избежать прилипания к раневой поверхности и повысить эффективность терапии.

Однако невысыхающие гидрогелевые покрытия способствуют более быстрому заживлению, легко удаляются, способствуют регенерации. Но такие повязки целесообразно применять только в комплексе с антимикробными лекарственными препаратами.

Гидроколлоидные раневые покрытия представляют собой тонкую полиуретановую аморфную массу или пленку. При контакте с раневой поверхностью полимер осуществляет переход в желеобразное состояние [35]. Такое покрытие хорошо сорбирует экссудат и может применяться на ранних стадиях заживления ран, расположенных в труднодоступных местах или легко травмируемых при движениях (например, веки, межпальцевые промежутки).

Сорбирующие пленки состоят из трех слоев: мягкая оболочка из атравматичного к ране материала, сорбирующая прокладка и влагоотталкивающее полупроницаемое покрытие. Такие покрытия можно использовать на всех стадиях раневого процесса [34].

Некоторые покрытия можно сочетать с гидроколлоидными пастами, альгинатами, коллагеновыми покрытиями, а также с мазями и порошками [36]. В большинстве случаев раневые покрытия на основе коллагена получают в форме губок. Широко используются синтетические полимеры, например, поливиниловый спирт. Для него характерна высокая биосовместимость, гидрофильность и пластичность.

Способность некоторых смарт-полимеров осуществлять фазовый переход из развернутой глобулы в клубок, позволяет использовать их при разработке покрытий и пленок с контролируемой проницаемостью [37]. Обработка повязок поли-4-винилпиридином или поли(мет)акриловой кислотой позволяет менять их проницаемость с изменением pH. В случае обработки поли-4-винилпиридином проницаемость будет увеличиваться с понижением pH. Нанесение на повязку поли(мет)акриловой кислоты увеличит проницаемость при увеличении pH. Варьировать проницаемость можно за счет включения в состав повязки поли-N-алкилакриламидов, меняя температуру. В случае нанесения на поверхность покрытия гидрогеля следует помнить, что проницаемость будет меняться в зависимости от степени его набухания.

Практическое задание № 6

Задача. Разработать проект многофункциональной повязки с учетом физиологических особенностей раны.

Ход работы. Студенты разбиваются на три группы. Каждая группа по жребию получает свой клинический случай: ожог, обморожение и открытая резаная рана. Основываясь на клинической картине, необходимо для каждого случая разработать макет повязки с программируемым высвобождением. Студенты сами

подбирают полимеры, входящие в состав повязки, пропитку, определяют очередность нитей в повязке и обосновывают свой выбор.

Пластырь должен быть запрограммирован (каждый слой работает в необходимый момент) на высвобождение с учетом изменения температуры и кислотности среды в пораженном участке.

В качестве отчета студенты представляют макет покрытия, состоящий из проклеенных в выбранной последовательности действия разноцветных нитей. К макету необходимо написать отчет о проделанной работе, в котором должен быть описан предполагаемый механизм действия и обоснован выбор полимерных нитей.

Реактивы и оборудование:

Синяя нить (нить, пропитанная глюкокортикоидами)

Красная нить (нить, пропитанная новокаином или анальгином)

Желтая нить (нить, пропитанная антибиотиком – ципрофлоксацином)

Клеевой пистолет

Лабораторная работа № 6 «Получение многослойных пленок из биосовместимых полимеров»

Природные и синтетические полимеры могут быть заряжены за счет карбоксильных, сульфо- или аминогрупп. Метод послойной полиэлектролитной сборки (Layer-by-layer) основан на электростатическом притяжении между группами с противоположным зарядом [38-40]. Однако пленки данным методом могут формироваться за счет водородных связей и ковалентного взаимодействия. Полиэлектролитная сборка пленки осуществляется по схеме, приведенной на рис. 9.

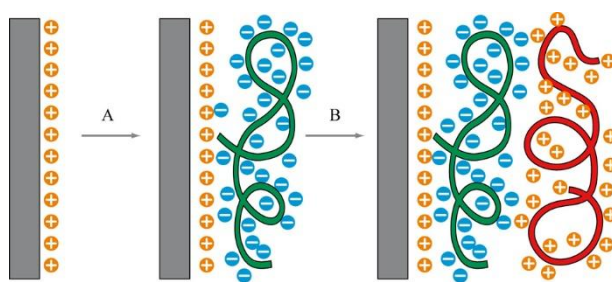


Рисунок 9 – Схема формирования пленки методом полиэлектролитной сборки

Включение биологически активных веществ в такие полимерные пленки может осуществляться путем его замешивания в один из полимеров, формирующих слой, путем его ковалентного сшивания с полимером или путем его нанесения в качестве слоя. Покрытия из таких пленок позволяют добиться контролируемого высвобождения веществ в биомедицинских имплантатах, а

также применять их самостоятельно в тканевой инженерии и в качестве систем адресной доставки лекарств.

Задача. Получение полимерных пленок методом полиэлектролитной сборки

Реактивы и оборудование:

1. Раствор 0.1% полистиролсульфоната
2. Раствор 0.1% поли(аллил)амин гидрохлорида
3. Вода деионизованная
4. Чашки Петри
5. Термостат суховоздушный
6. Предметное стекло

Ход работы:

Подложка с заряженным полимером погружается в раствор полимера с противоположным зарядом. Через определенное время происходит насыщение поверхности, после чего подложка с пленкой промывается растворителем для удаления избытка полимера. Затем подложка погружается в раствор полимера противоположного заряда. Операция повторяется необходимое количество раз. После промывки в зависимости от дальнейших целей слои могут быть высушены или оставлены влажными.

