

На правах рукописи



Загоскин Юрий Дмитриевич

**ПОРИСТЫЕ И ГИДРОГЕЛЕВЫЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ
ПОЛИЛАКТИДА И ЕГО БЛОК-СОПОЛИМЕРОВ С ЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ:
СТРУКТУРА И СВОЙСТВА**

02.00.06 – Высокомолекулярные соединения

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт».

Научный руководитель: **Григорьев Тимофей Евгеньевич**
к.ф.-м.н., заместитель руководителя по научной работе Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий НИЦ «Курчатовский институт».

Официальные оппоненты: **Попов Анатолий Анатольевич**
д.х.н., профессор, заместитель директора Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН;

Филиппова Ольга Евгеньевна
д.ф.-м.н., профессор кафедры физики полимеров и кристаллов физического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН.

Защита диссертации состоится «03» октября 2019 г. в 16:30 часов на заседании диссертационного совета Д 212.131.07 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА – Российский технологический университет» по адресу: 119571, г. Москва, проспект Вернадского, д. 86, ауд Т-410.

С авторефератом диссертации можно ознакомиться на интернет-сайте ВАК РФ <https://vak.minobrnauki.gov.ru> и на интернет-сайте ФГБОУ ВО «МИРЭА – РТУ» <https://www.mirea.ru>.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке ФГБОУ ВО «МИРЭА – РТУ» по адресу: 119454, г. Москва, проспект Вернадского, д. 78, и на интернет-сайте <https://www.mirea.ru>.

Автореферат диссертации разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета Д 212.131.07, д.х.н., профессор

 Грицкова И.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

В последнее время активно развиваются исследования в области биоразлагаемых полимерных материалов, которые способны выполнять свою функцию в течение определенного времени, а затем под действием ферментативной и/или гидролитической деструкции разлагаться на нетоксичные низкомолекулярные продукты. Такие полимеры востребованы как в качестве упаковочных материалов, так и при создании медицинских продуктов широкого профиля: шовных и перевязочных, изделий для остеосинтеза и систем доставки лекарств пролонгированного действия, что позволяет значительно повысить эффективность лечения и качество жизни пациентов. Особенно эти полимеры востребованы в новой области, а именно в регенеративной медицине. Создание на их основе тканеинженерных конструкций позволит перейти к восстановлению органа или ткани пациента, не прибегая при этом к операциям по пересадке донорских органов. Такие системы включают в себя полимерный каркас (матрикс) различной морфологии, а также клетки и/или биологически активные молекулы, в том числе факторы роста.

Одним из наиболее активно применяемых биоразлагаемых полимеров является полилактид (ПЛА). Наличие сложноэфирной группы в полимерной молекуле позволяет данному соединению гидролитически разлагаться до молочной кислоты, которая способна выводиться из организма естественным путем. В настоящее время уже известны медицинские изделия на основе полилактида: шовные нити, крепежные изделия для ортопедии и хирургии.

Разработка новых материалов с высокоразвитой поверхностью на основе полилактида, в том числе пористых материалов, позволит использовать их в качестве каркасов для тканевой инженерии, а также для создания многофункциональных медицинских изделий. В ряде случаев ограничением для использования полилактида в биомедицинских применениях является его гидрофобность. Сополимеризация с гидрофильными полимерными соединениями, например полиэтиленгликолем (ПЭГ), позволит регулировать смачиваемость изделий и расширить круг возможных применений материалов на основе полилактида. Кроме того, известно, что блок-сополимеры лактида с этиленгликолем способны в водной среде структурироваться с образованием гидрогеля. Детальное понимание механизмов формирования гидрогелей в

зависимости от состава сополимера и методик их получения позволит управляемо варьировать механические характеристики, сроки резорбции, кинетику высвобождения лекарственных препаратов.

Особый интерес вызывает создание термоотверждаемых гидрогелей с температурой золь-гель перехода около 37 °С, которые, вследствие возможности адаптации формы изделия в процессе операции, позволяют разработать менее травматичные методики лечения. Предложенные на данный момент системы зачастую имеют низкие прочностные характеристики, что в значительной мере ограничивает их использование. Получение композитов с применением пористых материалов на основе полилактида и его сополимеров позволит существенным образом повысить реологические и физико-механические характеристики таких систем при сохранении всех достоинств гидрогелей.

Выявление взаимосвязи между способом получения, молекулярным составом, структурой и морфологией пористых и гидрогелевых материалов, а также их физико-механическими характеристиками позволит регулировать их свойства в соответствии с областью их применения и является **актуальной** научной задачей.

Цель работы

Цель работы: установление взаимосвязи между составом, надмолекулярной структурой и физико-механическими характеристиками высокопористых и гидрогелевых материалов на основе полилактида и его тройных блок-сополимеров с этиленгликолем.

Научная новизна

1. Предложены новые способы получения гидрогелей на основе тройных блок-сополимеров ПЛА–ПЭГ–ПЛА, которые впервые позволили сформировать гели с модулями упругости в широком диапазоне величин (от 30 кПа до 4,5 МПа).

2. Установлено влияние условий фазового разделения при гелеобразовании на морфологию и физико-механические характеристики получаемых гелей: при «быстрой» смене качества растворителя формируются высокоэластичные полимерные сетки с преимущественно аморфными узлами, при «медленной» – более высококомодульные сетки с кристаллическими узлами.

3. Методом рентгеновского рассеяния впервые изучена структурная реорганизация гидрогелей на основе тройных блок-сополимеров ПЛА–ПЭГ–ПЛА

при отжиге. Установлено, что при увеличении температуры узлы физической сетки гидрогеля кристаллизуются, приводя к росту модуля упругости.

4. Установлена взаимосвязь между морфологией, составом, молекулярными характеристиками и биосовместимостью полученных пористых материалов на основе полилактида и его тройных блок-сополимеров с этиленгликолем.

5. Разработаны новые методики получения пористых микрочастиц на основе полилактида и его сополимеров с этиленгликолем, а также импрегнации в них белковых молекул, что позволило получить биоматериалы с замедленным выделением активного вещества.

6. Продемонстрирована эффективность использования пористых микрочастиц в качестве наполнителя для *in situ* формируемых гидрогелей. Впервые получены костно-пластические материалы, сочетающие высокие прочностные характеристики, пористость и наличие активных биологических молекул.

Практическая значимость работы

Разработана методика получения пористых имплантатов объемом до 1000 см³ для торакальной хирургии. Подана заявка на регистрацию результата интеллектуальной деятельности.

Разработан способ получения пористых микрочастиц на основе полилактида и его сополимеров с этиленгликолем с импрегнированным в них костным морфогенетическим белком, а также термоотверждаемый композиционный материал на их основе. Композиционный гидрогель рекомендован в качестве альтернативного костно-пластического материала для стоматологии и челюстно-лицевой хирургии.

Предложены способы получения гидрогелей на основе тройных блок-сополимеров лактида и этиленгликоля с регулируемыми модулями упругости (от 30 кПа до 4,5 МПа) и различной морфологией. Гидрогели рекомендованы для применения их в медицинских учреждениях широкого профиля.

Достоверность результатов

Достоверность полученных результатов обеспечивается как использованием комплекса современных физических и физико-химических методов исследования, так и применением современных методик анализа и обработки результатов измерений.

Положения, выносимые на защиту

1. Новые методики получения гидрогелей и пористых материалов на основе полилактида и синтезированных тройных блок-сополимеров лактида с этиленгликолем с регулируемыми физико-механическими характеристиками.
2. Влияние условий гелеобразования на надмолекулярную структуру гидрогелей на основе тройных блок-сополимеров лактида и этиленгликоля и их физико-механические характеристики.
3. Биосовместимость полученных гидрогелей и губчатых материалов на основе полилактида и его сополимеров в условиях *in vitro* и *in vivo*.
4. Способ получения пористых микрочастиц с импрегнированным в них костным морфогенетическим белком.
5. Эффективность использования пористых микрочастиц на основе полилактида в качестве композиционного наполнителя термоотверждаемых гидрогелей для челюстно-лицевой хирургии.

