

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого  
Институт биомедицинских систем и биотехнологий  
Высшая школа биомедицинских систем и технологий

Работа допущена к защите  
Директор ВШБСиТ ИБСиБ  
\_\_\_\_\_ О. Л. Власова  
«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г.

## **ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА**

\_\_\_\_\_ магистерская диссертация \_\_\_\_\_

вид ВКР (работа бакалавра, дипломный проект, дипломная работа, магистерская диссертация)

## **РАЗРАБОТКА НЕТКАНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ АРОМАТИЧЕСКИХ ПОЛИИМИДОВ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ**

по направлению подготовки (специальности) 16.04.01 Техническая физика \_\_\_\_\_  
код и наименование направления подготовки (специальности)

Направленность (профиль) 16.04.01\_10 Медицинская биотехнология \_\_\_\_\_  
код и наименование направленности (профиля) образовательной программы

Выполнил студент гр. 4741601/81001 \_\_\_\_\_ А. Е. Чирятьева

Руководитель  
Профессор ВШБСиТ ИБСиБ,  
д. ф.-м. н., профессор \_\_\_\_\_ В. Е. Юдин

Консультант по нормоконтролю \_\_\_\_\_ В. П. Октябрьский

Санкт-Петербург  
2020

## РЕФЕРАТ

На 63 с., 27 рисунков, 7 таблиц, 2 приложения

АРОМАТИЧЕСКИЙ ПОЛИИМИД; ВОДОРАСТВОРИМЫЕ СОЛИ ПОЛИАМИДОКИСЛОТ; ДИАМИНОДИФЕНИЛОВЫЙ ЭФИР; КАРБОНИЗАЦИЯ; КРИОКОНСЕРВАЦИЯ; ПИРОМЕЛЛИТОВЫЙ ДИАНГИДРИД; ТКАНЕВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ; ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫЙ СОСУДИСТЫЙ ИМПЛАНТ; ТРИЭТИЛАМИН; УГЛЕРОДНЫЕ НАНОВОЛОКНА; ЭЛЕКТРОФОРМОВАНИЕ.

Тема выпускной квалификационной работы: «Разработка нетканых материалов на основе ароматических полиимидов для тканевой инженерии».

Данная работа посвящена разработке и изучению свойств нетканых материалов, полученных методом электроформования на основе ароматических полиимидов, применительно к задачам тканевой инженерии, а именно хранению и криоконсервации клеток, получению электропроводящих матриц и использованию скаффолдов в качестве протезов кровеносных сосудов.

Изучены свойства водных растворов солей полиамидокислот на основе диангидрида бензол-1,2,4,5-тетракарбоновой кислоты и 4,4'-диаминодифенилового эфира. Разработаны режимы электроформования, имидизации и карбонизации материалов. Проведено исследование биосовместимости полиимидного нетканого материала в биологических системах *in vitro* (культура дермальных фибробластов человека) и *in vivo* (экспериментальные животные).

Подтверждена возможность использования рассматриваемых полиимидных и углеродных матриц в качестве подложек для хранения клеток, в том числе длительного с использованием технологии криоконсервации. Отмечено наличие воспалительной реакции, требующее дальнейшего исследования безопасности использования материала как имплантата. Изучена возможность использования полиимидных нетканых материалов в качестве небioresорбируемых тканеинженерных сосудистых имплантов. Подтверждена гемосовместимость и достаточная прочность трубчатых образцов.

## ABSTRACT

63 pages, 27 pictures, 7 tables, 2 appendixes

AROMATIC POLYIMIDE; CARBON NANOFIBERS; CARBONIZATION; CRYOPRESERVATION; DIAMINODIPHENYL ETHER; ELECTROSPINNING; PYROMELLITIC DIANHYDRIDE; TISSUE ENGINEERING; TISSUE-ENGINEERED VASCULAR IMPLANT; TRIETHYLAMINE; WATER-SOLUBLE POLYAMIC ACID SALTS.

The subject of the graduate qualification work is “Development of nonwoven materials based on aromatic polyimides for tissue engineering”.

This work reports on development and characterization of electrospun nonwoven materials based on aromatic polyimides for tissue engineering applications, namely cell storage and cryopreservation, conductive scaffolds, and tissue-engineered vascular grafts.

Properties of aqueous solutions of polyamic acid salts based on 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid dianhydride and 4,4'-diaminodiphenyl ether were investigated. Electrospinning, imidization, and carbonization regimes were developed. *In vitro* and *in vivo* biocompatibility tests were held on human dermal fibroblasts culture and experimental animals, respectively.

The possibility of using polyimide and carbon matrices as substrates for cell storage, including long-term cryopreservation, was confirmed. Inflammatory reaction was noted; so additional tests are required to proof implantation safety. The possibility of using polyimide nonwoven materials as non-biodegradable tissue-engineering vascular implants has been studied. Hemocompatibility and sufficient strength of tubular samples were confirmed.

## СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений .....	6
Введение.....	7
Глава 1. Обзор литературы.....	8
1.1. Полиимиды .....	8
1.1.1. История применения полиимидов.....	8
1.1.2. Синтез полиимидов и получение изделий из них .....	8
1.1.3. Полиимидные материалы в приложении к биологии и медицине... 10	
1.2. Применение нетканых ЭФ-материалов в биомедицине .....	11
1.2.1. Стратегии тканевой инженерии.....	11
1.2.2. Применение полимерных материалов в трансплантологии и тканевой инженерии .....	11
1.2.3. Электроформование для получения тканеинженерных матриц ....	12
1.3. Хранение клеток.....	13
1.4. Электропроводящие матрицы.....	14
1.5. Синтетические сосудистые имплантаты .....	15
Глава 2. Получение нетканого материала и исследование его свойств .....	17
2.1. Материалы .....	17
2.1.1. Полиамидокислота.....	17
2.1.2. Синтез солей ПАК.....	17
2.1.3. Подготовка растворов для электроформования .....	18
2.2. Методы.....	18
2.2.1. Исследование растворов полимеров .....	18
2.2.2. Электроформование.....	22
2.2.3. Термическая имидизация .....	24

2.2.4.	Карбонизация.....	26
2.2.5.	Исследование свойств нетканых материалов .....	27
2.2.6.	Исследование биосовместимости.....	29
Глава 3.	Обсуждение результатов .....	33
3.1.	Характеристики растворов солей полиамидокислоты.....	33
3.2.	Электроформование, имидизация и карбонизация .....	35
3.2.1.	Циклизация полиамидокислоты.....	35
3.2.2.	Термический анализ.....	37
3.3.	Морфология и свойства нетканого материала.....	38
3.3.1.	Микроструктура .....	38
3.3.2.	Механические свойства нетканых материалов.....	43
3.3.3.	Электропроводность .....	46
3.4.	Биосовместимость полиимидных нетканых матриц.....	47
3.4.1.	МТТ-тест.....	47
3.4.2.	Исследование <i>in vivo</i> .....	49
Заключение	.....	53
Список использованных источников	.....	55
Приложение 1.	Вискозиметрия полиамидокислоты .....	62
Приложение 2.	Распределение волокон по диаметрам .....	63

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

МТТ — 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид

N-МП — N-метил-2-пирролидон

БЭТ — метод Брунауэра, Эммета и Теллера

ДМА — динамический механический анализ

ДМФА — N,N-диметилформамид

ИВС РАН — Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук

ИК — инфракрасный

ОДА — 4,4'-оксидианилин (4,4'-диаминодифениловый эфир)

ПАК — полиамидокислота

ПИ — полиимид

ПМ ДА — пиромеллитовый диангидрид (диангидрид бензол-1,2,4,5-тетракарбонной кислоты)

СПАК — соль полиамидокислоты

СЭМ — сканирующая электронная микроскопия

ТГ — термогравиметрия

ТГА — термогравиметрический анализ

ТГП — термогравиметрия по производной

УНВ — углеродные нановолокна

ЭФ — электроформование (электроспиннинг)

ЭФ-материалы — материалы, полученные методом электроформования

## ВВЕДЕНИЕ

Класс полимеров, отличающихся химической стойкостью, а также механическими и электрическими свойствами, сохраняющимися в широком диапазоне температур, представлен в литературе ароматическими полиимидами.

Благодаря выдающимся характеристикам полиимидные материалы нашли применение в различных приложениях, например, аэрокосмической и энергетической отраслях, и в последнее время привлекли внимание специалистов из области медицинской биотехнологии, в частности, тканевой инженерии. Особый интерес представляют нетканые полиимидные материалы, полученные методом электроформования.

Тканевая инженерия, будучи связанной с материаловедением, цитологией, гистологией, биофизикой, молекулярной биологией, является одной из наиболее быстро развивающихся отраслей науки. Задачи медицинского материаловедения в тканевой инженерии включают в себя разработку материалов, служащих подложками или матрицами для восстановления или поддержания функций поврежденных тканей.

К полимерным тканеинженерным объектам предъявляется ряд требований, в числе которых биосовместимость, поддержание пролиферации и прочностные характеристики, соответствующие нативной ткани. К таким объектам относятся и нетканые полиимидные материалы, полученные без применения токсичных растворителей.

Нетканые материалы на основе ароматических полиимидов являются перспективными объектами для исследования с точки зрения различных тканеинженерных приложений.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Полиимиды

#### 1.1.1. История применения полиимидов

Производимые с 1950-х годов, полиимиды нашли применение во многих отраслях промышленности. Одними из первых коммерческих образцов полиимидов стали пленки на основе диангирида бензол-1,2,4,5-тетракарбоновой кислоты (пиромеллитового диангирида) и 4,4'-диаминодифенилового эфира (4,4'-оксидианилина) — Kapton™ DuPont [65]. Впоследствии стали доступны также волокна, пены, лаки и композитные материалы на основе различных полиимидов. Полиимиды как класс полимеров могут быть разделены на алифатические, алициклические и ароматические. Материалы на основе ароматических полиимидов химически инертны, обладают высокой диэлектрической проницаемостью, прочностными и упругими характеристиками, сохраняющимися в широком диапазоне температур [6, 24]. Благодаря этим свойствам полиимидные материалы широко применяются в энергетике, электронике, фильтрации (в том числе агрессивных сред), биологии и медицине [9].

#### 1.1.2. Синтез полиимидов и получение изделий из них

При синтезе полиимидов используется одно- или двухстадийный метод [65]. В одностадийном методе полиимид получают непосредственно из мономеров в высококипящих растворителях (N-МП — N-метил-2-пирролидон, ДМФА — N,N-диметилформамид) в процессе реакции поликонденсации.

В ходе первой стадии двухстадийного метода получают растворимый формполимер: происходит ацилирование диамина диангиридом тетракарбоновой кислоты в апротонном растворителе с образованием полиамидокислоты (ПАК) (рис. 1.1). Вторая стадия заключается в образовании конечного продукта — полиимида (ПИ) — в ходе химической или термической имидизации.