Написать реферат на тему «Способы исследования полимерных покрытий: капиллярность, гигроскопичность, разрывная нагрузка, паропроницаемость».

Вопросы для самопроверки

1. Какие классификации раневых покрытий вы знаете?
2. Опишите стадии протекания раневого процесса. Какие покрытия и повязки целесообразно использовать на каждом из этапов?
3. Приведите примеры атравматичных раневых повязок.
4. Чем отличаются между собой гидрогелевые, гидроколлоидные и сорбирующие пленки?
5. Опишите принцип полиэлектролитной сборки при формировании пленок полимеров.

Тема 7. Полимерные нити

Формование химических волокон – комплекс процессов, протекающих с образованием нитей из тонких струек при продавливании прядильного расплава или раствора полимера через отверстия фильеры с последующим их затвердеванием.

Химические волокна - это волокна, получаемые из природных, искусственных и синтетических высокомолекулярных соединений. Поскольку формирующие их полимеры могут быть различной природы, то выделяют **органические** и **неорганические** химические волокна. Органические волокна делятся на **природные** и **синтетические**.

Когда речь идет о формировании полимерного волокна, имеет смысл ввести понятие волокнообразующего полимера. **Волокнообразующие полимеры** – полимеры (природные, искусственные или синтетические), которые могут быть использованы для формирования химических волокон. Полимер, как правило, подбирается в зависимости от требуемых свойств будущего волокна и отвечает шести основным требованиям: есть возможность перевода полимера в вязкотекучее состояние плавлением или растворением; имеет линейную конформацию макромолекул с минимальным числом разветвлений; имеет степень полимеризации и узкое молекулярно-массовое распределение; имеет высокую гибкость макромолекулярной цепи; имеет регулярную структуру; имеет полярные и реакционноспособные группы [41].

Что будет, если критерии не соблюдать? Если взять полимер с очень низкой молекулярной массой, волокно будет получаться хрупким и с низкими физико-механическими показателями. В случае слишком высокой молекулярной массы (более 8×10^4 Да) расплав или раствор, из которого формируется нить, будет иметь очень высокую вязкость. Вязкость растворов полимеров должна быть в пределах 3-50 Па·с, а расплавов полимеров – 60-400 Па·с. Однако бывают исключения (например, когда волокна формируются из расплавов полимеров с вязкостью 1000 Па·с). Поэтому полимер подбирается исходя из его вязкости и температурных характеристик. Линейность молекулы также является одним из важнейших критериев при выборе волокнообразующего полимера. Линейные полимеры с высокой степенью асимметрии и стереорегулярностью позволяют обеспечить высокую степень межмолекулярного взаимодействия и соответственно формировать более прочные волокна. Чрезмерная регулярность полимера, однако, затрудняет его переход в вязкотекучее состояние и ограничивает возможность формирования. Наличие разветвлений затрудняет ориентацию макромолекул в ходе формирования и вытягивании нитей. Сшитые полимеры непригодны для получения волокон. Гибкость макромолекулярной цепи полимеров также должна быть достаточно высокой. При росте гибкости макромолекулярной цепи становится легче переход волокнообразующего полимера в раствор или расплав. С ростом гибкости облегчается и процесс кристаллизации в ходе формирования. Данный параметр тесно связан с температурой размягчения. Например, полисилоксаны, полиэтилен и нестереорегулярный поливинилхлорид, несмотря на гибкость цепи, являются непригодными для формирования, поскольку температура их размягчения лежит ниже 100°C .

Особое внимание следует уделить наличию полярных и реакционных групп у волокнообразующего полимера. Реакционная группа способна наделять получаемое волокно определенными свойствами (Таблица 3).

Таблица 3. Зависимость свойств волокна от наличия некоторых реакционных групп.

| Реакционные группы | Пример | Свойство |
|--------------------|--------|----------|
|--------------------|--------|----------|

| | | |
|--|-------------------|--|
| Гидрофильные группы | - COOH | Волокна, способные поглощать воду и водяные пары. Гидроксильная группа (-OH) обеспечивает невысокую прочность волокна в мокром состоянии и высокую склонность к деформациям под нагрузкой. Аминогруппы и карбоксильные группы придают волокнам ионообменные свойства и облегчают их окрашивание. |
| | - OH | |
| | - NH ₂ | |
| Циано-группы | - CN | Получение гидрофобных химически стойких волокон |
| Наличие атомов | Cl F | |
| Гетерополярные связи в основной макромолекулярной цепи | C-O | Снижают устойчивость волокон к воздействию кислот, щелочей, воды или кислорода, особенно при повышенных температурах |
| | C-N | |

Производство химических волокон включает в себя **три стадии**: приготовление прядильных растворов/расплавов, формование волокон и их отделка [41].

Как должен быть правильно приготовлен прядильный раствор полимера для дальнейшего формования? После того, как полимер подобран и соответствует всем необходимым критериям, его раствор должен быть очищен от всех возможных примесей и пузырьков воздуха. Затем в раствор/расплав можно ввести биологически активные вещества и прочие добавки для термо- или светостабилизации волокна. После этого раствор/расплав можно подавать на прядильную установку и начинать формование волокна.

Формование волокон включает в себя следующие **разновидности** в зависимости от прядильного раствора/расплава: формование из расплава полимера (**полунепрерывное** и **прямое**); мокрое формование из раствора полимера (**без протекания химических реакций** и **с протеканием химических реакций**); сухое формование из раствора полимера; сухо-мокрое формование из раствора полимера (с применением газовой прослойки между фильерой и зеркалом осадительной ванны); формование из дисперсии полимера (отсутствует возможность перевода полимера в вязкотекучее состояние путем расплавления или растворения); гель-формование [42]. В таблице 4 представлены примеры получаемых химических волокон.