Личный вклад автора

Автор самостоятельно провел сбор и анализ отечественной и зарубежной литературы по изучаемой теме, синтезировал полимерные соединения и получил на их основе материалы различного строения. Автором были исследованы молекулярные характеристики синтезированных соединений, а также структура и физико-механические свойства материалов. Соискатель принял непосредственное участие в анализе, обработке, обсуждении и интерпретации полученных результатов, подготовке статей к публикации.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на следующих конференциях:

VI Бакеевская Всероссийская с международным участием школа-конференция для молодых ученых «Макромолекулярные нанообъекты и полимерные нанокомпозиты», (г. Москва, 2016 г.); Первый Российский кристаллографический конгресс (г. Москва, 2016 г.); VII Всероссийская Каргинская конференция «Полимеры-2017» (г. Москва, 2017 г.); Международный симпозиум «Современная химическая физика» (г. Туапсе, 2017 г.); Национальная молодежная научная школа «Синхротронные и нейтронные исследования» (г. Москва, 2017 г.); Международная школа для молодых ученых RACIRI-2017 (г. Роннебю, 2017 г.); III национальный конгресс по регенеративной медицине

(г. Москва, 2017 г.); 52-ая Школа ПИЯФ по физике конденсированного состояния (г. Санкт-Петербург, 2018 г.); VII Бакеевская Всероссийская с международным участием конференция «Макромолекулярные нанообъекты и полимерные нанокompозиты» (г. Москва, 2018 г.).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 6 статей в рецензируемых журналах из перечня ВАК, а также 15 тезисов докладов.

Структура и объем работы

Диссертационная работа изложена на 134 страницах и содержит 70 рисунков, 13 таблиц, 180 источников литературы. Структура изложения включает введение, литературный обзор (глава 1), экспериментальную часть (глава 2), результаты и их обсуждение (глава 3), выводы и список литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **ВВЕДЕНИИ** отражена актуальность темы, научная новизна и практическая значимость, сформулирована цель работы, приведены положения, выносимые на публичное представление, степень достоверности и апробация результатов.

В **ГЛАВЕ 1** рассмотрены способы получения и основные физико-химические свойства полилактида и его блок-сополимеров с этиленгликолем. Проанализированы работы по гидрогелям и губчатым материалам на основе рассмотренных полимеров. Показана перспективность применения данных материалов в биомедицине.

В **ГЛАВЕ 2** приведено описание и физико-химические характеристики используемых реактивов, методик синтеза полимеров и получения на их основе гидрогелей и губчатых материалов. Перечислены основные инструментальные методы и методики исследования, такие как: ^1H -ядерный магнитный резонанс, гель-проникающая хроматография, термогравиметрический анализ, дифференциально-сканирующая калориметрия, рентгеноструктурный анализ, динамический механический анализ, механический анализ, электронная и оптическая микроскопия, ротационная вискозиметрия, а также методики исследования биосовместимости материалов.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Синтез полимерных материалов

Гомополилактиды

Полилактиды с различной молекулярной массой синтезировали из L- и D,L-лактида полимеризацией с раскрытием цикла в присутствии октаноата олова (II). Максимальная конверсия мономера (~ 95 %) достигалась в течение 4 часов, при температуре реакции 180 °С и концентрации катализатора 500 ppm. Основные характеристики полимеров, полученные методом ГПХ, приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Молекулярно-массовые характеристики полимеров

Стереоизомер	M_w , кДа	M_n , кДа	PDI
PLLA	100	60	1,7
	204	90	2,3
	432	224	1,9
PDLLA	40	26	1,5
	118	64	1,8
	249	96	2,6

Тройные блок-сополимеры лактида и этиленгликоля

Характеристики синтезированных блок-сополимеров представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Молекулярно-массовые характеристики тройных блок-сополимеров

Шифр	Состав блок-сополимера	DP_{PEG}^a	DP_{PLA}^b	M_n , кДа ^в	PDI ^г	Отношение LA/EG ^д
L₃₉P₁₃₆L₃₉	PLLA ₃₉ -PEG ₁₃₆ -PLLA ₃₉	136	78	11,6	1,2	0,57
L₆₆P₁₃₆L₆₆	PLLA ₆₆ -PEG ₁₃₆ -PLLA ₆₆	136	132	15,5	1,3	0,97
L₉₅P₁₃₆L₉₅	PLLA ₉₅ -PEG ₁₃₆ -PLLA ₉₅	136	190	19,7	1,3	1,34
L₁₆₉P₁₃₆L₁₆₉	PLLA ₁₆₉ -PEG ₁₃₆ -PLLA ₁₆₉	136	338	30,3	1,2	2,44
L₃₆₁P₁₃₆L₃₆₁	PLLA ₃₆₁ -PEG ₁₃₆ -PLLA ₃₆₁	136	722	58,0	1,3	4,49
L₇₄P₂₇₂L₇₄	PLLA ₇₄ -PEG ₂₇₂ -PLLA ₇₄	272	148	22,6	1,3	0,54
L₁₅₁P₂₇₂L₁₅₁	PLLA ₁₅₁ -PEG ₂₇₂ -PLLA ₁₅₁	272	302	33,7	1,7	1,11
L₂₁₀P₂₇₂L₂₁₀	PLLA ₂₁₀ -PEG ₂₇₂ -PLLA ₂₁₀	272	420	42,2	2,5	1,54

а) Степень полимеризации полиэтиленгликоля, согласно паспорту реактивов; б) степень полимеризации полилактида, определенная по ¹H-ЯМР; в) среднечисловая молекулярная масса, г) индекс полидисперсности, определен при помощи ГПХ; д) отношение количества лактидных звеньев к этиленгликолевым

Тройные блок-сополимеры с различными длинами блоков синтезировали в расплаве полимеризацией с раскрытием цикла в присутствии октаноата олова (II) при температуре 150 °С и концентрации катализатора 1400 ppm. Коммерческие полиэтиленгликоли выступали в качестве макроинициатора реакции. Все сополимеры имели мономодальные пики на хроматограммах, полученных методом гель-проникающей хроматографии.

3.2 Гидрогели на основе тройных блок-сополимеров лактида и этиленгликоля

В данной работе было предложено три новых способа получения гидрогелей на основе тройных блок-сополимеров лактида и этиленгликоля: диализ с «быстрым» ухудшением качества растворителя («быстрый» диализ), диализ с «медленным» ухудшением качества растворителя («медленный» диализ) и метод температурно-индуцированного микрофазного расслоения (ТИМР) с последующим вымыванием органической фазы. Отличительной особенностью получения гидрогелей данными методами является образование истинного раствора в «хорошем» растворителе (1,4-диоксане) перед гелеобразованием, при этом общая молекулярная масса и соотношение длин блоков сополимера не влияют на образование раствора.

Методом «быстрого» диализа получают эластичные гидрогели с относительно небольшими модулями упругости. Микроструктура таких гидрогелей, наблюдаемая в оптический микроскоп, однородная без каких-либо заметных дефектов (Рисунок 1 а). В случае получения гидрогеля методами «медленного» диализа и ТИМР заметно образование зернистой структуры и каналов с водой микронного размера. Светопропускание таких материалов заметно ниже из-за присутствия плотной полимерной фазы (Рисунок 1 б, в).