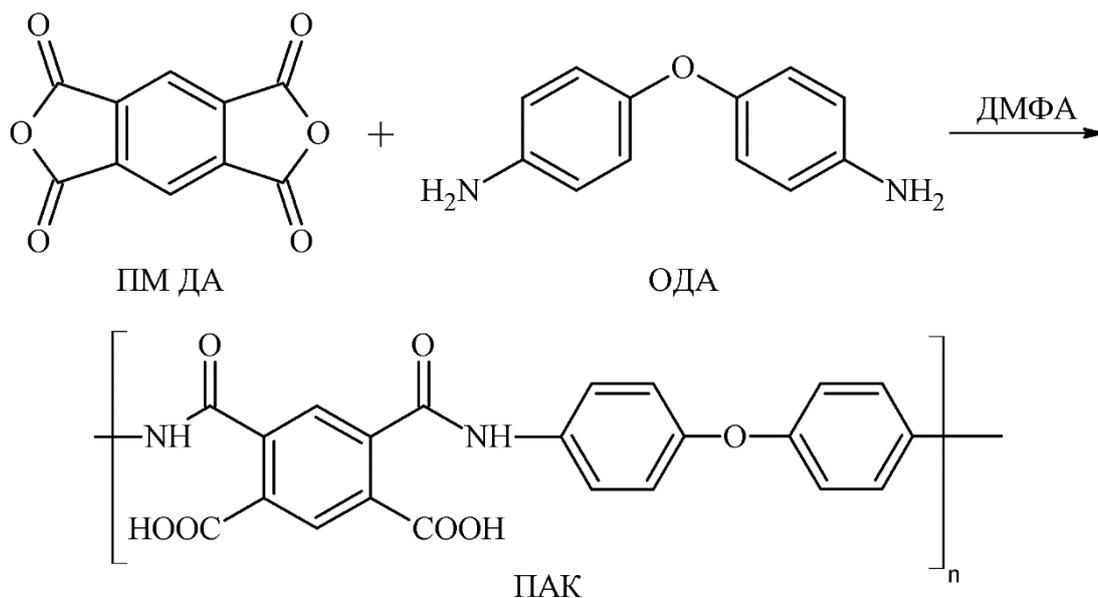


Рисунок 1.1. Схема синтеза поли-(4,4'-оксианилин) пиромеллитамидокислоты.

ПМ ДА — пиромеллитовый диангидрид, ОДА — 4,4'-оксианилин,  
ПАК — полиамидокислота, DMFA — N,N-диметилформамид

При получении ПАК и ПИ на молекулярную массу влияют несколько факторов: температура проведения процесса поликонденсации, концентрация мономеров, их мольное соотношение, природа растворителя и др.

Для получения пленок, волокон, покрытий, связующих в композиционных материалах и других изделий двухстадийный метод получил более широкое распространение.

Особый интерес представляет использование ПИ нетканых материалов для фильтрации агрессивных газов и жидкостей, создания волокнистых композиционных материалов, разделительных мембран, накопителей энергии большой емкости и др. Известны способы получения нетканых материалов методом электроформования (ЭФ-материалов) из растворов различных ПАК в смесях высококипящих апротонных и бензоидных растворителей [9]. Однако использование растворов ПАК имеет ряд недостатков [22]:

- Низкая стабильность растворов ПАК во времени. Реакция поликонденсации диангидридов и диаминов обратима, поэтому полимер в растворе имеет тенденцию к снижению молекулярной массы и распаду на исходные мономеры.

- Необходимость использования токсичных растворителей. Неполное удаление растворителя при электроформовании может иметь токсический эффект, а различные методы удаления растворителей несут значительную экологическую нагрузку.
- Высокая температура имидизации. Термическая циклизация полиамидокислоты происходит при температурах не менее 300°C [25, 40].

Одним из способов устранения приведенных недостатков является использование для электроформования водорастворимых прекурсоров полиимидов [33]. Растворимости форполимеров в воде можно достичь нейтрализацией карбоксильных групп полиамидокислоты подходящим основанием [11, 12]. Благодаря полиэлектролитной структуре некоторые соли ПАК (СПАК) водорастворимы, что позволяет использовать для электроформования более гидролитически стабильные водные растворы и снизить температуру имидизации по сравнению с полиамидокислотой за счет каталитического эффекта [25].

### **1.1.3. Полиимидные материалы в приложении к биологии и медицине**

Одной из первых работ, посвященных изучению полиимидов как полимеров для биомедицинского применения, считается исследование Р. Ричардсоном (R. Richardson) и др. цитотоксичности *in vitro* коммерческих ПИ пленок [57]. Благодаря своим диэлектрическим свойствам, гибкости, биосовместимости полиимиды получили широкое распространение в качестве элементов неврологических микроэлектронных устройств [34, 43, 44]. Помимо нервной системы, микроэлектронные устройства на основе полиимидных подложек используются в диагностике и лечении кардиологических заболеваний. Показана нетоксичность материала по отношению к человеческим эндотелиальным клеткам [61].

Важной особенностью ПИ является широкая химическая вариабельность, возможность модификации полимерной цепи, например, для повышения био- и гемосовместимости материала [39, 58].

Широкий диапазон температур, при которых полиимидные материалы сохраняют механические свойства, позволяет подвергать ПИ изделия (пленки, волокна, нетканые маты) высокотемпературной стерилизации, что в совокупности

с наличием антибактериальной активности и отсутствием цитотоксического эффекта открывает перспективу использования ПИ в качестве матриц для тканеинженерных препаратов [59].

## **1.2. Применение нетканых ЭФ-материалов в биомедицине**

### **1.2.1. Стратегии тканевой инженерии**

Цель тканевой инженерии состоит в восстановлении или поддержании функций тканей, которые были утрачены или повреждены в результате различных патологических процессов. Говоря о стратегии тканевой инженерии, выделяют три основных направления:

- имплантация изолированных клеток или их заменителей в организм;
- доставка веществ, индуцирующих развитие ткани (факторов роста);
- размещение клеток на поверхности или внутри различных подложек и матриц.

Матрицы для тканевой инженерии выполняют следующие функции:

- усиление взаимодействия между клеткой и субстратом, адгезии клеток (имитация внеклеточного матрикса);
- обеспечение достаточного транспорта газов, питательных веществ и регуляторных факторов, обеспечивающих выживание, пролиферацию и дифференцировку клеток;
- биодegradация с контролируемой скоростью, которая приближается к скорости регенерации ткани в культуральных условиях.

Кроме того, идеальная тканеинженерная матрица не должна провоцировать воспаление или токсические эффекты *in vivo* [23].

### **1.2.2. Применение полимерных материалов в трансплантологии и тканевой инженерии**

В трансплантологии и тканевой инженерии широко используются волокнистые матрицы из природных и синтетических биорезорбируемых (биоразлагаемых) и нерезорбируемых полимеров. Используемые полимерные соединения и продукты их резорбции не проявляют цито- и генотоксичности независимо от механизма резорбции (гидролитическая, ферментативная, окислительная и др.).

К биорезорбируемым полимерам, используемым в тканевой инженерии, относят полилактиды, сополиамиды, хитин, хитозан и др. Эти полимеры сохраняют свои механические характеристики в течение прогнозируемого промежутка времени, отведенного на пролиферацию клеток, и деградируют после образования новой ткани. Полимеры, биорезорбция которых происходит в течение нескольких десятков лет, называют нерезорбируемыми или условно биорезорбируемыми. Среди таких соединений выделяют политетрафторэтилен и сополимеры на его основе, полиэтилен, полипропилен, полиметилметакрилат, полиуретаны, полисилоксаны, полиимиды и др. [7]

### **1.2.3. Электроформование для получения тканеинженерных матриц**

Электроформование в настоящее время — относительно недорогой и простой метод создания скаффолдов из волокон микро- и нанометрового диаметра [50]. Среди преимуществ электроформования выделяют высокую производительность, широкий выбор материалов и возможность изготовления различных макроструктур [48]. ЭФ-маты обладают большей удельной площадью поверхности (отношением площади поверхности к объему или массе волокон) по сравнению с пленками, поэтому широко используются в тканевой инженерии, регенеративной медицине, адресной доставке лекарственных средств и других биомедицинских направлениях [60]. Биосовместимые полимерные ЭФ-изделия различной формы и внутреннего строения могут выполнять роль раневых покрытий; тканеинженерных скаффолдов, имитирующих внеклеточный матрикс; покрытий, повышающих приживаемость жестких эндопротезов [32]. Высокая пористость и пространственная связанность нетканых ЭФ-матов обеспечивают эффективный транспорт веществ, необходимых для клеточных процессов [53]. Биорезорбируемые и нерезорбируемые нетканые матрицы были успешно использованы в качестве тканеинженерного каркаса при замене костной [66] и хрящевой ткани [62], сухожилий [42], нервов [27], кровеносных сосудов [36], кожи [67] и т. д.

### 1.3. Хранение клеток

Последние достижения в разработке готовых композитов клеток и биоматериалов позволяют создавать стандартизированные лабораторные инструменты для современной тканевой инженерии и безопасные удобные методы лечения пациентов [31]. Эффективное длительное хранение клеток облегчает их транспортировку для применения в регенеративной медицине. Одной из ключевых технологий тканевой инженерии для долгосрочного хранения клеток и тканей является криоконсервация [21].

Одним из первых этапов становления криобиологии, в частности, технологии криоконсервации клеток, считаются опубликованные в 1937 году результаты опытов Б. Дж. Люэта (*B. J. Luquet*) по витрификации (переводу в стеклообразное состояние при быстром замораживании) клеток [49]. Хотя эти опыты не были в полной мере успешными, исследования были продолжены во второй половине XX века различными научными группами [30], которые столкнулись с проблемой повреждения клеток кристаллами льда, образующимися в ходе цикла замораживания-оттаивания образцов [26, 35].

В настоящее время для предотвращения кристаллообразования применяют два традиционных метода: быстрое и медленное замораживание [19]. Быстрое замораживание используется для криоконсервации эмбриональных стволовых клеток, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и ооцитов; однако в случае применения адгезивной подложки этот метод менее эффективен, так как присутствие субстрата вызывает неравномерное охлаждение и появление центров кристаллообразования [41]. Медленное замораживание, которое является «золотым стандартом» в криоконсервации клеток млекопитающих, производится в присутствии так называемых криопротекторов — веществ, обеспечивающих уменьшение кристаллообразования и осмотического перепада в клетках [20]. Криопротекторы по месту действия — внутри и вне клетки — принято делить на проникающие (диметилсульфоксид, глицерин, этиленгликоль) и непроникающие (низкомолекулярные — олигосахариды, высокомолекулярные — альбумин, поливинилпирролидон) [19].

Однако даже при медленном замораживании криоконсервация связанных с субстратом клеток значительно сложнее, чем охлаждение суспензии отдельных клеток. Вследствие вымораживания воды во внеклеточном пространстве происходит обусловленное осмосом обезвоживание клеток, их усадка и деформация [51], что приводит к отслоению и разрушению. Для успешной криоконсервации адгезированных клеток используется несколько подходов, включая усиление взаимодействия между клеткой и субстратом, использование гидрогелей, увеличение межклеточного взаимодействия и корректировка условий замораживания [20].

Было показано, что в течение цикла замораживания-оттаивания клетки, адгезированные к жесткой подложке, отделяются от субстрата и разрушаются из-за различной скорости тепловой деформации клеток и подложки [46]. Подтверждено предположение о том, что субстрат, сохраняющий эластичность при температуре замерзания среды, будет препятствовать отслоению клеток от поверхности в процессе дегидратации, происходящей во время медленного замораживания. В роли такого эластичного субстрата может выступать нерезорбируемый нетканый нановолоконный материал, полученный методом электроформования — ЭФ-материал [20].

Замороженные тканеинженерные препараты могут быть использованы в различных приложениях регенеративной медицины, например, в качестве раневых покрытий в медицине катастроф.

#### **1.4. Электропроводящие матрицы**

Материал-биомиметик должен иметь структуру, имитирующую внеклеточный матрикс. Однако для многих типов тканей важно также сохранять электрофизиологическое поведение нативной ткани, например, особенно чувствительных к электростимуляции имплантируемой матрицы нервной и мышечной ткани, тканей миокарда [37, 52]. Скаффолды из полимерных материалов-диэлектриков модифицируют с помощью органических проводящих полимеров (например, полипиррола) или углерод-содержащих компонентов (углеродные нановолокна, углеродные нанотрубки и др.) [63].