Таблица 4. Примеры получаемых волокон в зависимости от метода формования [41].

| | |
|----------------------------|------------------------|
| Методика формования | Примеры волокон |
|----------------------------|------------------------|

| | |
|---|---|
| Формование из расплава полимера | Полиолефиновые (полиэтилен, полипропилен), полиэфирные (полиэтилентерефталат, жидкокристаллические ароматические полиэфирные и сополиэфирные), полиамидные (полигексаметиленадипинамид, поликапроамид и другие алифатические полиамиды), полифторолефиновые (плавкие сополимеры тетрафторэтилена) |
| Сухое формование из раствора полимера | Ацетатные (растворители: смесь ацетона с водой, смесь метилхлорида с этиловым спиртом) и полиакрилонитрильные (растворители: диметилформамид, диметилсульфоксид, этиленкарбонат) волокна |
| Мокрое формование из раствора полимера | Вискозные (растворители: смесь уксусной кислоты с уксусным ангидридом; осадитель: ее водный раствор), полиакрилонитрильные (растворители: водный раствор роданида натрия, диметилформамид, диметилацетамид; осадитель: водный раствор этих соединений), поливинилхлоридные (растворитель: вода, осадитель: водный раствор Na_2SO_4) |
| Сухо-мокрое формование из раствора полимера | Термостойкие волокна на основе ароматических полиамидов и полиэфиров |

В процессе **сухого формования из раствора** происходит испарение растворителя из струи раствора полимера. Оно происходит в результате контакта формируемой нити с горячим воздухом или паровоздушной смесью. Электростатическое формование из раствора по сухому способу используется для получения ультратонких микро- и нановолокон.

Образование волокна при **мокроем способе формования из раствора** полимера происходит в результате взаимодействия струи раствора с осадительной ванной. Компоненты осадительной ванны диффундируют в струю раствора, а растворитель диффундирует из струи в осадительную ванну, раствор коагулирует и полимер осажается в виде нитей.

В процессе **формования из расплава** нити образуются за счет охлаждения струи расплава полимера при температуре ниже его температуры плавления.

Практическая работа № 7

Заполните таблицу из предложенных ниже вариантов. Приведите примеры полимеров, содержащие те или иные реакционные группы. Какие из этих полимеров могут быть использованы в регенеративной медицине?

Реакционные группы: имидогруппа, карбоксильная группа, гидроксильная группа, фенил-группа, изопренил-группа, алкил-группа, альдегидная группа, пропил-группа, кетоновая группа, аминогруппа, метиловая группа, сульфогидрильная группа, амидогруппа, этиловая группа

| Гидрофильные группы | | Гидрофобные группы | |
|---------------------|----------|--------------------|----------|
| Структура | Название | Структура | Название |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

Лабораторная работа № 7 «Электроформование нановолокон из растворов природных полимеров»

Электроформование – это процесс получения нановолокон под действием электростатических сил на электрически заряженную струю раствора или расплава волокнообразующего полимера. На Рис. 10 представлена схема процесса получения нановолокна методом электроформования [43, 44].