В режиме темнопольного изображения наблюдается двулучепреломление

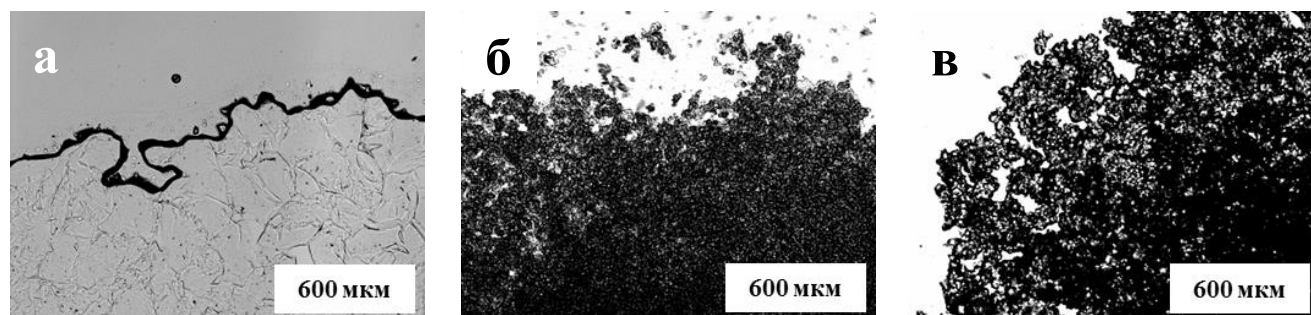


Рисунок 1 – Светлопольные оптические микрофотографии гидрогелей на основе $L_{95}P_{136}L_{95}$, полученных методами «быстрого» диализа (а), «медленного» диализа (б) и температурно-индуцированного микрофазного расслоения (в)

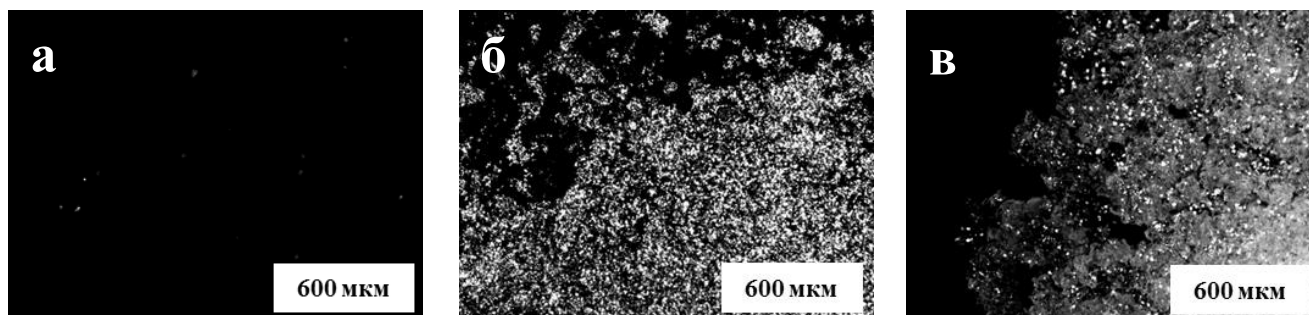


Рисунок 2 – Темнопольные оптические микрофотографии гидрогелей на основе $L_{95}P_{136}L_{95}$, полученных методами «быстрого» диализа (а), «медленного» диализа (б) и температурно-индуцированного микрофазного расслоения (в)

для гидрогелей, полученных методами «медленного» диализа и ТИМР, что позволяет сделать вывод о наличии кристаллической фазы (Рисунок 2 б, в).

Микроструктура всех гидрогелей была также исследована методом растровой электронной микроскопии (РЭМ) в режиме естественной среды при регулируемой относительной влажности. На рисунке 3 видно различие в микроструктуре гидрогелей $L_{95}P_{136}L_{95}$, полученных тремя способами. При влажности 99 % испарение воды с поверхности происходит медленно, и наблюдается нативная структура гидрогеля. Нужно отметить, что гидрогели, полученные первым способом, прочно удерживают воду и наблюдается ровная, гладкая поверхность. В двух других случаях («медленный диализ» и ТИМР) уже при влажности 99 %, вода довольно быстро уходит из пор, а поверхность материала представляет собой набухшие соединенные полимерные глобулы.

Способ получения гидрогелей существенно влияет как на их микроструктуру, так и на упорядочение макромолекул в узлах сетки. Для понимания процессов самосборки макромолекул на нанометровом уровне данные гидрогели исследовали методом рассеяния рентгеновских лучей с использованием синхротронного излучения. В случае гидрогелей, полученных «быстрым» диализом, в области малых углов наблюдаются Брэгговские пики высокой

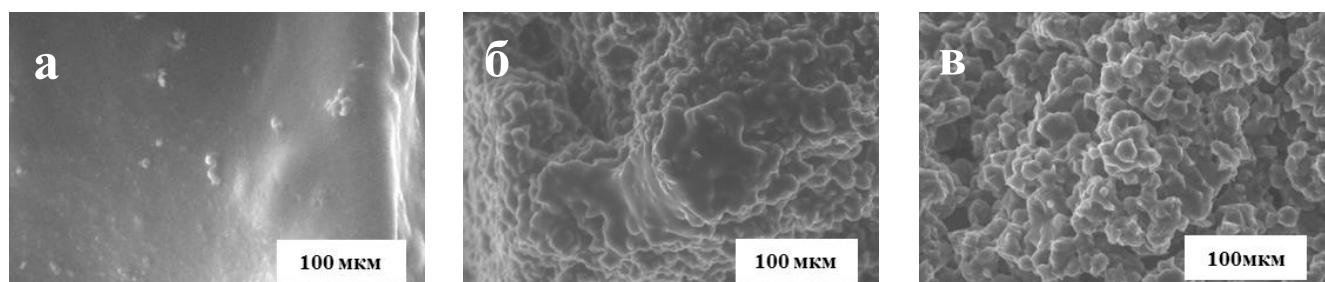


Рисунок 3 – Микрофотографии РЭМ в условиях естественной среды для гидрогелей на основе $L_{95}P_{136}L_{95}$, полученных методами «быстрого» диализа (а), «медленного» диализа (б) и температурно-индуцированного микрофазного расслоения (в)

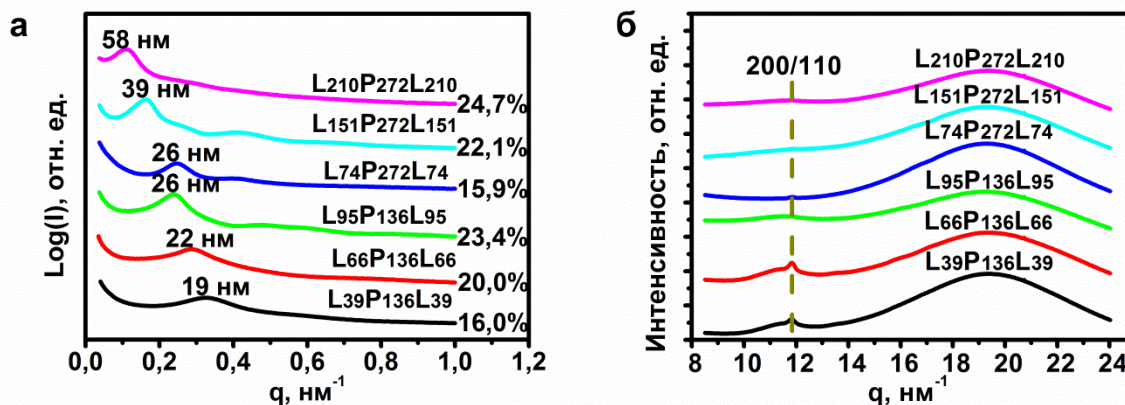


Рисунок 4 – Кривые рассеяния рентгеновского излучения в малых (а) и больших (б) углах для гидрогелей, полученных «быстрым» диализом; на графике (а) указаны концентрации блок-сополимеров в гидрогеле

интенсивности, положения максимумов которых соответствуют расстоянию между узлами полимерной сетки гидрогеля (Рисунок 4 а). По положению максимумов рефлексов определяли межплоскостное расстояние по формуле Вульфа-Брэгга. Полученные значения, а также концентрации сополимеров в гидрогеле для каждого образца приведены рядом с соответствующей кривой. Межплоскостные расстояния связаны с расстоянием между узлами полимерной сетки и зависят от типа упаковки. Однако в данной системе определить тип упаковки не представляется возможным, так как дальних Брэгговских рефлексов не наблюдается. Тем не менее можно отметить, что с увеличением длины гидрофобного блока межплоскостное расстояние увеличивается.

В области больших углов для всех гидрогелей наблюдается широкое гало рассеяния от воды - $15\text{--}24\text{ nm}^{-1}$ (Рисунок 4 б). На всех образцах при $10\text{--}13\text{ nm}^{-1}$ наблюдается гало от аморфного полилактида и рефлекс малой интенсивности, относящийся к кристаллическому поли-L-лактиду. Наличие данного гало и кристаллического рефлекса низкой интенсивности подтверждает образование дефектной кристаллической структуры, представляющей собой α -модификацию кристаллического полилактида.