Метод электроформования с последующей карбонизацией позволяет получить из ряда полимеров длинные углеродные нановолокна (УНВ) с большей, по сравнению с традиционным химическим осаждением из газовой фазы, удельной площадью поверхности и высокими механическими свойствами. Часто в качестве прекурсора УНВ выступают ЭФ-волокна из полиакрилонитрила, однако показано, что полимеры, имеющие более плотный углеродный остов (ароматические и гетероциклические полимеры), демонстрируют лучшие механические характеристики и большую электропроводность [68].

Обнаружено, что УНВ, полученные из полиимидных ЭФ-волокон, обладают высокой проводимостью и низкой пористостью, так как полиимиды отличаются высоким коксовым остатком [28] и, таким образом, являются перспективными прекурсорами графитоподобных волокнистых скаффолдов для электростимуляции клеток [29].

### **1.5. Синтетические сосудистые имплантаты**

Прочность и химическая инертность полиимидных материалов может быть использована в тканевой инженерии для имплантатов, контактирующих с кровью, в частности, протезов кровеносных сосудов.

Нерезорбируемые полимерные матрицы в настоящее время используются для протезирования только крупных сосудов (не менее 5 мм) с высокой скоростью кровотока. Среди причин отказа от тканеинженерных имплантов малого диаметра можно выделить тромбогенность используемых материалов и сужение просвета сосуда ввиду миоинтимальной гиперплазии в области анастомозов [38].

Функционирование сосудистого имплантата в течение длительного времени зависит от иммунного ответа и образования на полимерной матрице ткани, близкой по характеристикам к тканям реципиента. Процесс формирования ткани на инородном теле начинается с адгезии клеток к его поверхности, за которой следует пролиферация и дифференцировка клеток в зависимости от окружающей среды. Стенка сосудистого протеза должна иметь пористую структуру с высокой удельной площадью поверхности, которая способствует адгезии клеток, а также ионному и аминокислотному транспорту [55]. Такими свойствами обладают

биоинертные нетканые трубки, получаемые методом электроформования. Они не взаимодействуют с компонентами крови; обладают механическими характеристиками, близкими к нативному сосуду; обеспечивают достаточную пористость и, как следствие, адгезию эндотелиальных клеток, в свою очередь, уменьшающих риск тромбирования протеза [54].

Таким образом, целью настоящей работы является разработка и изучение свойств нетканых материалов, полученных методом электроформования на основе ароматических полиимидов, применительно к задачам тканевой инженерии, а именно хранению и криоконсервации клеток, получению электропроводящих матриц и использованию скаффолдов в качестве тканеинженерных протезов кровеносных сосудов.

Для достижения обозначенной цели выполнены следующие задачи:

- исследование оптимальных характеристик растворов прекурсоров для получения полиимидного нетканого материала;
- разработка режимов электроформования, имидизации и карбонизации;
- исследование морфологии, термических и механических свойств полученных материалов;
- изучение биосовместимости нетканых полиимидных и углеродных скаффолдов в биологических системах *in vitro* и *in vivo*.

Работа проведена на базе лаборатории «Полимерных материалов для тканевой инженерии и трансплантологии» Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого.

## ГЛАВА 2. ПОЛУЧЕНИЕ НЕТКАНОГО МАТЕРИАЛА И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО СВОЙСТВ

### 2.1. Материалы

#### 2.1.1. Полиамидокислота

Для электроформования в данной работе использовали полиамидокислоту на основе пиромеллитового диангидрида и 4,4'-оксидианилина (ПМ ДА-ОДА). Полимерная цепь на основе жестких звеньев ПМ ДА и гибких звеньев ОДА считается одной из самых простых в производстве из-за высокой реакционной способности мономеров. Жесткие фрагменты обеспечивают термоокислительную стабильность с высокой температурой потери 5% массы и температурой стеклования. С другой стороны, гибкие звенья ОДА деформируют цепь, усложняя упаковку в кристаллическую решетку [65].

Для приготовления солей использовали ПАК фирм «*Sigma-Aldrich*» (Германия) и «Эстроком» (Россия).

#### 2.1.2. Синтез солей ПАК

Синтез солей ПАК (СПАК) проводили на базе Лаборатории №1 (Синтеза высокотермостойких полимеров) Института высокомолекулярных соединений Российской академии наук (ИВС РАН).

Для выделения форполимера из амидного растворителя раствор разбавляли до 3 мас. %. Полученный раствор прикапывали в сосуд с дистиллированной водой при интенсивном перемешивании с образованием белой волокнистой массы ПАК, которую отделяли, промывали дистиллированной водой, переносили на воронку Бюхнера и фильтровали с отжимом. Для синтеза водных растворов солей к выделенному волокнистому осадку ПАК добавляли дистиллированную воду и солеобразующий агент: на 0,05 моля ПАК использовали 0,10 моля триэтиламина ( $\text{Et}_3\text{N}$ ), либо 0,10 моля аммиака ( $\text{NH}_3$ ) в виде 25%-ного раствора, либо 0,05 моля карбоната натрия ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) в виде 20%-ного водного раствора. Схема синтеза на примере триэтиламмонийной соли ПАК приведена на рис. 2.1. Полученную в каждом опыте массу перемешивали при комнатной температуре до

образования прозрачного водного раствора. Удаление воды из раствора проводили на ротационном испарителе при 60–65 °С, после чего соль дополнительно сушили в вакуумном сушильном шкафу при температуре 50–60 °С [11, 12].

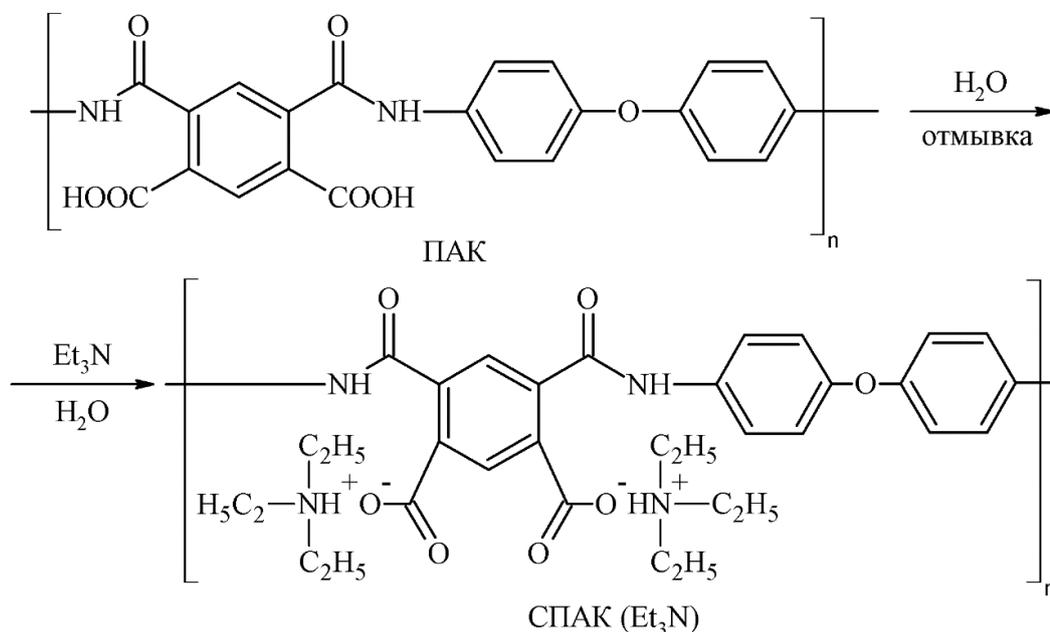


Рисунок 2.1. Схема синтеза триэтиламмонийной соли ПАК

### 2.1.3. Подготовка растворов для электроформования

Для снижения вязкости и поверхностного натяжения водных растворов солей ПАК до значений, оптимальных для электроформования (разделы 2.2.1 и 2.2.2), в раствор добавляли этиловый спирт в соотношении с водой от 50/50 до 70/30 мас. %. Весовую концентрацию СПАК в водно-спиртовом растворе варьировали от 8 до 15%. Растворы перемешивали в течение 24 часов при комнатной температуре, фильтровали и использовали для электроформования.

## 2.2. Методы

### 2.2.1. Исследование растворов полимеров

#### *Вискозиметрия ПАК*

Молекулярную массу ПАК определяли вискозиметрическим методом. С помощью вискозиметра Уббелодде измеряли  $t$  — времена истечения раствора полимера с низкой ( $< 2$  мас. %) концентрацией — и  $t_0$  — время истечения чистого растворителя. Отношения этих времен истечения называют относительной вязкостью  $\eta_{\text{отн}}$ . Характеристическую вязкость  $[\eta]$  вычисляли как предел приведенной

вязкости  $\eta_{\text{пр}}$  — отношения удельной вязкости  $\eta_{\text{уд}} = \eta_{\text{отн}} - 1$  к концентрации  $C$  — при устремлении концентрации к нулю:

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \left( \left( \frac{t}{t_0} - 1 \right) \cdot \frac{1}{C} \right) = \lim_{C \rightarrow 0} \frac{(\eta_{\text{отн}} - 1)}{C} = \lim_{C \rightarrow 0} \frac{\eta_{\text{уд}}}{C} = \lim_{C \rightarrow 0} \eta_{\text{пр}} \quad (2.1)$$

Молекулярную массу полимера  $M$  вычисляли с помощью (2.1) из уравнения Марка-Куна-Хаувинка:

$$[\eta] = KM^\alpha, \quad (2.2)$$

где  $K$ ,  $\alpha$  — константы, определяемые структурой полимера и параметрами растворителя. Для поли-(4,4'-оксидианилин) пиромеллитамидокислоты в различных амидных растворителях константы  $K$  и  $\alpha$  приведены в таблице 2.1.

Таблица 2.1

Константы уравнения 2.2 для поли-(ПМ ДА-ОДА)-амидокислоты [8]

Растворитель	Константа	
	$K \cdot 10^4$	$\alpha$
N,N-диметилформамид	1,1	0,91
N-метил-2-пирролидон	1,7	0,82
N,N-диметилацетамид	2,3	0,78

### *Плотность и поверхностное натяжение*

Плотность растворов измеряли методом пикнометрии. Объем пикнометра  $V_0$  вычисляли по формуле:

$$V_0 = \frac{m_1 - m_0}{\rho_0}, \quad (2.3)$$

где  $m_1$  — масса пикнометра, наполненного дистиллированной водой,  $m_0$  — масса пустого пикнометра,  $\rho_0 = 0,99823$  г/см<sup>3</sup> — плотность воды при 20 °С.

Плотность исследуемой жидкости  $\rho$  вычисляли по формуле:

$$\rho = \frac{m - m_0}{V_0}, \quad (2.4)$$

где  $m$  — масса пикнометра, наполненного исследуемой жидкостью,  $m_0$  — масса пустого пикнометра,  $V_0$  — объем пикнометра, вычисленный по формуле 2.3.

Коэффициент поверхностного натяжения растворов  $\sigma$  измеряли методом висящей капли. В основе данного метода лежит анализ формы капли, находящейся под действием гравитационных сил и сил поверхностного натяжения. В общем виде избыточное гидростатическое давление межфазной границы  $\Delta P$  связано с коэффициентом поверхностного натяжения и радиусами кривизны поверхности границы  $r_1$  и  $r_2$  законом Лапласа:

$$\Delta P = \sigma \left( \frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2} \right), \quad (2.5)$$

определяющим условия механического равновесия участка поверхности жидкости. Уравнение (2.5) в дифференциальной форме решается численно при помощи программного обеспечения тензиометра *DSA30* (*Kruss*, Германия). Уравнение поверхности капли и коэффициент поверхностного натяжения вычисляется по значениям плотности исследуемой жидкости (2.4) и диаметрам капли (рис. 2.2), фиксируемым с помощью камеры.