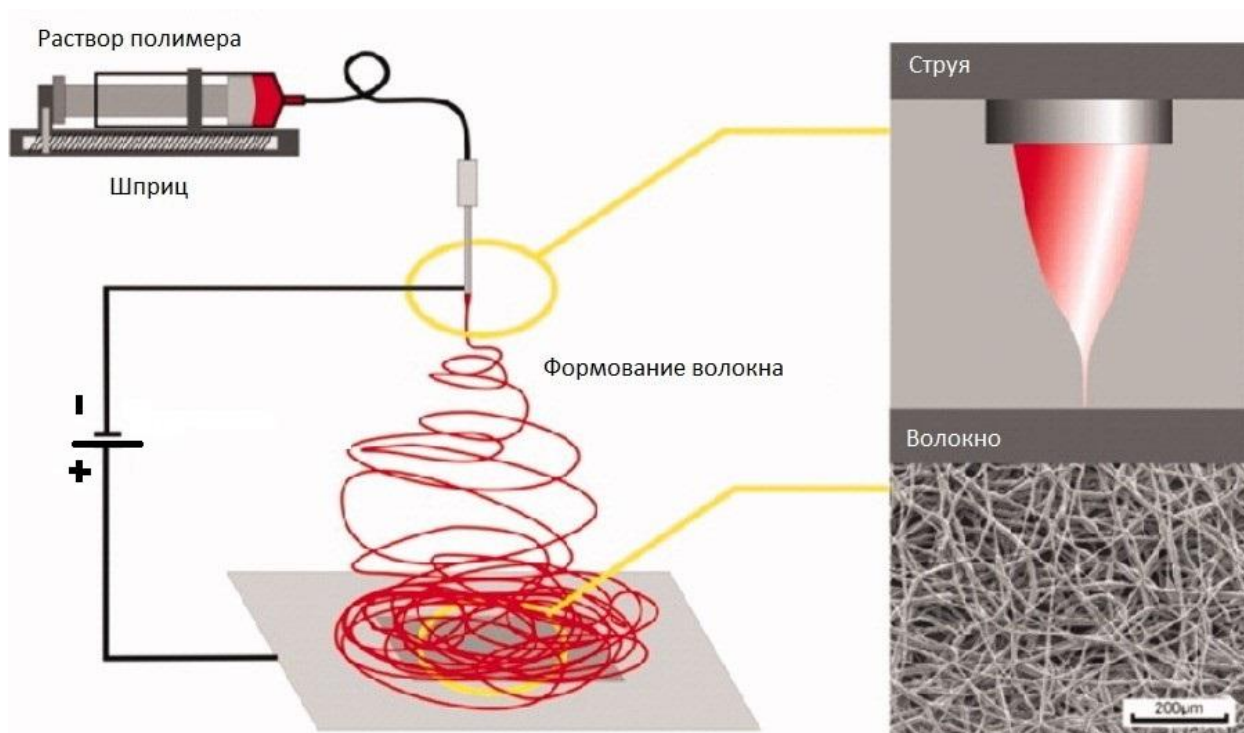


Рисунок 10 – Схема процесса получения нановолокна методом электроформования

К раствору полимера прикладывается напряжение 10-60 кВ. Раствор полимера подается через капилляр при помощи дозатора. В растворе полимера индуцируются одноименные электрические заряды. В результате кулоновского

электростатического взаимодействия раствор полимера вытягивается в тонкую струю. Полученная струя твердеет за счет испарения растворителя, формируя волокно. Под действием электростатических сил волокно дрейфует к противоположно заряженной подложке.

Для полученных нановолокон характерна сверхразвитая структура и высокая пористость, что повышает их эффективность в качестве перевязочных средств нового поколения. Особенно перспективными в качестве перевязочных средств являются нановолокна из хитозана ввиду его выраженных гемостатических, бактериостатических и фунгистатических свойств. Нановолокна хитозана получают формированием из кислых растворов (например, из раствора уксусной кислоты).

Задача. Освоение методики получения нановолокон хитозана методом электроформования на установке Nanospyder.

Реактивы и оборудование: хитозан (ММ 200 кДа), полиэтиленоксид, уксусная кислота, вода, установка Nanospyder.

Ход работы. Перед началом работы приготовить раствор хитозана концентрации 3.0% мас. в 70 %-ной уксусной кислоте. В раствор добавить технологическую добавку – полиэтиленоксид в количестве 0,3 % мас. Поскольку вязкость раствора хитозана падает вследствие кислотного гидролиза с течением времени, рекомендуется в работе использовать только свежие растворы. Формование нановолокон проводить следующих параметрах: межэлектродное расстояние 125 мм, напряжение 70 кВ, скорость вращения волокнообразующего электрода 7 об/мин.

По результатам работы написать отчет, приложив полученные образцы.

Вопросы для самоконтроля

1. Что такое химическое волокно? Назовите их классификации.
2. Что такое электроформование и для чего оно используется в регенеративной медицине?
3. Каким образом свойства волокна зависят от реакционных групп полимеров?
4. Какие способы формования вы знаете? В чем их различия?
5. Как готовится прядильный раствор полимера? Что нужно учитывать?
6. Какие волокнообразующие полимеры вы знаете? По каким критериям они подбираются?

Тема 8. Скаффолды и 3D принтинг

Скаффолды – особый класс современных локализованных многофункциональных биоразлагаемых систем доставки веществ с

регулируемыми свойствами (доставка лекарственных средств, регенерация), используемые в регенеративной медицине [45, 46].

Концепцией трехмерных скаффолдов является наличие ряда биоинженерных свойств, позволяющих ему восстанавливать поврежденные ткани и органы, имитируя физиологические процессы в замещаемых структурах. Скаффолд, не обладающий достаточной биологической активностью, препятствует регенеративному процессу. Включение в скаффолд лекарственных веществ позволяет не только достигнуть желаемого уровня биологической активности и регенерации, но и обеспечить успешную миграцию, пролиферацию и дифференцировку клеток в месте повреждения ткани, обеспечить снижение воспаления [47, 48].

Современные скаффолды разрабатываются индивидуально для каждой поврежденной ткани и наделяются набором необходимых характеристик (Рис. 11). Однако, существует ряд общих свойств, которыми должны обладать скаффолды, а именно: биосовместимость, биологическая активность и наличие адгезионной поверхности для клеток [45].

Известны **три типа скаффолдов**: экстракорпоральные системы, закрытые имплантаты и открытые импланты.

Скаффолды могут быть в различных фазовых состояниях: гели, порошки, растворы. Скаффолды характеризуются свойствами полимера, формой, механическими свойствами и возможностью диффузии кислорода. Для регенеративной медицины получают дву- и трехмерные скаффолды в виде ультратонких пленок, резорбируемых мембран и твердотельных высокопористых губок [49].

Имитация структуры внеклеточного матрикса – основное качество, которым должен обладать любой скаффолд. Внутренняя архитектура скаффолдов определяет его функционал. Скаффолд имеет трехмерную пористую структуру, которая позволяет клеткам заселять его. У скаффолдов есть макропоры (до 300 мкм), мезопоры (до 50 нм) и микропоры (до 2 нм) [46]. Макропоры позволяют клеткам мигрировать и заселять скаффолды. Мезопоры и микропоры обеспечивают циркуляцию биологически активных веществ внутри каркаса и их диффузию в поврежденные ткани. Для создания скаффолдов используют синтетические (PLA, PLGA) и природные (хитозан, фиброин шелка, коллаген) полимеры. Например, из агарозы получают микропористые скаффолды, засеянные хондроцитами, для восстановления дефектов хряща. Поскольку многие синтетические полимеры гидрофобные (например, PGA, PLA) с целью улучшения адгезии клеток целесообразными будут химическая модификация поверхности скаффолда и его плазменная обработка.