Структура физической сетки гидрогеля может изменяться при нагревании. Для оценки таких изменений были проведены рентгеноструктурные исследования материалов при различных температурах. В качестве примера на рисунке 5 представлены рентгенограммы для гидрогелей на основе сополимеров с короткими ($DP_{\text{PEG}} = 136$) (а) и длинными ($DP_{\text{PEG}} = 272$) (б) гидрофильными блоками при одинаковом гидрофобно-гидрофильном балансе. Нагревание

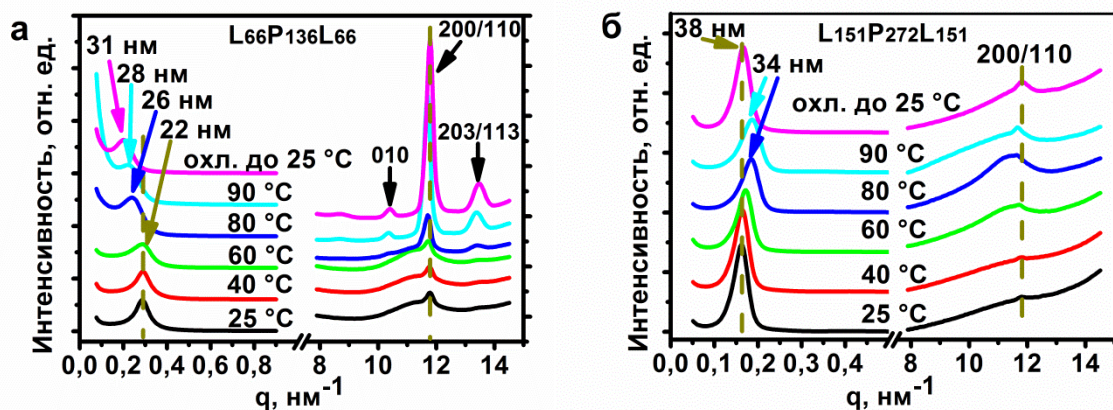


Рисунок 5 – Кривые рассеяния рентгеновского излучения при различных температурах для гидрогелей, полученных «быстрым» диализом из 25 масс.% растворов образцов приводит к уменьшению растворимости гидрофильного блока (полиэтиленгликоля) в воде, вследствие чего должны уменьшаться расстояния между сшивками. В то же время за счет появления сегментальной подвижности макромолекул в полилактидных агрегатах начинается процесс кристаллизации, который подтверждается увеличением интенсивности рефлексов в больших углах, соответствующих кристаллическому поли-L-лактиду. Для гидрогелей на основе сополимеров с коротким блоком полиэтиленгликоля помимо кристаллизации также протекает процесс агрегации узлов и образование протяженных кристаллических сшивок физической сетки (Рисунок 6 а).

В случае получения гидрогелей методами плавного ухудшения качества растворителя («медленный» диализ и ТИМР) наблюдается упорядочение и кристаллизация полимерных цепей. В данном случае, за счет медленной замены растворителя микрофазное разделение уже произошло, а цепи полилактида еще подвижны, вследствие чего образуются более совершенные кристаллы

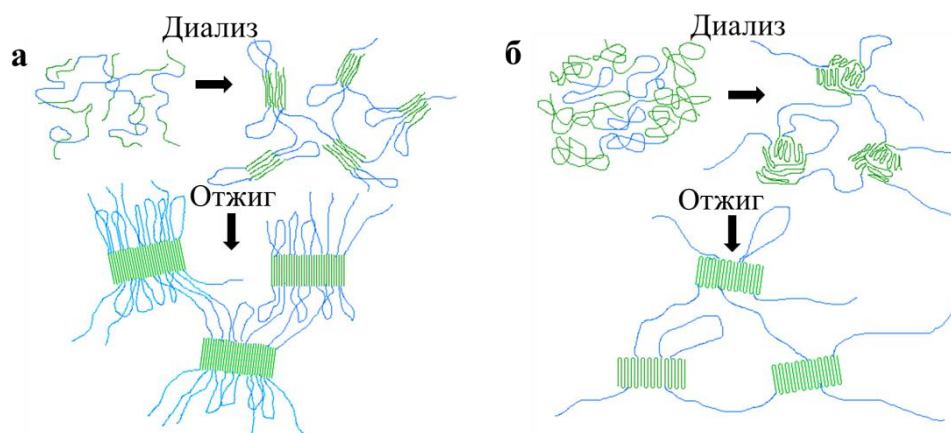


Рисунок 6 – Схематическое представление образования сетки гидрогеля и ее структура после отжига для гидрогелей, полученных «быстрым» диализом, на основе сополимеров с коротким (а) и длинным (б) гидрофильными блоками полиэтиленгликоля

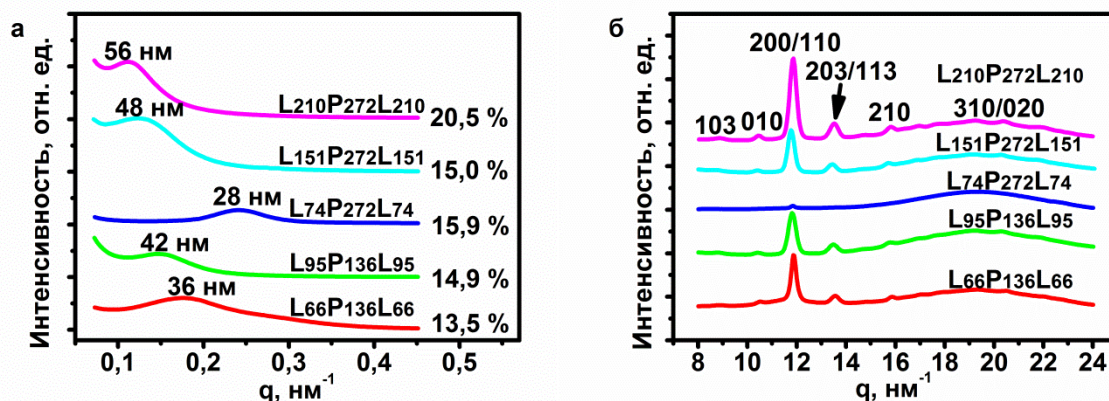


Рисунок 7 – Кривые рассеяния рентгеновского излучения в малых (а) и больших (б) углах для гидрогелей, полученных «медленным» диализом

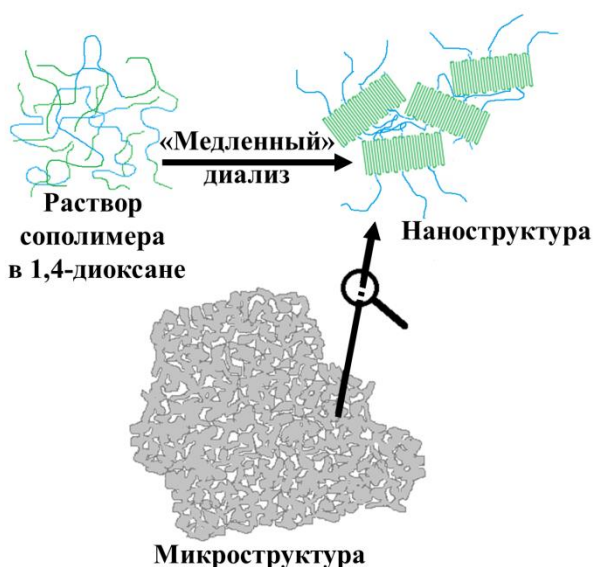


Рисунок 8 – Схематическое представление образования сетки гидрогелей, полученных «медленным» диализом и ТИМР

На основе результатов рентгеноструктурного анализа, оптической и электронной микроскопии была предложена схема структурной организации гидрогелей, полученных в результате «медленной» замены растворителя (Рисунок 8). За счет кристаллизации полилактидных блоков на стадии получения гидрогелей образуется сетка из перекрывающихся кристаллических доменов, соединенных проходными цепями полиэтиленгликоля. Такая самоорганизация существенно влияет на их механические характеристики.