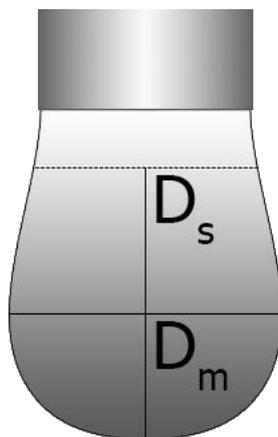


Рисунок 2.2. Измерение коэффициента поверхностного натяжения методом висящей капли.  
 $D_m$  — максимальный диаметр капли (сплошная линия),  $D_s$  — диаметр капли на расстоянии  $D_m$  от нижней точки капли (пунктирная линия)

На первой стадии ЭФ-процесса деформация капли раствора или расплава и формирование первичной струи приводит к увеличению площади поверхности, поэтому коэффициент поверхностного натяжения раствора является одним из важнейших параметров, определяющих энергоэффективность процесса. Приемлемой считается величина коэффициента, не превышающая 0,05 Н/м, и чем она ниже, тем более устойчивой будет неотвержденная струя.

Коэффициент поверхностного натяжения полимерных растворов, как правило, определяется соответствующими чистыми растворителями, следовательно, практически все жидкости, используемые для растворения полимеров, кроме диметилацетамида и воды, подходят для электроформования [15].

### *Реология*

Вязкость раствора, определяемая концентрацией полимера и характером растворителя, является одним из главных факторов, определяющих диаметр и морфологию волокон при электроформовании. При электроформовании низковязких растворов образуются дефекты, характерные для электрораспыления, — «шарики» и капли. Увеличение вязкости раствора приводит к увеличению стабильности струи и образованию однородных волокон с небольшим количеством дефектов. При увеличении вязкости за счет повышения концентрации полимера увеличивается производительность процесса. Однако в излишне вязких растворах увеличиваются энергопотери на преодоление внутреннего трения внутри и на краю фильеры, капли раствора отверждаются, препятствуя формированию волокна. В ЭФ-процессе используют растворы полимеров с молекулярной массой порядка  $10^4$ – $10^5$  Да, концентрацией до 20% и динамической вязкостью от 0,05 до 1 Па·с [15, 53].

Изучение вязкости растворов проводили на реометре *Physica MCR301* (*Anton Paar*, Австрия) в измерительном узле «конус-плоскость» *CP25 2* (диаметр 25 мм, угол  $2^\circ$ , зазор между конусом и плоскостью 0,05 мм) при температуре  $20^\circ\text{C}$ . Испытания осуществляли в динамическом (осциллирующем) режиме в диапазоне частот от 0,1 до 100 рад/с.

### *Электропроводность*

Не менее важным для ЭФ-процесса свойством раствора является его удельная объемная электропроводность. Проводимость раствора или расплава принципиально ограничивают только снизу — если свободные заряды релаксируют под действием внешнего электрического поля быстрее, чем деформируется жидкая струя, первая стадия ЭФ-процесса существенно замедляется [15]. Струя раствора с высокой удельной электропроводностью подвергается большему

растягивающему усилию в электрическом поле. Было показано, что диаметр струи обратно пропорционален кубическому корню из проводимости раствора [60]. Повышение электропроводности раствора с помощью ионообразующих добавок (NaCl) до 1,5–3 мСм/см способствует уменьшению диаметра волокон [64].

Также с ростом электропроводности увеличивается число расщеплений не полностью отвержденной струи полимера, то есть скорость волокнообразования, которая является показателем производительности. Однако повышение проводимости осажденных волокон приводит к перезарядке осажденного слоя и приводит к его «вспуханию», при этом волокна приподнимаются и вытягиваются навстречу дрейфующим и спутываются с ними: структура нетканого мата ухудшается, нарастает его неоднородность по толщине [5].

В данной работе удельную электропроводность растворов полимеров контролировали с помощью кондуктометра *Seven Compact S230 (Mettler Toledo, Швейцария)*.

### **2.2.2. Электроформование**

#### *Принцип работы установки*

Лабораторная установка для электроформования состоит из четырех основных компонентов (рис. 2.3, слева): фильера (например, игла для инъекций с тупым концом); насос либо поршень с электродвигателем для подачи раствора полимера с контролируемой скоростью; источник питания постоянного тока до 30 кВ и заземленный коллектор. Раствор полимера образует на фильере, находящейся под напряжением, каплю, на поверхности которой скапливаются заряды того же знака. Как только отталкивание между одноименными зарядами становится достаточно сильным, чтобы преодолеть силы поверхностного натяжения, образуется конус Тейлора (рис. 2.3, справа) и струя жидкости вытягивается по направлению к заземленному коллектору. В результате электростатического отталкивания происходит растяжение струи и разбиение ее на микроструи; в процессе испарения растворителя образуется волокно (происходит отверждение). Затем дрейфующие волокна осаждаются на коллектор. Для удаления паров

растворителя и обеспечения безопасных условий работы все оборудование установки размещают в электрически изолированной непрерывно вентилируемой камере [15, 47].

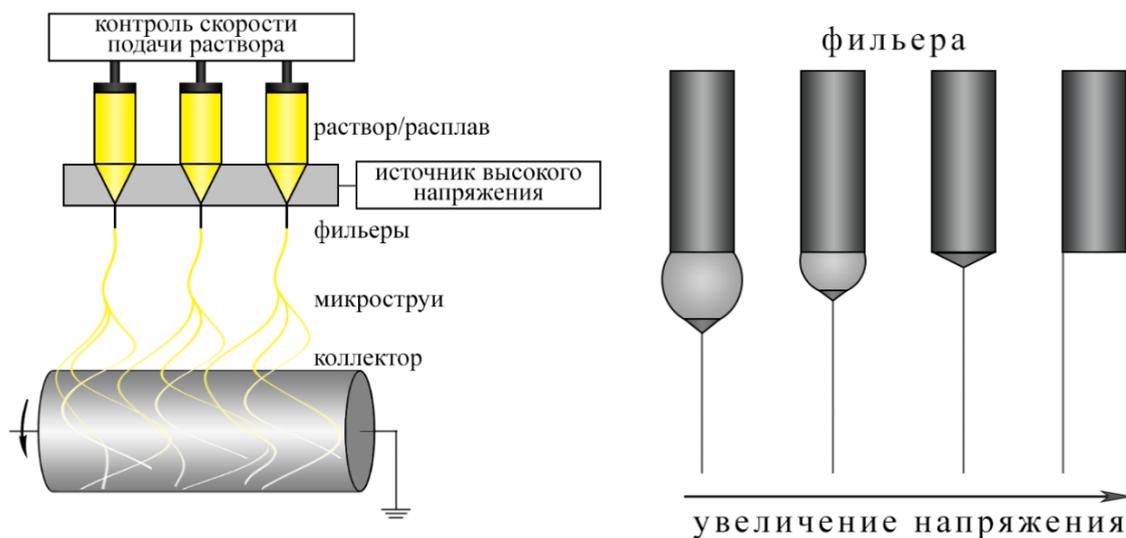


Рисунок 2.3. Принципиальная схема установки для электроформования (слева). Форма капли раствора на фильере в зависимости от приложенного напряжения (справа)

### *Параметры, влияющие на ЭФ-процесс*

Диаметр волокон и качество покрытия варьируют, изменяя параметры прядильного раствора и установки [53].

#### Параметры установки:

- приложенное напряжение (рис. 2.3, справа),
- скорость подачи (объемный расход) раствора,
- расстояние между фильерой и коллектором,
- геометрия коллектора.

#### Параметры раствора:

- молекулярная масса полимера,
- концентрация полимера,
- поверхностное натяжение раствора,
- вязкость раствора,
- электропроводность раствора,
- летучесть растворителя.

Электроформование волокон для данной работы производили на установке *Nanon-01A* (Mecс Co., Япония). Рабочее напряжение 25–30 кВ, расход раствора 0,5–1,0 мл/ч, расстояние между фильерой и коллектором 150–200 мм.

Для получения плоских покрытий использовали цилиндрический коллектор диаметром 110 мм, скорость вращения коллектора от 1 000 до 3 000 оборотов в минуту (максимальная скорость  $\approx 2,75$  м/с). Цилиндрический коллектор позволяет получить более упорядоченную нановолоконную структуру, большую площадь образца (развертка цилиндра) и большую однородность ЭФ-мата по толщине по сравнению с плоским коллектором.

Для получения трубчатых образцов использовали цилиндрический коллектор диаметром 1,2 мм, скорость вращения 2 500 оборотов в минуту ( $\approx 0,025$  м/с).

### **2.2.3. Термическая имидизация**

#### *Инфракрасная спектроскопия*

Чтобы определить температуру, при которой происходит переход от ПАК или СПАК к ПИ с помощью инфракрасной (ИК) спектроскопии, снимали спектры поглощения материала до и после термической имидизации. Вывод о полном прохождении реакции (рис. 2.4) делали при исчезновении пиков поглощения, характерных для амидных  $-\text{CONH}-$  ( $3260$  и  $1540$   $\text{см}^{-1}$ ) и карбоксильных  $-\text{COOH}-$  ( $1650$   $\text{см}^{-1}$ ) звеньев ПАК (группы  $-\text{COO}^-$  при  $1590$   $\text{см}^{-1}$  для спектра СПАК), и появлении пиков, соответствующих колебаниям  $\text{C}=\text{O}$  (дублет  $1776$  и  $1720$   $\text{см}^{-1}$ ) и  $\text{C}-\text{N}$  ( $1370$  и  $720$   $\text{см}^{-1}$ ) в имидном цикле.

Чтобы проследить динамику процесса имидизации волокон с повышением температуры спектры поглощения нормировали по полосе валентных колебаний  $\text{C}-\text{C}$ -связей ароматического кольца ( $1500$   $\text{см}^{-1}$ ). Иногда в качестве внутреннего стандарта используют полосу, относящуюся к валентным колебаниям  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ -связи между двумя ароматическими кольцами в ОДА ( $1238$   $\text{см}^{-1}$ ) [12, 45].