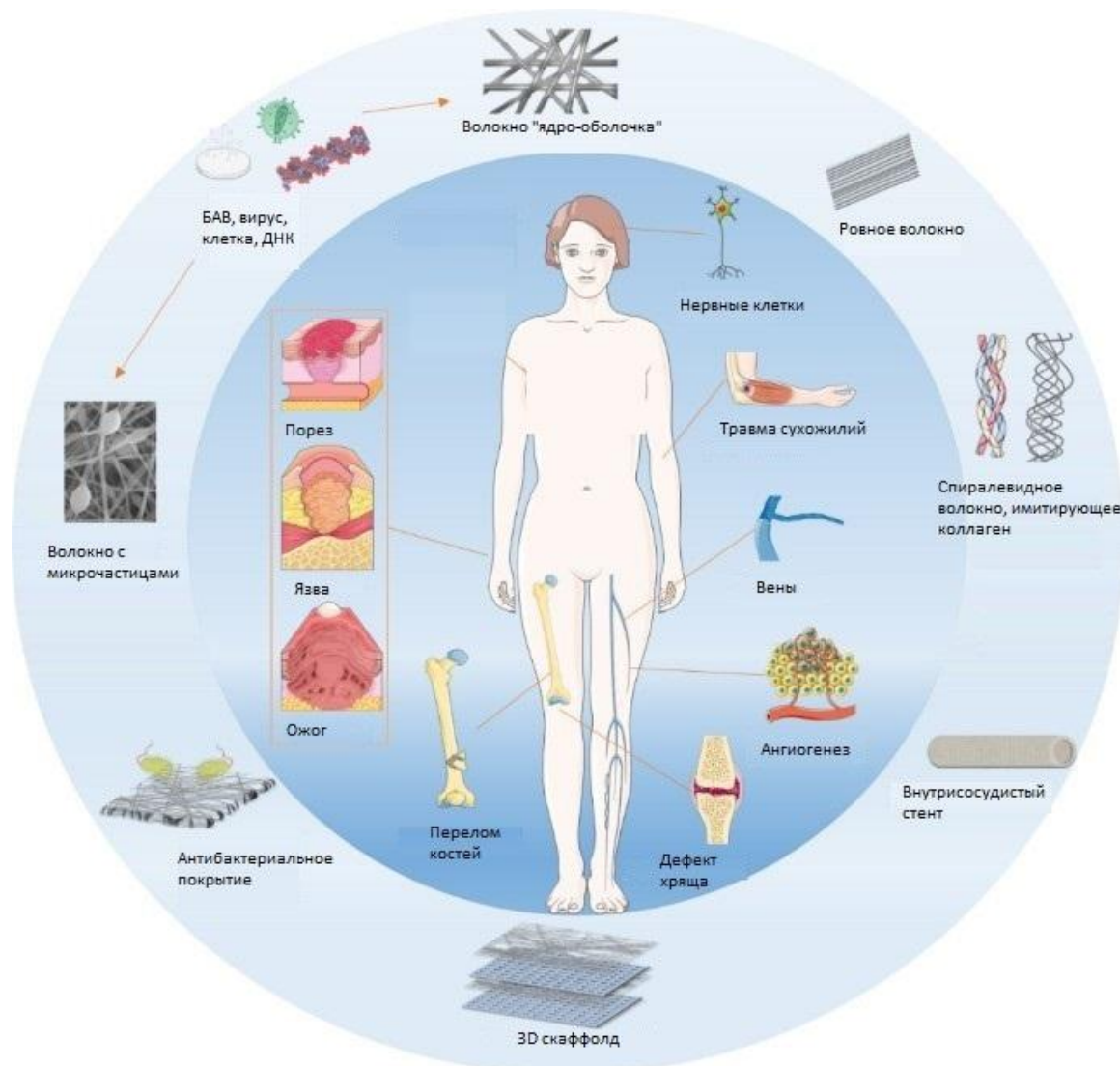


Рисунок 11 – Возможные применения скаффолдов в регенеративной медицине

Включение биологически активных веществ в скаффолд осуществляется путем их смешивания с полимерами до этапа формирования трехмерной структуры [45]. При данном способе включения полностью отсутствует контакт включаемого вещества с различными химическими растворителями, что сохраняет его активность.

Другое возможное включение в скаффолд основано на формировании полиионных комплексов между биологически активным веществом и полимером. Данный принцип схож с полиэлектролитной сборкой многослойной пленки (ранее рассмотрено в лабораторной работе 2). Но такой способ включения может снижать активность включаемого в скаффолд вещества.

В том случае, если включаемое активное вещество имеет реакционноспособные функциональные группы (например, тиоловые группы, аминогруппы), то возможным решением его включения в скаффолд станет ковалентное связывание с полимером. Данный метод рекомендуется только в том случае, когда никакими иными способами включить вещество не представляется

возможным. Высвобождение вещества будет осуществляться за счет ферментативного гидролиза.

Коллаген - основной компонент соединительной ткани млекопитающих. Данный биосовместимый и биodeградируемый природный полимер с успехом используется в регенеративной медицине благодаря его естественной способности связывать клетки. Из коллагена получают пористые губки, пленки, волокна и макропористые каркасы. Гелеобразование у коллагена происходит в нейтральных условиях рН, что позволяет включать в него клетки. Скаффолды из коллагена широко применяются для регенерации тканей, кожи, костей, сердечных клапанов и связок [50]. Основные трудности в его применении в качестве скаффолда для иммобилизации клеток заключаются в высокой стоимости очистки, изменчивости выделенного материала и различиях ферментативной деградации в зависимости от места имплантации.

Трансплантация человеческих органов - критическая и по сей день не решённая проблема в современном мире. 3D-биопринтинг - относительно новая и стремительно развивающаяся область в регенеративной медицине.