Механические характеристики гидрогелей были измерены методом динамического механического анализа и испытаний материалов на сжатие. Типичные кривые сжатия представлены на рисунке 9.

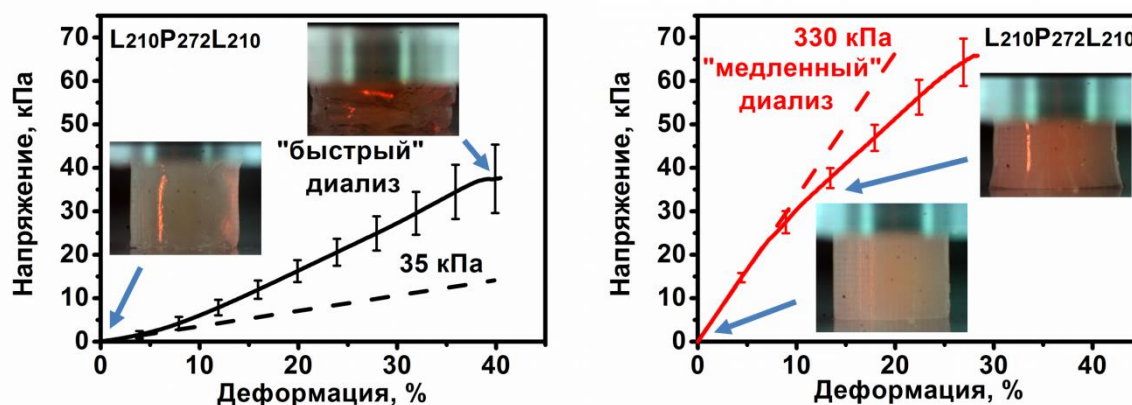


Рисунок 9 – Зависимости напряжения от деформации для гидрогелей $L_{210}P_{272}L_{210}$, полученных «быстрым» и «медленным» диализом

В случае гидрогелей, полученных «быстрой» сменой растворителя, образцы показывают высокоэластичное поведение с большими деформациями разрушения. Модуль Юнга таких систем в рамках доверительного интервала не зависит от длины полимерных блоков и принимает максимальные значения по сравнению с описанными в литературе гелями. В случае «медленного» диализа и ТИМР наблюдается упруго-вязкое поведение с меньшими деформациями разрушения. Значения модуля Юнга увеличиваются с ростом длины гидрофобных блоков в сополимере и достигают 4,5 МПа, что связано с формированием непрерывной сетки кристаллической фазы полилактида (Таблица 3).

Таблица 3 – Модули Юнга для гидрогелей, полученных различными способами

Название образца	Модуль Юнга, кПа		
	«быстрый» диализ	«медленный» диализ	ТИМР
$L_{39}P_{136}L_{39}$	32 ± 2	—	90 ± 9
$L_{66}P_{136}L_{66}$	35 ± 10	140 ± 20	160 ± 5
$L_{95}P_{136}L_{95}$	25 ± 10	530 ± 65	400 ± 15
$L_{169}P_{136}L_{169}$	—	—	560 ± 40
$L_{361}P_{136}L_{361}$	—	—	4460 ± 500
$L_{74}P_{272}L_{74}$	20 ± 7	46 ± 5	—
$L_{151}P_{272}L_{151}$	52 ± 6	280 ± 30	—
$L_{210}P_{272}L_{210}$	35 ± 20	330 ± 50	—

«—» гидрогели не получали

Таким образом, полученные зависимости структуры и методов получения гидрогелей позволят направленно изменять физико-механические характеристики гидрогелей в широком диапазоне значений, что открывает возможность их

применения в различных областях биомедицины. Материалы для тканевой инженерии должны обеспечивать миграцию и прикрепление клеток во всем объеме, для этого важно получать пористые материалы и контролировать их структуру. Поэтому были разработаны губчатые материалы на основе синтезированных полимеров, а также из коммерческого поли-L-лактида.

3.3 Губчатые материалы на основе гомополилактидов и блок-сополимеров лактида с этиленгликолем

Губчатые материалы были получены методом температурно-индуцированного микрофазного разделения с переходом жидкость – твердое тело и последующей лиофилизацией растворов полилактида и блок-сополимеров лактида с этиленгликолем.

Структура пористых материалов представляет собой сотоподобную сеть взаимопроникающих пор с полимерными стенками. Морфология пор, полученных по данной методике губчатых материалов, контролируется скоростью кристаллизации растворителя, поэтому молекулярная масса полимера в диапазоне 40–430 кДа и состав не сильно влияют на пористую структуру материала. В качестве примера на рисунке 10 представлены РЭМ изображения поверхности губчатых материалов на основе поли-L-лактида. Увеличение концентрации раствора полимера от 2 до 4 масс.% приводит к небольшому увеличению толщины стенок. Поры в губчатых материалах слегка вытянуты из-за градиента охлаждения при заморозке, поэтому их размер оценивали в двух проекциях. Средняя длина пор составила 150 ± 50 мкм, а средняя ширина 90 ± 30 мкм.

Все губчатые материалы были испытаны на сжатие. На рисунке 11 представлены типичные кривые сжатия губчатых материалов на основе полилактида 4032D. На всех кривых при небольших деформациях (до 1,5 %) наблюдается линейный участок упругой деформации, по углу наклона которого

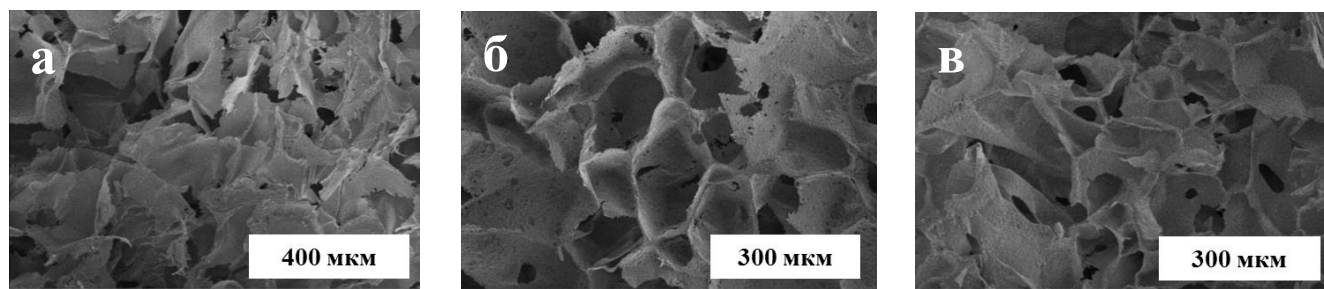


Рисунок 10 – РЭМ изображения поверхности губчатых материалов на основе поли-L-лактида (4032D), полученных из растворов с массовой концентрацией 2 (а), 3 (б), 4 (в) %

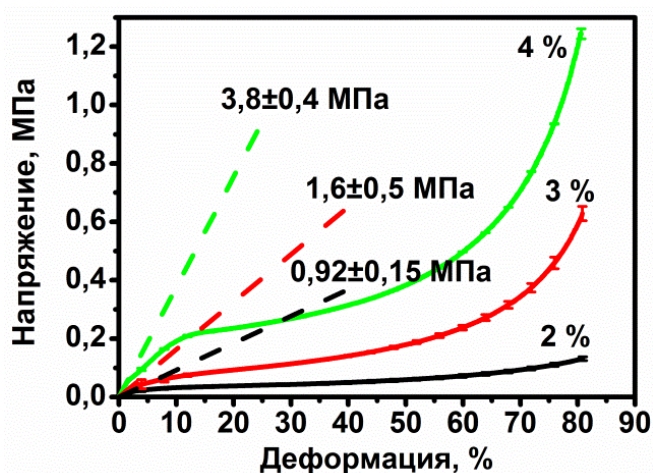


Рисунок 11 – Кривые сжатия губчатых материалов, полученных из растворов поли-L-лактида (4032D) с концентрацией 2, 3, 4 масс. %

определяли модуль Юнга.