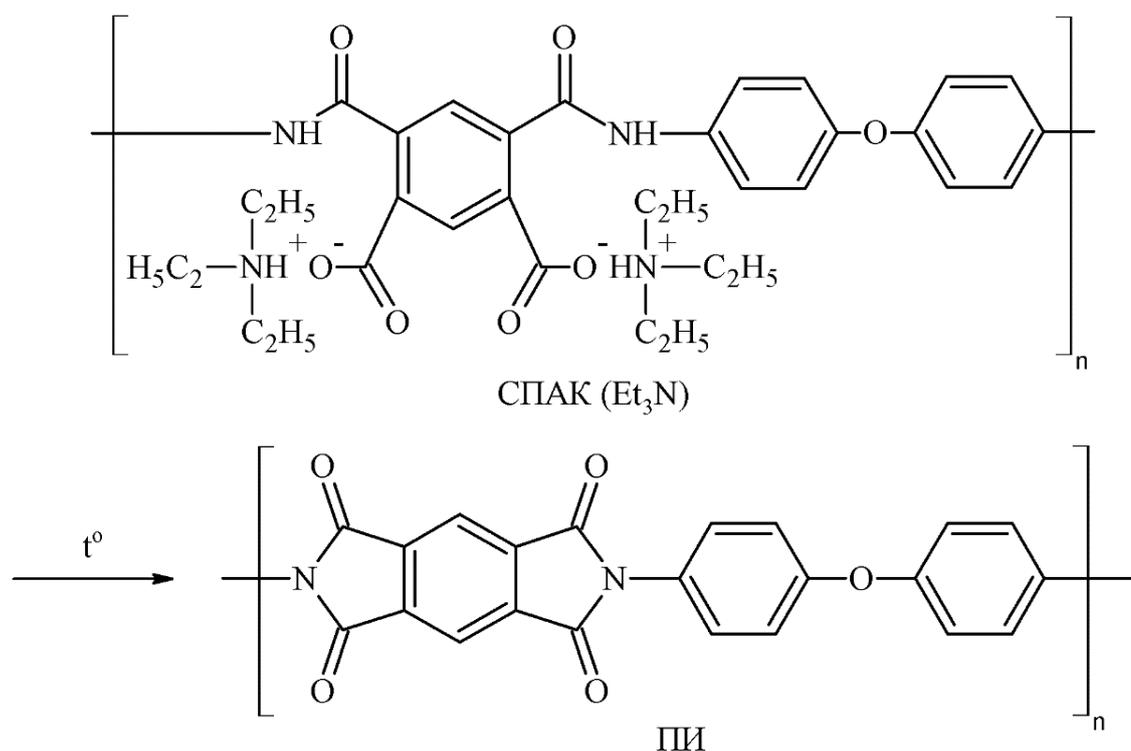


Рисунок 2.4. Схема термической имидизации СПАК

Процесс циклизации полиамидокислоты в процессе термообработки нетканого материала изучали с помощью ИК-Фурье-спектрометра *Vertex 70 (Bruker, Германия)*, с отражательной приставкой МНПВО (*Pike Technologies, США*). Спектры записывали с разрешением  $4 \text{ см}^{-1}$  при тридцати сканированиях.

#### *Режим имидизации*

На основе результатов, полученных при анализе ИК-спектров, разработали режим имидизации для ЭФ-материалов на основе солей ПАК. После электроформования нетканый материал нагревали до температуры имидизации  $T_{\text{и}}$  в течение 2 часов с последующей изотермической выдержкой в течение 15 минут.

Во избежание расслоения и деформации нетканых слоев имидизацию образцов производили непосредственно на подложке (алюминиевая фольга для плоских разверток коллектора-барабана и цилиндрический коллектор для трубчатых образцов).

## 2.2.4. Карбонизация

### *Термический анализ*

Термогравиметрический анализ (ТГА) — метод термического анализа, используемый в том числе для определения температуры деградации полимеров. В динамической термогравиметрии регистрируется изменение массы образца при изменении температуры по заданному временному закону (ТГ-кривая) и/или скорость изменения массы образца в зависимости от времени или температуры (ТГП-кривая — производная ТГ-кривой по времени или температуре) [14].

Термогравиметрию образцов проводили на установке *TG 209 F1 (Netzsch, Германия)*. Испытания проводили в интервале температур 30–1000 °С при скорости нагрева 10 °С·мин<sup>-1</sup> в инертной среде (аргон).

Динамический механический анализ (ДМА) позволяет наблюдать изменение механических свойств образца в зависимости от температуры при приложении динамически меняющейся нагрузки [17].

Температурные зависимости коэффициента механических потерь ( $\text{tg } \delta$ ) полиимидного нетканого материала получали с помощью установки *DMA 242 C (Netzsch, Германия)*. Измерения проводили на частоте 1 Гц, амплитуда деформации составляла 0,1 %, скорость подъема температуры — 5 °С·мин<sup>-1</sup>. Температуру стеклования определяли как максимум  $\text{tg } \delta$ .

### *Режимы карбонизации*

На основе данных исследования термических свойств полиимидных нетканых матов разработали режимы карбонизации: нагревание образцов до температуры карбонизации  $T_k$ , экспозиция при  $T_k$  в течение 60–90 минут.

Карбонизацию нетканых материалов проводили в муфельной печи СНОЛ-1,6.2,5.1/11-ИЗ (Термикс, Россия) в атмосфере азота (рис. 2.5, слева). Образцы фиксировали между пластинами из высокотермостойкого кварцевого стекла (рис. 2.5, справа) и помещали в поглотитель Петри для подведения азота и отведения продуктов карбонизации.

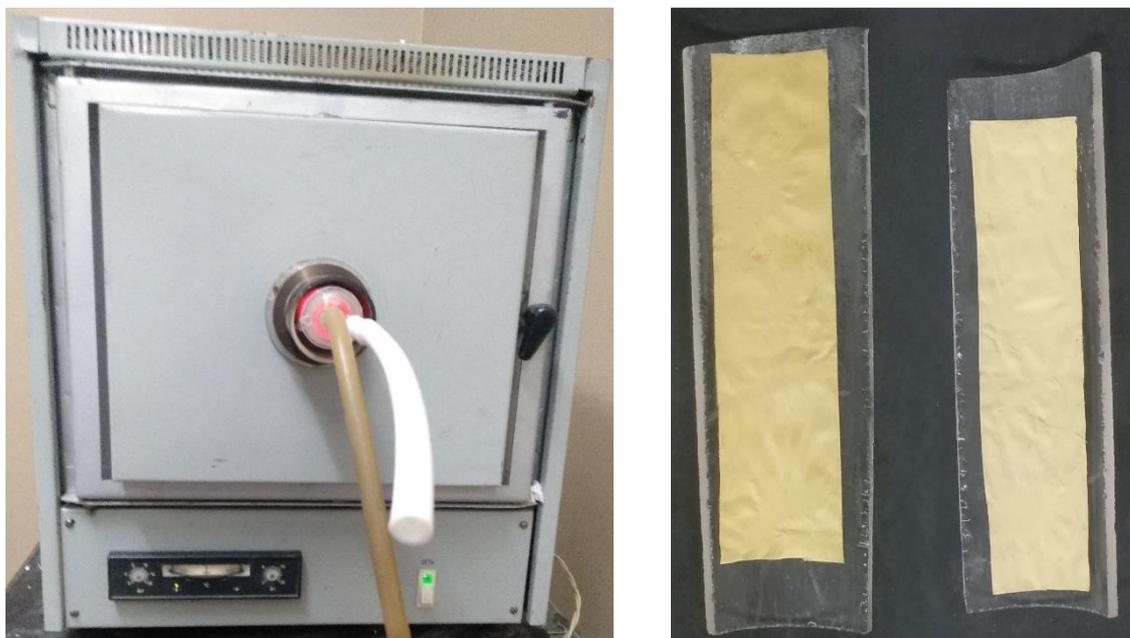


Рисунок 2.5. Муфельная печь СНОЛ-1,6.2,5.1/11-ИЗ (слева). Образцы нетканого материала на пластинах кварцевого стекла до карбонизации (справа)

### 2.2.5. Исследование свойств нетканых материалов

#### *Исследование морфологии поверхности*

Микроструктуру нетканых образцов исследовали при помощи сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).

В данной работе микроскоп *Supra 55VP-32-49* (*Carl Zeiss*, Германия) использовали в режиме детекции вторичных электронов. Перед помещением образцов внутрь камеры микроскопа на их поверхность напыляли тонкий проводящий слой платины с помощью установки *Eiko-IB3*.

С помощью программного продукта *ImageJ* по микрофотографиям определяли диаметр волокон и размер пор.

#### *Изучение удельной поверхности нетканого материала*

Известно, что наличие поверхностных пор наноразмерного уровня или шероховатость поверхности увеличивают активность адгезии и пролиферации клеток [16]. В связи с этим на базе Лаборатории №12 (Полимерных сорбентов и носителей для биотехнологии) ИВС РАН провели исследование поверхности нетканого полиимидного материала методом Брунауэра, Эммета и Теллера (БЭТ) и методом нелокальной теории функционала плотности (*non-local density functional theory*). В основе методов лежит вычисление с помощью уравнения

изотермы адсорбции площади поверхности пористого тела (нетканого ЭФ-мата) и размера пор через зависимость адсорбции  $a$  от давления  $p/p_0$  при постоянной температуре.

$$\frac{\frac{p}{p_0}}{a \left[ \left( 1 - \frac{p}{p_0} \right) \right]} = \frac{C - 1}{a_m C} \left( \frac{p}{p_0} \right) + \frac{1}{a_m C} \quad (2.6)$$

Из уравнения 2.6, в котором  $C$  — отношение константы адсорбционного равновесия в первом слое к константе конденсации, вычисляется  $a_m$  — объем монослоя на поверхности адсорбента, связанный с суммарной площадью поверхности адсорбента и его пористостью.

Измерения удельной площади поверхности нетканого материала и среднего размера пор на поверхности волокон осуществляли с помощью анализатора *Nova-1200* и программного обеспечения *NovaWin* (*Quantachrome Instruments*, США).

#### *Механические характеристики*

Механические испытания отдельных ЭФ-нитей редко встречаются в литературе, так как стандартные методы испытания волокон слабо применимы к манипулированию нановолокнами [32]. Более того, ЭФ-маты не предназначены для выделения одиночных нитей, сама технология электроформования предполагает использование нетканого материала в нативном виде. В связи с этим исследовали механические характеристики нетканого материала с линейными размерами  $30 \times 5$  мм для плоских образцов и 20 мм для трубчатых с помощью универсальной испытательной машины *Instron 5943* (*Instron*, Великобритания) с пневматическими зажимами. Регистрировали зависимость механического напряжения (МПа) от деформации (%) при растяжении образцов со скоростью 5 мм/мин; с помощью программного обеспечения *Instron* вычисляли модуль Юнга (модуль упругости), прочность на разрыв и деформацию при разрыве.

#### *Исследование проводящих свойств углеродных нановолокон*

На базе Лаборатории №15 (Анизотропных и структурированных полимерных систем) ИВС РАН оценили электропроводность полученных углеродных

нановолоконных покрытий. Поверхностное сопротивление материалов измеряли в соответствии с тестовой методикой *AATCC 76-2005* [69]. Измерительное прижимное устройство состоит из двух серебряных полос длиной 10 мм, закрепленных в тефлоновом держателе параллельно друг другу на расстоянии 10 мм. Устройство прижимали к образцу и измеряли сопротивление при помощи потенциостата/гальваностата *Elins P-40 (Electrochemical Instruments, Россия)* при комнатной температуре и влажности.

Поверхностное сопротивление рассчитывали по формуле:

$$R = \frac{R_s \cdot L}{W},$$

где  $R$  — поверхностное сопротивление (Ом/квадрат),  $R_s$  — измеряемое сопротивление (Ом),  $L$  — длина электродов (мм);  $W$  — расстояние между электродами (мм).

#### **2.2.6. Исследование биосовместимости**

Биосовместимость тканеинженерных матриц проверяли *in vitro* путем культивирования на них органоспецифических клеток и мониторинга адгезии и пролиферации клеток. Тестирование на животных *in vivo* использовали для изучения биосовместимости и биоактивности материала в биологической системе [56]. Перед контактом с биологическими объектами нетканый материал стерилизовали автоклавированием в воде в течение 30 минут.

##### *In vitro*

Для тестирования биосовместимости и биоактивности полиимидных и углеродных нановолоконных подложек провели оценку цитотоксического действия на культуру дермальных фибробластов человека.

Клетки культивировали в питательной среде *DMEM* с добавлением L-глутамина, 10% бычьей эмбриональной сыворотки и антибиотиков — 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (использованы реактивы *Gibco*, США). Образцы помещали в лунки 24-луночного культурального планшета. Заливали среду *DMEM* без сыворотки. Через 1 час меняли среду на суспензию клеток: 25 тыс. клеток в 1 мл.