Трёхмерная печать (3D-биопринтинг) — это технология послойного производства трёхмерных тканевых и органных конструкторов согласно заданной цифровой модели с использованием живых клеток в качестве печатного материала [51]. Может, в свою очередь, делиться на экструзионную, струйную и лазерную. В **струйном биопринтинге** механическая головка струйного принтера формирует капли геля с культурами клеток. В основе **лазерного биопринтинга** лежит лазер-индуцированный прямой и очень точный перенос на подложку полимеров и клеток. Трёхмерная **экструзионная биопечать** использует механическую платформу, перемещающуюся в двух плоскостях, и форсунку, передвигающуюся по вертикали.

Направление биопечати сочетает в себе практические и теоретические знания одновременно из биоинженерии, биологии, эмбриологии, биохимии, прикладной биотехнологии и информатики. Для 3D принтинга требуется биопринтер, клеточный материал и основа для будущего 3D-скаффолда (полимеры природного, синтетического или смешанного происхождения).

Сам процесс 3D-биопечати включает в себя этап «подготовки», этап «производства» и этап «постпринтинга». На этапе подготовки проводится трёхмерное моделирование объекта в САПР или CAD системах, выбор полимера, подбор и культивирование необходимой клеточной культуры. На этапе «производства» формирование трёхмерного скаффолда происходит путем послойного нанесения различных биоматериалов и живых клеток. Биопринтер автоматически на основании управляющей программы последовательно наносит различные материалы формируя трёхмерный скаффолд. Клеточная культура вводится в специальную камеру биопринтера, из которой через форсунку наносится на скаффолд [52]. На этапе «пост-принтинга» происходит

стабилизация структуры напечатанного объекта и его последующее «дозревание» в биореакторах.

Природные полимеры лидируют в качестве основных компонентов 3D-печатных «имплантов», поскольку путем изменения физических, химических, биохимических и физиологических свойств позволяют контролировать поведение клеток [53]. Теоретически любые биополимеры, способные к золь-гель фазовым переходам, при определенных условиях можно использовать в 3D-печати. Однако немногие из них применимы при необходимых условиях для клетки.

Клеточные культуры, используемые для 3D-биопринтинга весьма разнообразны и включают в себя кератиноциты, мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки (ММСК), фибробласты на коллагеновой подложке.

Практическая работа № 8

Адгезивность клеток к поверхности полимера можно обеспечивать модификацией поверхности скаффолда белками внеклеточного матрикса. К таким белкам относятся фибронектин, витронектин, коллаген и т.д.

На основании анализа литературы опишите: какие белки внеклеточного матрикса наиболее часто используются для регенерации костной ткани? Какими способами осуществляется модификация поверхности таких скаффолдов? Какие полимеры используются в скаффолдах для регенерации костной ткани?

Лабораторная работа № 8 «Исследование пористости полимерных скаффолдов»

Пористость – величина, численно равная общему объему пор (пустот) V_{Π} в единице объема образца V_0 :

$$\Pi = \frac{V_{\Pi}}{V_0}$$

Значения пористости образцов может быть от 0 (непористый материал) и стремиться к 1 (такое встречается у пористых губок). Пористость играет очень важную роль в системах контролируемой доставки, поскольку высвобождение биологически активного вещества осуществляется через заполненные водой поры. Поры образуются в результате разделения фаз во время приготовления системы доставки или скаффолда, путем растворения и выщелачивания растворимых вспомогательных веществ, путем высвобождения биологически активного вещества.

Наличие пор в структуре скаффолда крайне важно, поскольку они обеспечивают трехмерный рост клеток. Чем более развита система пор в скаффолде, тем лучше метаболизм, пролиферативная активность и дифференцировка клеток.

Методы определения пористости делятся на **экспериментальные** и **расчетные** [54]. Среди экспериментальных методов стоит выделить жидкостную, ртутную и газовую порометрии, метод проницаемости, газодинамические, методы непосредственного наблюдения пор, капиллярные и сорбционные.

Одна из простых расчетных методик определения пористости образца основывается на законах физики и гидростатическом взвешивании [55]:

$$m'g + F_A = mg$$

где $m'g$ – вес образца в жидкости, mg – вес образца в воздухе

Выталкивающая сила высчитывается по формуле:

$$F_A = \rho_{ж}gV_0$$

где $\rho_{ж}$ – плотность жидкости; g – ускорение свободного падения; V_0 – объем, занимаемый образцом вместе с порами.

Для расчета примем:

$$V_0 = V_{\Pi} + V_B$$

где V_{Π} – объем пор, недоступных для жидкости при гидростатическом взвешивании, V_B – объем, занимаемый веществом.

Объем, занимаемый веществом, или его плотность можно высчитать по формуле:

$$m = V_B \rho$$

где ρ – плотность непористого вещества.

Тогда пористость образца можно рассчитать по формуле:

$$\Pi = \frac{V_{\Pi}}{V_0} = 1 - \frac{\rho_{\Gamma}}{\rho}$$

где ρ_{Γ} – плотность вещества, определяемая гидростатическим методом.

Задача. Ознакомиться и освоить методику определения пористости различных материалов

Реактивы и оборудование: образец полимерного скаффолда, вода, мерный цилиндр, стакан, электронные весы, штангенциркуль.

Ход работы. На электронных весах в стакане взвесить сухой образец скаффолда. Измерить штангенциркулем размеры полимерного образца и вычислить его объем. По формуле рассчитать плотность образца. В случае, если объем образца рассчитать не представляется возможным, уточнить у преподавателя его состав и по таблице найти значение плотности. Налить в стакан 20 мл воды. Взвесить, записать значения. Добавить образец, записать массу образца. По мерной колбе определить объем образца в воде. Рассчитать плотность образца при гидростатическом взвешивании. Определить по формуле пористость.