Было установлено, что губчатые материалы из поли-L-лактида имеют модуль упругости выше, чем из поли-D,L-лактида. Такое поведение связано с образованием в них кристаллической фазы полимера, в отличие от полностью аморфного поли-D,L-лактида. Как видно из таблицы 4, молекулярный вес в исследуемом диапазоне величин не оказывает существенного влияния на модуль упругости материалов.

Губчатые материалы, полученные методом лиофилизации из 20 масс.% раствора сополимеров в 1,4-диоксане, продемонстрировали высокие модули упругости, но низкие деформации разрушения, что ограничивает их практическое применение.

Таблица 4 – Модули упругости губчатых материалов

Изомер	M _w , кДа	Модуль упругости, МПа			
		Пористость, %			
		97	95	93	92
PLLA	100	0,57±0,03	5,10±0,22	10,19±0,36	21,45±0,33
	204	1,21±0,01	6,02±0,22	10,39±0,20	18,41±0,85
	432	2,24±0,11	6,23±0,20	9,68±0,35	23,14±0,44
PDLLA	40	1,05±0,05	3,27±0,11	5,02±0,11	7,89±0,18
	118	1,01±0,06	2,74±0,11	3,77±0,14	6,98±0,20
	249	1,96±0,07	2,93±0,13	3,89±0,15	7,63±0,21

Полученные в результате работы зависимости физико-механических характеристик губчатых материалов от состава и структуры позволят создавать биоразлагаемые матрицы для тканевой инженерии с регулируемыми свойствами. Однако форма конечных изделий, получаемых данным способом, задается на стадии их формирования и не может быть изменена во время операции. В ряде медицинских применений, в частности челюстно-лицевой хирургии, целесообразно использование пористых материалов (частиц) в качестве композитных наполнителей для термоотверждаемых гидрогелей.

3.4 Композиционные гидрогели на основе хитозана

В качестве композитной матрицы в работе был выбран термоотверждаемый гидрогель на основе раствора хитозана (1,5 масс.%) в 0,1 М уксусной кислоте и β -глицерофосфата (16,7 масс.%).

Для создания наполнителя была разработана методика получения пористых микрочастиц на основе полилактида и его блок-сополимеров с этиленгликолем. Пористые микрочастицы были исследованы методом растровой электронной микроскопии (рисунок 12). Диаметр частиц составил 50–300 мкм, а диаметр пор

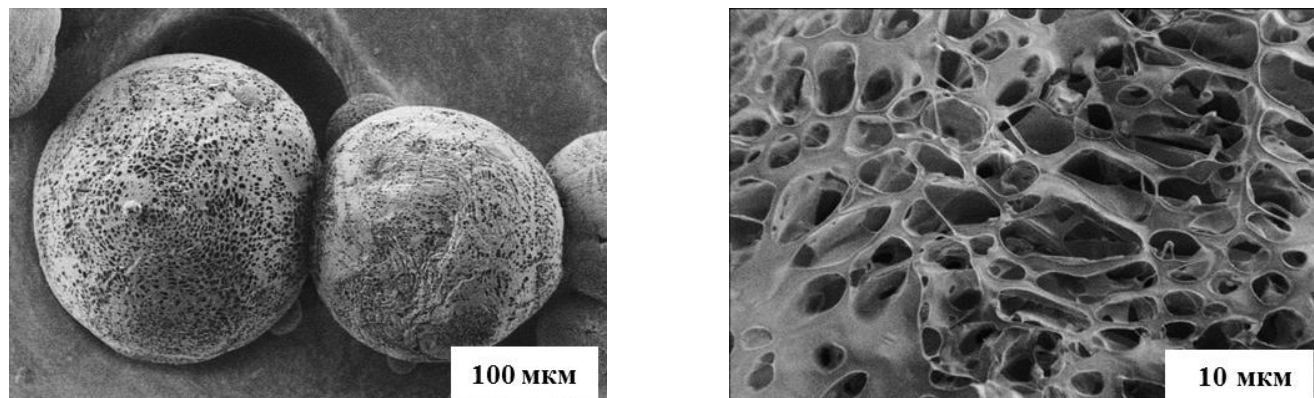


Рисунок 12 – РЭМ изображения поверхности пористых микрочастиц, полученных из 2 масс.% раствора поли-L-лактида 4032D

2–10 мкм. Применение таких частиц в качестве композиционного наполнителя позволило существенно увеличить модуль упругости системы при сохранении золь-гель перехода. Методами ротационной вискозиметрии и динамического механического анализа были определены температурные зависимости модулей накопления и потерь при различном содержании пористых частиц в гидрогеле. На рисунке 13 представлены зависимости модуля накопления от температуры для

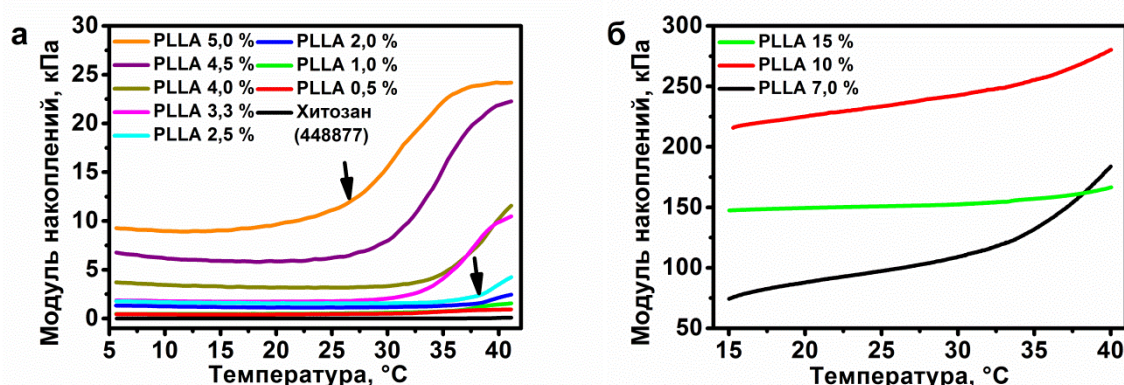


Рисунок 13 – Зависимости модулей накопления от температуры для гидрогелей на основе хитозана с различным содержанием наполнителя (массовые проценты указаны в легенде), полученные методом ротационной вискозиметрии (а) и динамическим механическим анализом (б)

гидрогелей с различным содержанием частиц. Из рисунка видно, что даже небольшое количество наполнителя приводит к появлению упругих свойств в системе. Можно также отметить возрастание модуля накопления с увеличением содержания пористых микрочастиц в системе. При этом видно, что температура начала увеличения модуля за счет образования сшивок гидрогеля также смещается в сторону меньших температур. Одним из возможных объяснений данного явления является то, что микрочастицы могут выступать в виде новых центров гидрофобных взаимодействий, и тем самым упрощать процесс гелеобразования. Кроме того показано, что оптимальная массовая концентрация наполнителя, при котором достигаются высокие значения модуля, составляет ~ 10 масс.%. Дальнейшее увеличение концентрации наполнителя приводит к потере связности системы и модуль упругости снижается.