Культуру дермальных фибробластов человека инкубировали на поверхности образца в течение трех суток при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе *Thermo Scientific 8000 WJ 3423* (*Thermo Fisher Scientific*, США). Оценку жизнеспособности и пролиферативной активности проводили с помощью МТТ-теста. Методика основана на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид (МТТ) до нерастворимого в воде фиолетового кристаллического формазана. Для растворения кристаллов формазана после удаления среды добавляли в лунки диметилсульфоксид. Измеряли оптическую плотность полученных растворов при 570 нм с помощью планшетного спектрофотометра.

С помощью сканирующей электронной микроскопии проанализировали распределение клеток по матрицам, сделали вывод о биосовместимости материалов и однородности их свойств при контакте с живыми объектами.

Тканеинженерные препараты, состоящие из полиимидной нетканой матрицы и дермальных фибробластов, замораживали для подтверждения возможности криоконсервации и оценки изменения механических свойств (охрупчивания) матрицы.

#### *In vivo*

Имплантационные испытания *in vivo* проводили совместно с лабораториями «Экспериментальной хирургии» и «Экспериментальной медицины» НИЦ СПбГПМУ. Проведение испытаний было согласовано и одобрено локальным этическим комитетом. Проводимые испытания строго соответствовали стандартным требованиям, предъявляемым к оценкам биологического действия медицинских изделий, в частности, ГОСТ Р ИСО 10993-2-2009 (Требования к обращению с животными [1]) и ГОСТ ISO 10993-6-2011 (Исследования местного действия после имплантации [2]). Содержание и эвтаназию экспериментальных животных осуществляли в соответствии с Руководством по содержанию и уходу за лабораторными животными (ГОСТ 33215-2014 и ГОСТ 33216-2014) [3, 4].

В испытаниях *in vivo* участвовали самцы крыс линии *Wistar-Kyoto* массой 230–250 г. Все манипуляции с животными осуществляли в условиях полной анестезии в асептических условиях.

Для наркотизации животных в эксперименте с субфасциальным введением образцов применяли смесь тилетамина гидрохлорида и золазепама гидрохлорида (*Zoletil 100*), разведенную в прилагаемой к препарату воде для инъекций. Применяли индивидуальную расчетную дозировку 15 мг на 1 кг веса животного (в среднем дозировка составила 3,75 мг). Наркотизацию проводили путем внутримышечной инъекции.

Для проведения субфасциального введения экспериментальных образцов животное фиксировали к операционному столу лигатурами с последующей депиляцией области спины при помощи машинки для стрижки животных и бритвенного станка. Поверхность кожи трехкратно обрабатывали кожным антисептическим средством «Экобриз».

После обработки кожных покровов на спине в районе левой *m. latissimus dorsi* производили разрез длиной 1 см до фасции. В разрез вводили ранорасширитель рамочный, края разреза фиксировали для обеспечения проводимых манипуляций. Фасцию надрезали и раздвигали при помощи крючков остроконечных четырехзубых. Под фасцию закладывали исследуемые образцы. После помещения образцов фасцию ушивали при помощи шовного материала *Vicryl 4-0*. Кожный разрез ушивали при помощи шовного материала *Vicryl 2-0*. Аналогичным образом образцы помещали в проекции правой *m. latissimus dorsi*.

Методику, используемую для тканеинженерных сосудистых имплантов, подробно описал Гурий Иванович Попов: «Животных оперировали под общей анестезией (*Zoletil 100* (0,1 мл) и *Rometar* (20 мг/мл) — 0,0125 мл раствора на 0,1 кг массы животного интраперитонеально). Выполняли Y-образную лапаротомию и методом микрососудистой хирургии проводили мобилизацию инфраренального отдела аорты и ее протезирование матрицей с наложением 8 швов на каждый анастомоз. Использовали атравматические иглы с нитью *Prolen 9-0*. Антикоагулянты и дезагреганты не использовали. Прокондируемость сосудов оценивали

классической методикой (Acland, 1972, [18]). Переднюю брюшную стенку послойно ушивали атравматическими иглами с нитью *Prolen 4-0*. После наложения наружных швов крыс содержали в индивидуальных клетках, животные получали свободный доступ к воде и стандартную диету» [10].

#### *Гистологическое исследование*

Для проведения гистологического исследования использовали оборудование *Thermo Fisher Scientific*, США. Отобранные биопсийные образцы фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине с последующим проведением их через спирты возрастающих концентраций в гистопроцессоре *Excelsior AS* в течение 12 часов. Заливку в парафин проводили на станции *HistoStar*, нарезку парафиновых блоков — на микротоме *Microm HM 430*. Полученные срезы окрашивали в автоматической гистологической станции *Microm HMS 740* с использованием эозина водно-спиртового, гематоксилина Майера и пикрофуксина по Ван Гизону. После окраски гистологических препаратов проводили их морфологическое исследование при помощи световой микроскопии.

## ГЛАВА 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### 3.1. Характеристики растворов солей полиамидокислоты

Для определения характеристик растворов, оптимальных для получения полиимидного нетканого материала методом электроформования, измеряли молекулярную массу исходной полиамидокислоты, плотность, коэффициент поверхностного натяжения, реологические характеристики и электропроводность растворов солей ПАК.

Значения молекулярной массы используемых коммерческих ПАК на основе ПМ ДА-ОДА («Эстроком» и «*Sigma-Aldrich*»), определенные вискозиметрическим методом (экстраполяция приведенной вязкости представлена в Приложении 1), приведены в таблице 3.1. Отмечено, что значения молекулярной массы различаются незначительно в зависимости от производителя ПАК.

Таблица 3.1

Значения характеристической вязкости растворов и молекулярной массы ПАК

Происхождение ПАК	Растворитель	Характеристическая вязкость, см <sup>3</sup> /г	Молекулярная масса, кДа
«Эстроком»	ДМФА	1,65±0,08	38,8±0,8
« <i>Sigma-Aldrich</i> »	N-МП	0,98±0,01	38,6±0,1

Для различения солей полиамидокислот введено обозначение:

Et<sub>3</sub>N / NH<sub>3</sub> / Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> *Aldrich* / Эстроком — соль полиамидокислоты на основе ПМ ДА-ОДА производства «*Sigma-Aldrich*» / «Эстроком», в качестве солеобразующего агента имеющая триэтиламин / аммиак / карбонат натрия.

Для снижения вязкости и поверхностного натяжения растворов СПАК использовали разбавитель — этиловый спирт. Концентрацию этанола повышали до достижения значений вязкости и коэффициента поверхностного натяжения растворов, подходящих для процесса электроформования (не ниже 50/50 в массовом отношении — раздел 2.2.1). Отмечено, что повышение доли этилового спирта в растворителе приводит к снижению растворимости некоторых СПАК.

Растворители с концентрацией этанола более 70 мас. % в данной работе не использовали.

Коэффициент поверхностного натяжения спирто-водных растворов СПАК определяется растворителем и слабо зависит от концентрации полимера. Для всех используемых для электроформования растворов его величина составила 26–30 мН/м. В ходе исследования реологических свойств растворов обнаружено, что при концентрациях СПАК выше 12 мас. % раствор проявляет неньютоновское поведение (повышение вязкости при низких скоростях деформации) аналогично водным растворам, что приводит к невозможности формирования нановолокон в ЭФ-процессе. При снижении концентрации полимера до 8 мас. % появляются дефекты генерации волокон — капли и «шарики», присущие режиму электрораспыления жидкости.

Вязкости и коэффициенты поверхностного натяжения растворов при различных концентрациях СПАК на примере Эстроком  $\text{Et}_3\text{N}$  в спирто-водной смеси и воде приведены на рисунке 3.1.

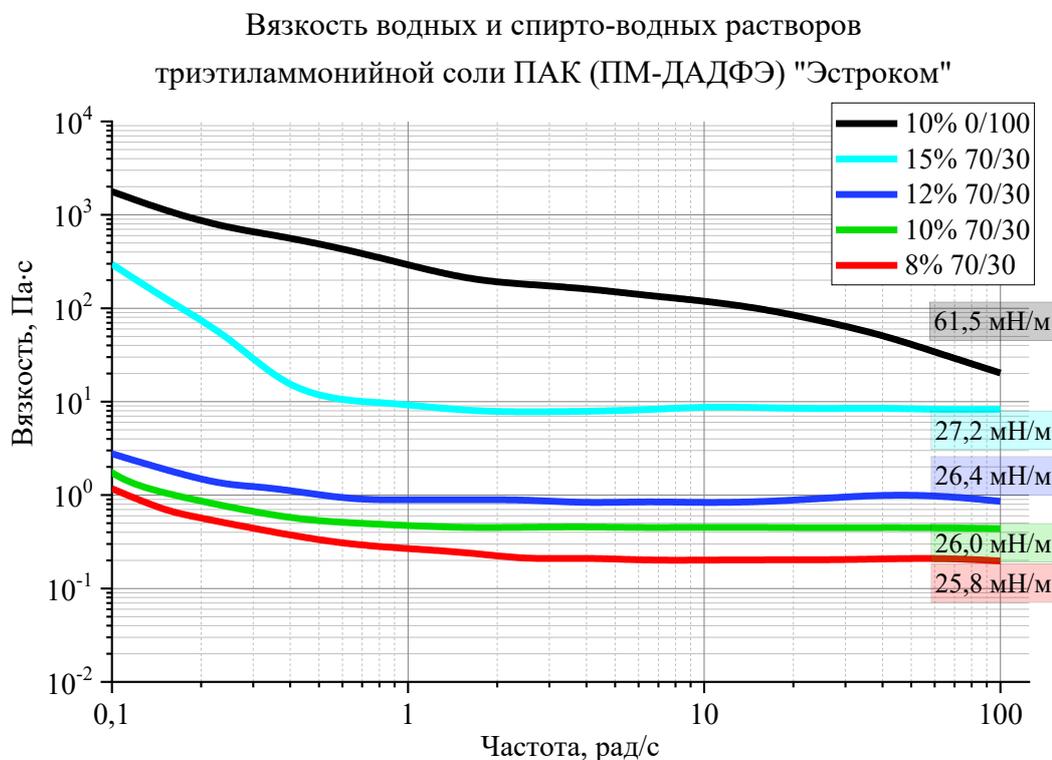


Рисунок 3.1. Реологические свойства растворов СПАК в воде (0/100) и спирто-водной смеси (70/30 мас. %). Справа приведены значения коэффициента поверхностного натяжения соответствующих растворов

Электропроводность спиртоводных растворов СПАК принимает значения 1,4–2,0 мСм/см, что, по имеющимся литературным данным, приемлемо для электроформования.

### 3.2. Электроформование, имидзация и карбонизация

Ввиду снижения растворимости СПАК при повышении доли этилового спирта в растворителе (раздел 3.1) концентрацию некоторых СПАК не удалось повысить до 8% (минимальная концентрация для устойчивой генерации волокон). В частности, *Aldrich* / Эстроком  $\text{NH}_3$  /  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  частично выпадают в осадок уже при концентрации 5 мас. % при 50%-ном соотношении этанол/вода и не подходят для электроформования (рис. 3.2).