По результатам работы написать эссе о методах определения пористости материалов.

| Полимер | Плотность |
|--------------------|-----------------------|
| Альгинат натрия | 1,0 г/см ³ |
| Хитозан | 1,0 г/см ³ |
| Желатин | 1,4 г/см ³ |
| Поливинипирролидон | 1,2 г/см ³ |

Вопросы для самоконтроля

1. Что такое скаффолд? Какие типы скаффолдов вы знаете?
2. Опишите качества, которыми должен обладать скаффолд.
3. Как определить пористость скаффолда?
4. Какие полимеры используются для формирования скаффолдов?
5. Где в регенеративной медицине наиболее часто применяются скаффолды?
6. В чем связь между скаффолдом и 3D-печатью? Опишите основные стадии трехмерной печати.

Список литературы

1. Регенеративная медицина. Практикум: учебное пособие / под ред. П.В. Глыбочко, Е.В. Загайновой. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2023. – 144 с.
2. Berthiaume F., Maguire T. J., Yarmush M. L. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges //Annual review of chemical and biomolecular engineering. – 2011. – Т. 2. – С. 403-430.
3. Митрошин А. Н. и др. Современные представления о применении скаффолдов в регенеративной медицине (обзор литературы) //Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2019. – №. 2 (50). – С. 133-143.
4. Регенеративная медицина / под ред. П.В. Глыбочко, Е.В. Загайновой. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2023. – 456 с.
5. Pradas M. M., Vicent M. J. Polymers in regenerative medicine: biomedical applications from nano-to macro-structures. – John Wiley & Sons, 2015.
6. Физико-химические основы биотехнологии. Практикум: учеб. пособие [по курсам «Биофизика», «Биофизическая химия» и «Биоколлоидная химия» для студ. направл. подг. «Биотехнология», в т. ч. иностр. студ.] / А. Н. Огурцов, О. Н. Близняк, Л. А. Антропова. – Х.: НТУ «ХПИ», 2014. – 288 с. – На рус. яз.
7. Попова Е. В. и др. Микрокапсулы из альгината натрия и карбопола: методика получения, эффективность включения и высвобождения полифенолов //Известия Академии наук. Серия химическая. – 2021. – №. 7. – С. 1335-1340.
8. Целуйко С. С., Красавина Н. П., Семенов Д. А. Регенерация тканей. – 2016. – 136 с.

9. «Ожоги и отморожения». Учебно-методическое пособие. – Волгоград: ВолгГМУ, 2011.– 86с.
10. Раны и раневая инфекция: Руководство для врачей / Под ред. М. И. Кузина, Б. М. Костюченко. – М.: Медицина, 1990. – 592 с.
11. Кедик С. А. и др. Полимеры для систем доставки лекарственных веществ пролонгированного действия (обзор) //Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2013. – Т. 3. – №. 2. – С. 18-32.
12. Марычев С.Н., Калинин Б.А. Полимеры в медицине: Учеб. пособие/ Владим. гос. ун-т; Владимир, 2001. 68 с.
13. Ward M. A., Georgiou T. K. Thermoresponsive polymers for biomedical applications //Polymers. – 2011. – Т. 3. – №. 3. – С. 1215-1242.
14. Кедик Е. С. и др. Полимерные микрочастицы для медицины и биологии //М.: ИФТ. – 2014.
15. Агапова О. И. Биоинженерные конструкции на основе фиброина шелка и спидроина для регенеративной медицины и тканевой инженерии (обзор) //Современные технологии в медицине. – 2017. – Т. 9. – №. 2. – С. 190-206.
16. Elangwe C. N. et al. Pullulan-based hydrogels in wound healing and skin tissue engineering applications: A review //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Т. 24. – №. 5. – С. 4962.
17. Lee S. Y. et al. Polysaccharide-based hydrogels for microencapsulation of stem cells in regenerative medicine //Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2021. – Т. 9. – С. 735090.
18. Cheema U., Ananta M., Mudera V. Collagen: applications of a natural polymer in regenerative medicine //Regenerative Medicine and Tissue Engineering-Cells and Biomaterials. – 2011. – С. 287-300.
19. Hacker M. C., Krieghoff J., Mikos A. G. Synthetic polymers //Principles of regenerative medicine. – Academic press, 2019. – С. 559-590.
20. Francis A. Biological evaluation of preceramic organosilicon polymers for various healthcare and biomedical engineering applications: A review //Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. – 2021. – Т. 109. – №. 5. – С. 744-764.
21. Gunatillake P. A., Adhikari R., Gadegaard N. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering //Eur Cell Mater. – 2003. – Т. 5. – №. 1. – С. 1-16.
22. Nikkola L. Methods for controlling drug release from biodegradable matrix and development of multidrug releasing materials. – 2009.
23. Кузнецов, А.К., Захарова, И.М. Лабораторный практикум по курсу «Физико-химия полимеров»: учеб. пособие для студентов специальности 240201 «Технология и оборудование производства химических волокон и композиционных материалов на их основе» / ГОУ ВПО «Иван. гос. хим.-технол. ун-т. Иваново, 2007. 96 с.