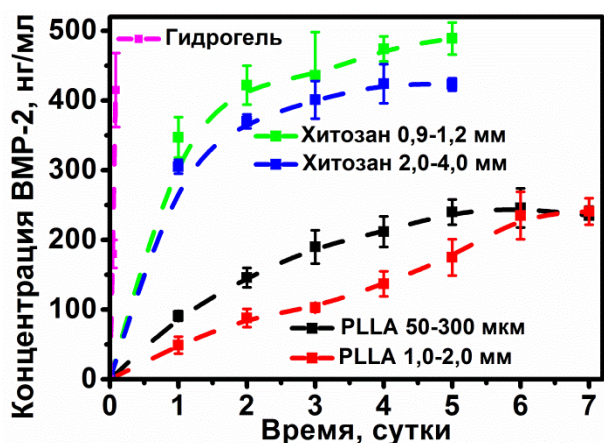


Рисунок 14 — Зависимости высвобождения ВМР-2 от времени для хитозанового гидрогеля и частиц различного состава

«крупным» ($d = 1-2$ мм) диаметром, а так же получали частицы хитозана с включенным в них ВМР-2. Кинетика высвобождения белка для полученных частиц была исследована с помощью иммуноферментного анализа¹. На кривых высвобождения белка видно, что уже через 2 часа белок, растворенный в гидрогеле, высвобождается на 83 % (Рисунок 14). Это подтверждает необходимость его загрузки в частицы для увеличения сроков высвобождения. В случае хитозановых частиц выход ВМР-2 существенно замедляется. Тем не менее, мы наблюдаем резкое высвобождение к началу 2 суток (~ 60–70 %) с

Так как полученный композитный материал предполагается использовать в челюстно-лицевой хирургии, система должна не только восполнять дефекты, но и стимулировать образование костной ткани. В работе было предложено импрегнировать костный морфогенетический белок (ВМР-2) в пористые частицы полилактида и хитозана. Для импрегнации ВМР-2 использовали готовые полилактидные частицы с «малым» ($d = 50-300$ мкм) и

¹ Исследования выполнены совместно с сотрудниками ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Министерства здравоохранения РФ

последующим плавным выделением вплоть до 5 суток эксперимента. Наиболее плавное высвобождение отмечается для наполненных полилактидных частиц. Максимальная концентрация белка во внешнем растворе достигается к 6 суткам. Таким образом, была продемонстрирована эффективность импрегнирования костного морфогенетического белка в пористые частицы различного состава.

3.5 Биосовместимость и возможные применения полученных материалов

In vitro биосовместимость гидрогелей и губчатых материалов на основе тройных блок-сополимеров лактида и этиленгликоля была исследована методом статической рецеллюляризации в присутствии крысиных мезенхимных стволовых клеток с последующим выполнением ХТТ и Alamar Blue тестов².

В случае гидрогелей и губчатых материалов на основе тройных блок-сополимеров жизнеспособность клеток увеличивается с увеличением пористости материалов. Наиболее низкая жизнеспособность наблюдается для гидрогелей, полученных «быстрым» диализом. Как отмечалось ранее, такие гидрогели обладают гладкой поверхностью и низкими модулями упругости, что не позволяет клеткам закрепляться на поверхности материалов и, как следствие, пролиферировать. Тем не менее, полученные значения жизнеспособности клеток оказались сопоставимы с образцами сравнения (гидроксиапатит и деминерализованная кость).

Все губчатые материалы на основе полилактидов показали жизнеспособность клеток, сопоставимую с контрольными образцами на первые и седьмые сутки. Кроме этого, для этих материалов были проведены *in vivo* исследования биосовместимости. Результаты гистологических исследований показали, что при подкожном введении материала половозрелым аутбредным крысам на 14 и 28 сутки продолжается воспалительная реакция³. Активно продолжающаяся воспалительная реакция в случае губчатого материала является с одной стороны следствием контактного травмирования прилегающих тканей из-за высокой жесткости материала в сочетании с сильно разветвленной поверхностью, с другой стороны связана с интенсивной резорбцией материала и образованием молочной кислоты, которая может провоцировать появление макрофагов и гигантских клеток инородного тела. Такое поведение материала в

² Исследования выполнены совместно с сотрудниками ФГБОУ «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ

³ Исследования выполнены совместно с сотрудниками ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения РФ

in vivo исследованиях на фоне полностью отсутствующего эффекта цитотоксичности в *in vitro* испытаниях, показывает важность подбора физико-механических характеристик матриц в конкретных применениях.

Композиционные термоотверждаемые гидрогели с пористыми частицами на основе полилактида были также исследованы на биосовместимость⁴. *In vitro* исследованиями подтверждена способность данных композиционных гидрогелей с включенными в них частицами хитозана с BMP-2 стимулировать рост клеток. *In vivo* исследования данных материалов продемонстрировали способность проектируемого материала с BMP-2 стимулировать неоостеогенез при подкожном введении крысам. На полученных гистологических срезах для образца без BMP-2 очаги остеогенеза не наблюдаются (Рисунок 15 а). В области имплантации на срезах определяются просветления, возникшие из-за растворения полилактидных пористых частиц при гистологической проводке. Области пор полилактидных носителей заполнены грануляционной тканью с гигантскими клетками.

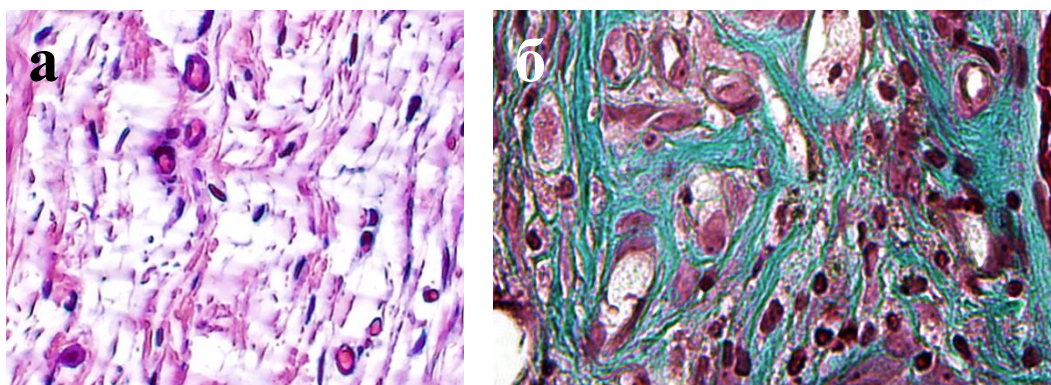


Рисунок 15 – Гистология извлеченных тканей, окружающих имплантируемый материал, где а) Материал без BMP-2 (Окраска гематоксилином и эозином; объектив x10), б) Материал с BMP-2 (Окраска по Массону-Голднеру; объектив x20)

На гистологических срезах в области имплантации образцов с BMP-2 были выявлены очаги выраженного остеогенеза к концу 60 суток эксперимента (Рисунок 15 б). При этом матрица исследуемого материала практически полностью замещалась новообразованной костной тканью.

⁴ Исследования выполнены совместно с сотрудниками ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»

ВЫВОДЫ

1. Разработаны новые способы получения гидрогелей на основе синтезированных тройных блок-сополимеров лактида и этиленгликоля с молекулярной массой от 11 до 42 кДа. Данные методики позволяют получать гидрогели с модулями упругости от 50 кПа до 4,5 МПа.

2. Методом рентгеновского рассеяния установлено, что увеличение длины, как гидрофильного (от 136 до 272 звеньев), так и гидрофобного (от 39 до 361 звеньев) блоков, приводит к увеличению расстояния между узлами физической сетки от 19 до 58 нм, что определяет физико-механические свойства гидрогелей.

3. Показано, что при «быстром» изменении качества растворителя гидрогели содержат преимущественно неупорядоченные узлы полимерной сетки, способные к кристаллизации при повышении температуры, а при «медленном» – высококристаллические узлы, связанные в непрерывную сетку, структура которых не изменяется при нагреве.

4. Разработана новая методика получения пористых материалов на основе полилактида и его сополимеров с этиленгликолем с пористостью до 98% и диаметром пор до 150 мкм.

5. Показано, что состав и пористость материалов существенным образом влияет как на их механические характеристики (значения модуля упругости лежат в диапазоне 0,9–24 МПа), так и на биосовместимость. Сравнение результатов испытаний биосовместимости *in vitro* и *in vivo* показали важность соответствия физико-механических характеристик материалов и тканей организма в месте имплантации.

6. Разработана методика получения пористых частиц на основе полилактида и его сополимеров с этиленгликолем с импрегнированным в них костным морфогенетическим белком. Исследования кинетики высвобождения показали, что полилактидные частицы наилучшим образом удерживают белковые молекулы (полное высвобождение достигается к 6 суткам).