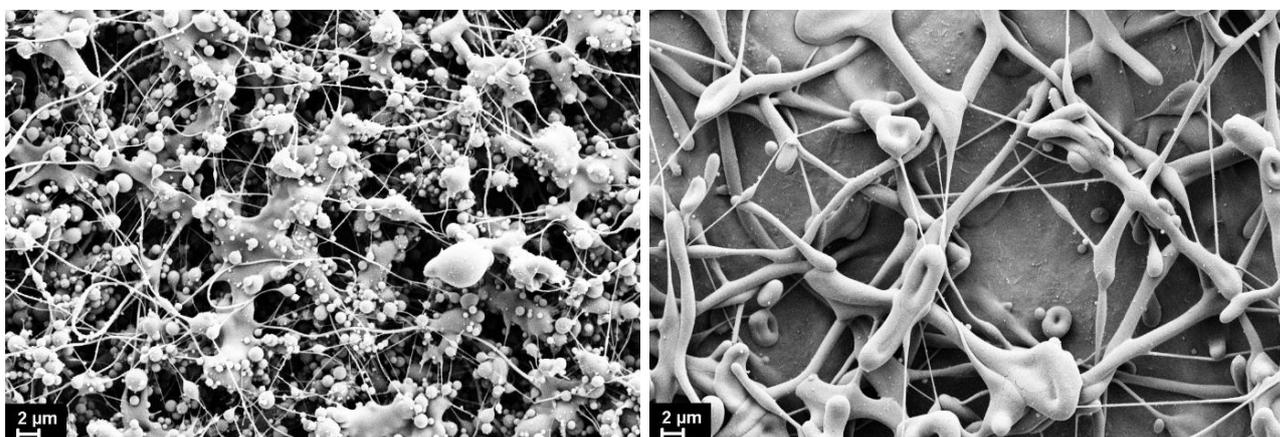


Рисунок 3.2. Примеры неустойчивой генерации волокон из низкоконцентрированных растворов: слева Эстроком  $\text{NH}_3$ , справа *Aldrich*  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (СЭМ)

Можно сделать вывод, что среди рассматриваемых противоионов только триэтиламин обеспечивает удовлетворительную растворимость СПАК в спиртоводном растворе. *Aldrich* / Эстроком  $\text{Et}_3\text{N}$ , слабо отличающиеся по характеристикам растворов, использовали для получения полиимидного нетканого материала методом электроформования.

#### 3.2.1. Циклизация полиамидокислоты

Анализ ИК-спектров СПАК и полученных из них нетканых материалов показал, что в ЭФ-процессе структура соли сохраняется — спектры практически идентичны (рис. 3.3), оба образца поглощают вблизи  $1590\text{ см}^{-1}$  (группа  $-\text{COO}^-$ ) и не поглощают при  $1680\text{ см}^{-1}$  ( $-\text{COOH}-$ ).

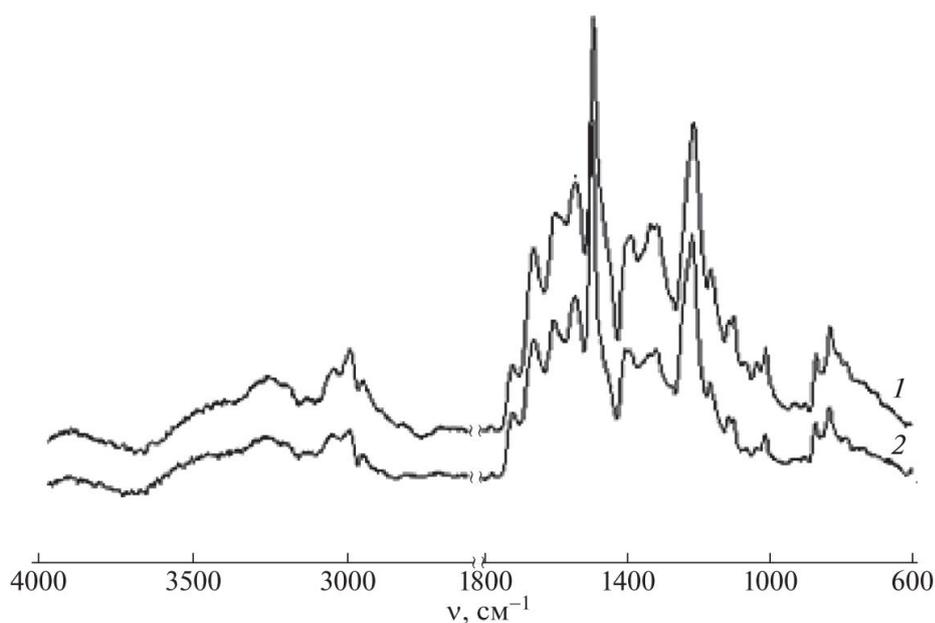


Рисунок 3.3. ИК-спектры СПАК (1) и нетканого материала на основе СПАК (2)

В ИК-спектрах нетканого материала до имидизации (рис. 3.4) наблюдали полосы поглощения характерные для валентных и деформационных колебаний N–H-связи амидных групп при 3260 и 1540  $\text{cm}^{-1}$ , соответственно. Кроме того, вблизи 1600  $\text{cm}^{-1}$  зафиксировали сигнал, отвечающий деформационным колебаниям сопряженных C–N и N–H-связей в амиде. В процессе нагревания нетканого мата в интервале температур 25 ÷ 150 °C в области между 1776 и 1720  $\text{cm}^{-1}$  возрастает вклад дублета, характерного для симметричных и ассиметричных валентных колебаний C=O-связи имидных групп, тогда как интенсивность амидных полос уменьшается. При достижении 200 °C появление полос поглощения вблизи 1370 и 720  $\text{cm}^{-1}$  (валентные колебания C–N–C-связей) и исчезновение сигналов амидных полос подтверждает образование имидных гетероциклических колец. Повышение температуры до 250 °C не повлияло существенно на профиль спектра поглощения. Можно заключить, что уже при температуре имидизации  $T_{\text{и}} = 200\text{ }^{\circ}\text{C}$  солевая форма ПАК полностью «циклизуется» до полиимида и дальнейшее повышение температуры нецелесообразно.

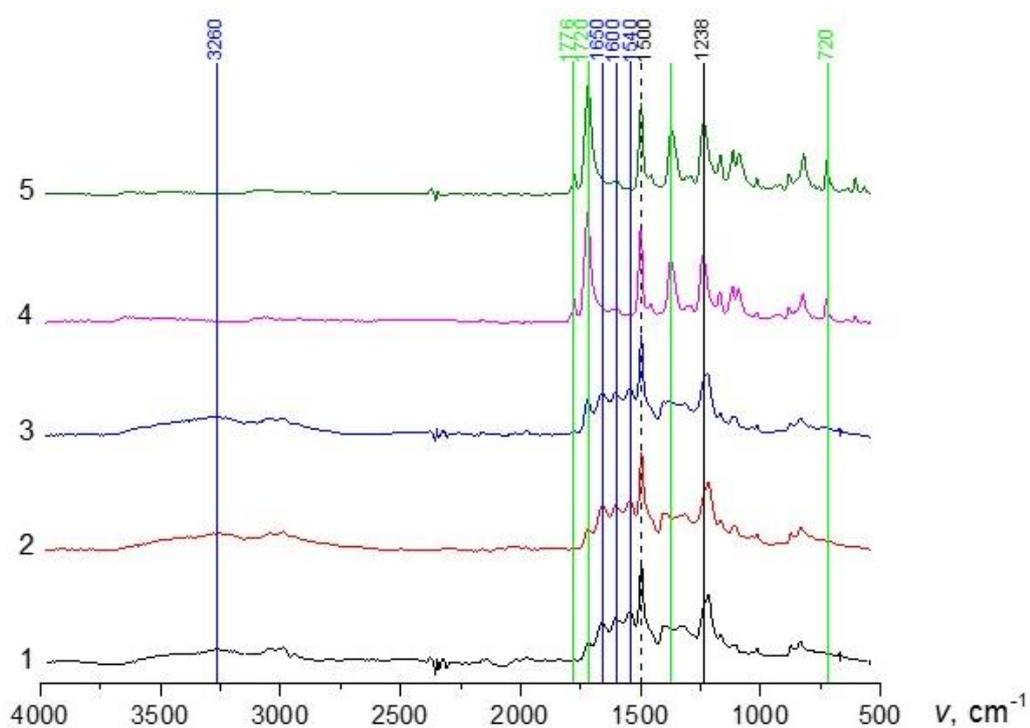


Рисунок 3.4. ИК-спектры нетканого материала при температуре 25°C (1), 100°C (2), 150°C (3), 200°C (4), 250°C (5)

### 3.2.2. Термический анализ

Термогравиметрический анализ образцов нетканых материалов показал, что полиимидный материал обладает высокой термостабильностью (рис. 3.5).

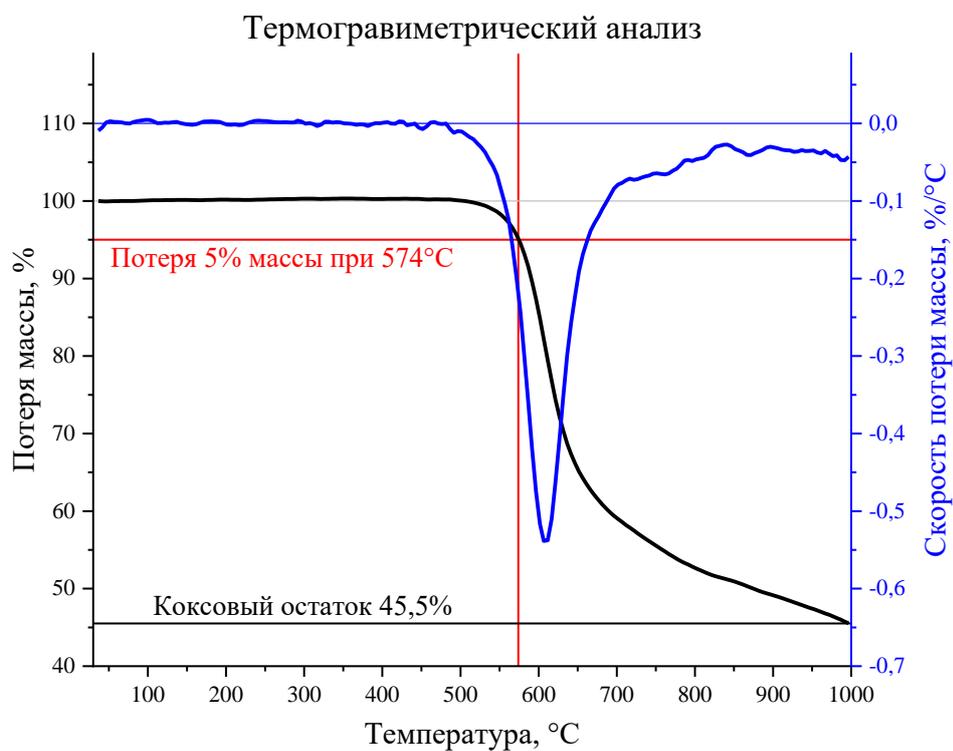


Рисунок 3.5. Кривые ТГ (черная) и ТГП (синяя) полиимидного нетканого материала

Начало термического разложения, регистрируемое при потере образцом 5% массы, наблюдали при 574°C. Также отмечено, что образец имеет высокий коксовый остаток — сохраняется более 45% массы при нагревании до 1000°C.

Для карбонизации выбрали температуры  $T_k = 600; 650; 700; 800; 900^\circ\text{C}$  (шаг 50°C для интервала с наибольшей скоростью потери массы — пик ТГП наблюдали при 609°C).

Методом динамического механического анализа определили температуру стеклования полиимида на основе ПМ ДА-ОДА (рис. 3.6) —  $T_g = 377^\circ\text{C}$ .