24. Lim G. J. et al. Cell microencapsulation //Therapeutic Applications of Cell Microencapsulation. – 2010. – С.126-136.
25. Siepmann J. et al. Fundamentals and applications of controlled release drug delivery. – New York: Springer, 2012. – Т. 3. – С. 33-34.
26. Коноплева Е. Фармакология 2-е изд., испр. и доп. Учебник и практикум для вузов. – Litres, 2020.
27. Gasperini L., Mano J. F., Reis R. L. Natural polymers for the microencapsulation of cells //Journal of the royal society Interface. – 2014. – Т. 11. – №. 100. – С.20140817.
28. Samal S. K., Dubruel P. (ed.). Cationic polymers in regenerative medicine. – Royal Society of Chemistry, 2014.
29. Pandolfi V. et al. Alginate-based cell microencapsulation for tissue engineering and regenerative medicine //Current pharmaceutical design. – 2017. – Т. 23. – №. 26. – С. 3833-3844.
30. Sharma S. et al. Critical review of biodegradable and bioactive polymer composites for bone tissue engineering and drug delivery applications //Polymers. – 2021. – Т. 13. – №. 16. – С. 2623.
31. Gunatillake P., Mayadunne R., Adhikari R. Recent developments in biodegradable synthetic polymers //Biotechnology annual review. – 2006. – Т. 12. – С. 301-347.
32. Caramella C. et al. Controlled delivery systems for tissue repair and regeneration //Journal of Drug Delivery Science and Technology. – 2016. – Т. 32. – С. 206-228.
33. Куринова М. А., Гальбрайт Л. С., Скибина Д. Э. Современные раневые покрытия (обзор) //Современная медицина: актуальные вопросы. – 2015. – №. 10-11 (43). – С. 137-145.
34. Андреев Д. Ю. и др. Современные раневые покрытия. Часть II //Вестник хирургии имени ИИ Грекова. – 2009. – Т. 168. – №. 4. – С. 109-112.
35. Pawar H. Development and characterisation of medicated wound dressings for chronic wound healing : дис. – University of Greenwich, 2013.
36. Sikka M. P., Midha V. K. The role of biopolymers and biodegradable polymeric dressings in managing chronic wounds //Advanced Textiles for Wound Care. – Woodhead Publishing, 2019. – С. 463-488.
37. Hu L. et al. (ed.). Smart Stimuli-responsive Polymers, Films, and Gels. – John Wiley & Sons, Incorporated, 2022.
38. Park S. et al. Layer-by-layer assembled polymeric thin films as prospective drug delivery carriers: design and applications //Biomaterials research. – 2018. – Т. 22. – С. 1-13.
39. Richardson J. J., Björnmalm M., Caruso F. Technology-driven layer-by-layer assembly of nanofilms //Science. – 2015. – Т. 348. – №. 6233. – С. aaa2491.
40. Richert L. et al. Layer by layer buildup of polysaccharide films: physical chemistry and cellular adhesion aspects //Langmuir. – 2004. – Т. 20. – №. 2. – С. 448-458.

41. Шиповская А.Б. Реологические свойства растворов и расплавов волокнообразующих полимеров: Учебно-методич. пособие. – Саратов: Саратовск. госуниверситет, 2015. – 37 с.: ил.
42. Матвеев А. Т., Афанасов И. М. Получение нановолокон методом электроформования //Уч. пос.–М.: МГУ. – 2010.
43. Прокопчук Н. Р. и др. Электроформование нановолокон из раствора хитозана (обзор) //Полимерные материалы и технологии. – 2015. – Т. 1. – №. 2. – С. 36-56.
44. Мулярчик В. В. и др. Получение нановолокон из хитозана методом электроформования //Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия физико-технических наук. – 2014. – №. 4. – С. 5-8.
45. Егорихина М. Н., Мухина П. А., Бронникова И. И. Скаффолды как системы доставки биологически активных и лекарственных веществ //Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2020. – Т. 9. – №. 1. – С. 92-102.
46. Luo Y. et al. 3D Scaffolds //Principles of tissue engineering. – Academic Press, 2014. – С. 475-494.
47. Nikolova M. P., Chavali M. S. Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review //Bioactive materials. – 2019. – Т. 4. – С. 271-292.
48. Митрошин А. Н. и др. Современные представления о применении скаффолдов в регенеративной медицине (обзор литературы) //Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2019. – №. 2 (50). – С. 133-143.
49. Zhong H. et al. Electrospinning nanofibers to 1D, 2D, and 3D scaffolds and their biomedical applications //Nano Research. – 2022. – Т. 15. – №. 2. – С. 787-804.
50. Wang Z. et al. Pharmaceutical electrospinning and 3D printing scaffold design for bone regeneration //Advanced drug delivery reviews. – 2021. – Т. 174. – С. 504-534.
51. An J. et al. Design and 3D printing of scaffolds and tissues //Engineering. – 2015. – Т. 1. – №. 2. – С. 261-268.
52. Ovsianikov A. et al. Laser printing of cells into 3D scaffolds //Biofabrication. – 2010. – Т. 2. – №. 1. – С. 014104.
53. Срослова Г. А. и др. Природные полимеры для 3D-биопечати органов //Природные системы и ресурсы. – 2019. – Т. 9. – №. 4. – С. 30-40.
54. Фандеев В. П., Самохина К. С. Методы исследования пористых структур //Вестник евразийской науки. – 2015. – Т. 7. – №. 4 (29). – С. 101
55. Нанотехнологии и наноматериалы : метод. указания к практ. занятиям / Минобрнауки России, ОмГТУ ; [сост.: Ю. К. Машков, В. А. Егорова, О. В. Малий]. – Омск : Изд-во ОмГТУ, 2018

Попова Елена Викторовна

Полимеры в регенеративной медицине. Практикум

Учебно-методическое пособие

В авторской редакции

Редакционно-издательский отдел Университета ИТМО

Зав. РИО

Н.Ф. Гусарова

Подписано к печати

Заказ №

Тираж

Отпечатано на ризографе

Редакционно-издательский отдел
Университета ИТМО
197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49, литер А