7. Использование пористых микрочастиц на основе полилактида в качестве наполнителя для термоотверждаемых гидрогелей на основе хитозана и β -глицерофосфата позволило на 2 порядка увеличить модуль упругости системы при 10 масс.% содержании наполнителя. Созданный костно-пластический материал на основе композиционного термоотверждаемого гидрогеля продемонстрировал способность к неоостеогенезу в *in vitro* и *in vivo* условиях.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. **Загоскин Ю.Д.**, Григорьев Т.Е., Крашенинников С.В., Куевда Е.В., Губарева Е.А., Бакиров А.В., Чвалун С.Н. Гидрогели и губчатые материалы на основе тройных блок-сополимеров лактида и этиленгликоля // Доклады академии наук. 2019. Т. 486, №4. С. 433–436.
2. Grigoriev T.E., Bukharova T.B., Vasilyev A.V., Leonov G.E., **Zagoskin Y.D.**, Kuznetsova V.S., Gomzyak V.I., Salikhova D.I., Galitsyna E.V., Makhnach O.V., Tokaev K.V., Chvalun S.N., Goldshtein D.V., Kulakov A.A., Paltsev M.A. Effect of molecular characteristics and morphology on mechanical performance and biocompatibility of PLA-based spongy scaffolds // BioNanoScience. 2018. V. 8, № 4. P. 977–983.
3. Севастьянов В.И., Григорьев А.М., Басок Ю.Б., Кирсанова Л.А., Василец В.Н., Малкова А.П., Духина Г.А., Григорьев Т.Е., **Загоскин Ю.Д.**, Токаев К.В., Токаев Т.К. Биосовместимые и матриксные свойства полилактидных губок // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2018. Т. 20, № 2. С. 82–90.
4. Васильев А.В., Бухарова Т.Б., Кузнецова В.С., **Загоскин Ю.Д.**, Минаева С.А., Григорьев Т.Е., Антонов Е.Н., Осидак Е.О., Галицына Е.В., Бабиченко И.И., Домогатский С.П., Попов В.К., Чвалун С.Н., Гольдштейн Д.В., Кулаков А.А. Сравнение кинетики высвобождения импрегнированного костного морфогенетического белка-2 из биополимерных матриц // Перспективные материалы. 2019, № 4. С. 13–27.
5. Grigoriev T.E., **Zagoskin Y.D.**, Belousov S.I., Vasilyev A.V., Bukharova T.B., Leonov G.E., Galitsyna E.V., Goldshtein D.V., Chvalun S.N., Kulakov A.A., Paltsev M.A. Influence of molecular characteristics of chitosan on properties of in situ formed scaffolds // BioNanoScience. 2017. V. 7, № 3. P. 492–495.
6. Кузнецова В.С., Васильев А.В., Григорьев Т.Е., **Загоскин Ю.Д.**, Чвалун С.Н., Бухарова Т.Б., Гольдштейн, Кулаков А.А. Перспективы использования гидрогелей в качестве основы для отверждаемых костно-пластических материалов // Стоматология. 2017. Т. 96, № 6. С. 68–74.

Опубликованные тезисы в рецензируемых журналах:

1. Григорьев Т.Е., Луканина К.И., Антипова К.Г., **Загоскин Ю.Д.**, Крашенинников С.В., Чвалун С.Н. Высокопористые материалы для тканевой инженерии // Гены и клетки. 2017. Т. 12, № 3. С. 75.

2. Васильев А.В., Кузнецова В.С., **Загоскин Ю.Д.**, Бухарова Т.Б., Григорьев Т.Е., Чвалун С.Н., Гольдштейн Д.В., Кулаков А.А. Сравнение кинетики высвобождения импрегнированного белка из полилактидных и хитозановых гранул в зависимости от их размера в составе термотропного отверждаемого хитозанового гидрогеля // Гены и клетки. 2017. Т. 12, № 3. С. 57.

3. Бухарова Т.Б., Леонов Г.Е., Васильев А.В., Кузнецова В.С., Галицына Е.В., **Загоскин Ю.Д.**, Григорьев Т.Е., Чвалун С.Н., Гольдштейн Д.В., Кулаков А.А. Сравнительная оценка биосовместимости полилактидных материалов в модели *in vitro* // Гены и клетки. 2017. Т. 12, № 3. С. 53.

4. Vasilyev A., Bukharova T., Kuznetsova V., **Zagoskin Y.**, Grigoriev T., Chvalun S., Kulakov A., Goldstein D. Release of impregnated protein from polylactide and chitosan granules, depending on their size, porosity, and the presence of a cross-linking agent // FEBS Open Bio. 2018. V. 8, № 1. P. 269.

Тезисы докладов:

1. **Загоскин Ю.Д.**, Григорьев Т.Е., Бакиров А.В., Богданова О.И., Чвалун С.Н. Гидрогели на основе тройных блок-сополимеров лактида и полиэтиленгликоля: структура и свойства // VII Бакеевская Всероссийская с международным участием конференция «Макромолекулярные нанообъекты и полимерные нанокомпозиты». Москва, 07–12 октября 2018. С. 103.

2. **Загоскин Ю.Д.**, Григорьев Т.Е., Кузнецов Н.М., Бухарова Т.Б., Васильев А.В., Чвалун С.Н. Влияние биоразлагаемого наполнителя на основе полилактида на реологическое поведение термотропных гидрогелей хитозана для челюстно-лицевой хирургии // VII Бакеевская Всероссийская с международным участием конференция «Макромолекулярные нанообъекты и полимерные нанокомпозиты». Москва, 07–12 октября 2018. С. 102.

3. Григорьев Т.Е., **Загоскин Ю.Д.**, Крашенинников С.В., Токаев К.В., Токаев Т.К., Севастьянов В.И., Чвалун С.Н. Физико-механические характеристики губчатых материалов на основе полилактонов // VII Бакеевская Всероссийская с международным участием конференция «Макромолекулярные нанообъекты и полимерные нанокомпозиты». Москва, 07–12 октября 2018. С. 151.

4. **Загоскин Ю.Д.**, Григорьев Т.Е., Бакиров А.В., Чвалун С.Н. Структурные исследования гидрогелей на основе блок-сополимеров молочной кислоты и этиленгликоля с использованием синхротронного излучения // 52-ая Школа по физике конденсированного состояния. Санкт-Петербург, 12–17 марта 2018. С. 50
5. **Zagoskin Y.D.** Structural studies of hydrogels based on block copolymers of polylactide and polyethylene glycol // RACIRI Summer School 2017. Ronneby, 19–26 August 2017. P. 86.
6. **Загоскин Ю.Д.**, Григорьев Т.Е., Крашенинников С.В., Бакиров А.В., Чвалун С.Н. Гидрогели на основе блок-сополимера молочной кислоты и этиленгликоля // Седьмая Всероссийская Каргинская «Полимеры – 2017». Москва, 13–17 июня 2017, С. 289.
7. **Загоскин Ю.Д.**, Григорьев Т.Е., Бакиров А.В., Богданова О.И., Чвалун С.Н. Гидрогели на основе биоразлагаемого сополимера молочной кислоты и этиленгликоля // XXIX Симпозиум «Современная химическая физика». Туапсе, 17–28 сентября 2017, С. 164.
8. **Загоскин Ю.Д.** Гидрогели на основе триблок-сополимеров лактида и полиэтиленгликоля // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2016». Москва, 11–15 апреля 2016.
9. **Загоскин Ю.Д.**, Григорьев Т.Е., Чвалун С.Н. Гидрогели на основе биоразлагаемого сополимера молочной кислоты и этиленгликоля // VI Бакеевская всероссийская с международным участием школа-конференция для молодых ученых «макромолекулярные нанообъекты и полимерные нанокомпозиты». Москва, 09–14 октября 2016. С. 96.
10. **Загоскин Ю.Д.**, Григорьев Т.Е., Бакиров А.В. Исследование гидрогелей на основе тройных блок-сополимеров молочной кислоты и этиленгликоля методом рассеяния рентгеновских лучей // Первый Российский кристаллографический конгресс. Москва, 21–26 ноября 2016. С. 235.
11. Григорьев Т.Е., Романова И.А., Крашенинников С.В., **Загоскин Ю.Д.**, Гомзяк В.И., Чвалун С.Н. Высокопористые материалы на основе полилактида // VI Бакеевская всероссийская с международным участием школа-конференция для молодых ученых «Макромолекулярные нанообъекты и полимерные нанокомпозиты». Москва, 09–14 октября 2016. С. 90.