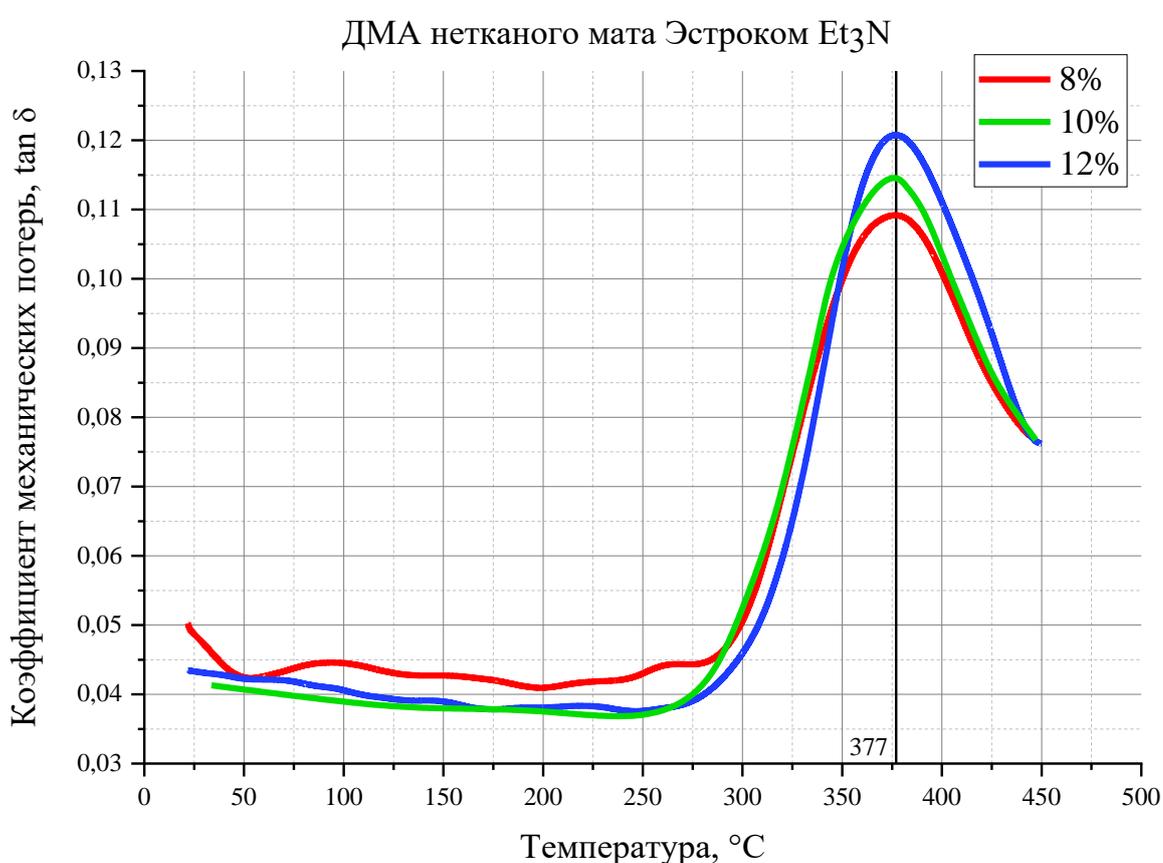


Рисунок 3.6. Зависимость тангенса угла механических потерь от температуры (ДМА) на примере полиимидных нетканых матов, полученных на основе растворов СПАК Эстроком Et<sub>3</sub>N с концентрацией 8, 10 и 12%

### 3.3. Морфология и свойства нетканого материала

#### 3.3.1. Микроструктура

По микрофотографиям измерили диаметры волокон в нетканом материале до и после имидизации. Отмечено, что нетканые маты, полученные с

использованием ПАК различных производителей, слабо отличаются по морфологии (рис. 3.7).

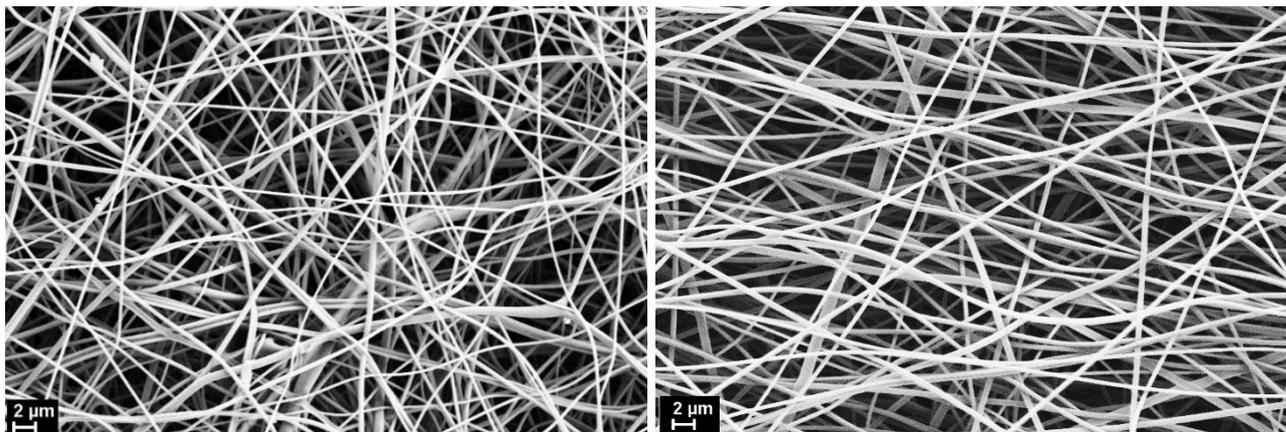


Рисунок 3.7. Микрофотографии полиимидных нетканых матов, полученных ЭФ-методом на основе *Aldrich Et<sub>3</sub>N 12%* (слева) и *Эстроком Et<sub>3</sub>N 10%* (справа)

Выбор в пользу дальнейшего использования ПАК отечественного производства сделали с учетом коммерческой целесообразности — раствор полиамидокислоты «Эстроком» значительно дешевле аналогичного раствора производства «*Sigma-Aldrich*».

Средние значения диаметров волокон в зависимости от концентрации раствора СПАК приведены в таблице 3.2. Диаметр волокон увеличивается с повышением концентрации и уменьшается в процессе имидзации волокон.

Гистограммы распределения волокон по диаметрам в зависимости от концентрации раствора СПАК приведены в Приложении 2.

Таблица 3.2

Распределение волокон по диаметрам до и после имидзации в зависимости от концентрации СПАК в прядильном растворе, цилиндрический коллектор 1 000 об/мин

Концентрация соли ПАК		8%	10%	12%
Средний диаметр волокон, мкм	Соль ПАК	0,45±0,15	0,56±0,11	1,0±0,3
	Полиимид	0,27±0,05	0,45±0,10	0,8±0,2

Скорость вращения коллектора влияет на упорядоченность волокон — ориентация происходит преимущественно перпендикулярно оси цилиндра, вдоль оси располагаются единичные волокна (рис. 3.8).

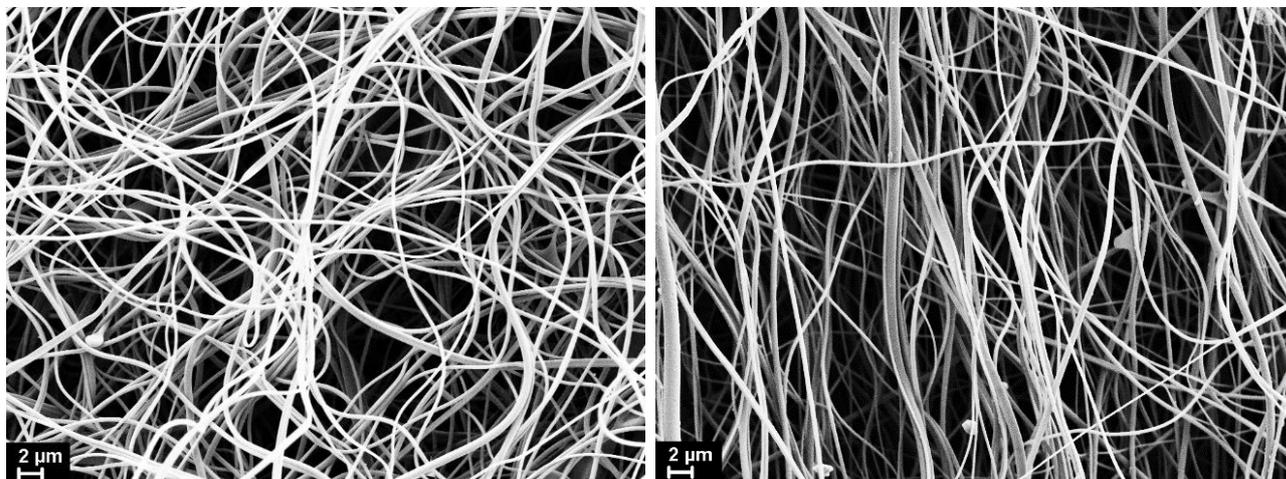


Рисунок 3.8. Слева мат с хаотичным расположением волокон (плоский коллектор). Справа упорядоченное расположение волокон (цилиндрический коллектор, 3000 об/мин)

Подобная анизотропия нетканого материала может быть применена в приложениях тканевой инженерии, которые требуют направленной пролиферации клеток, например, нервной ткани. Увеличение скорости вращения барабана с 1000 до 3000 об/мин приводит также к уменьшению среднего диаметра волокон (рис. 3.9) — это можно объяснить дополнительным вытяжением волокон, увлекаемых потоком воздуха вблизи коллектора непосредственно перед осаждением.

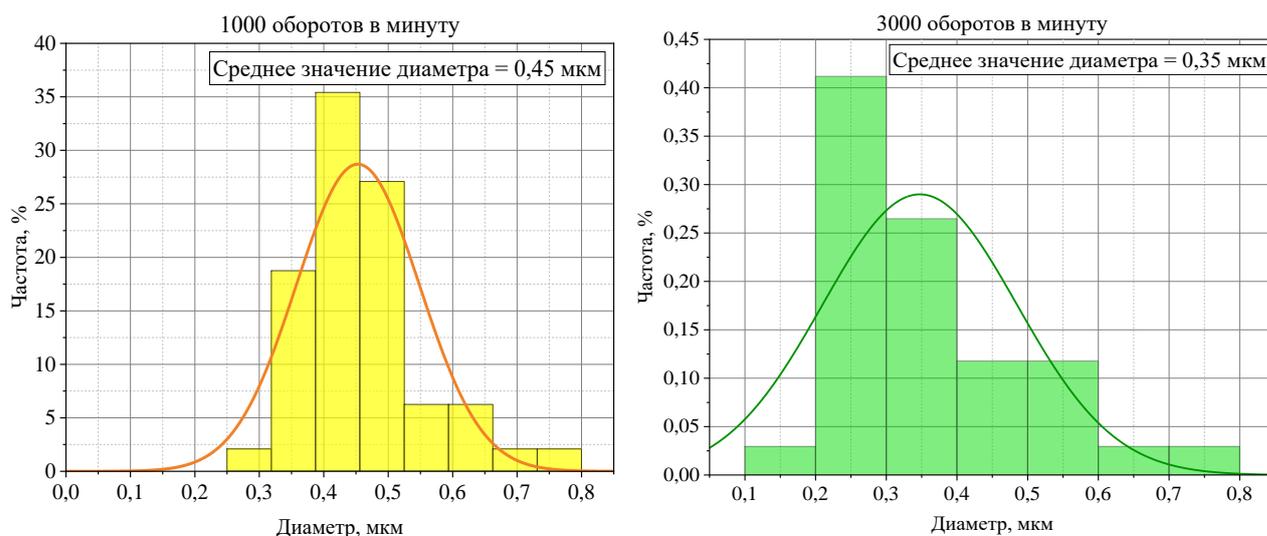


Рисунок 3.9. Гистограммы распределения волокон нетканых матов, полученных при скорости вращения коллектора 1000 об/мин (слева) и 3000 об/мин (справа), по диаметрам

С увеличением концентрации раствора СПАК материал становится более неоднородным по размеру пор (увеличивается ширина распределения, рис. 3.10). После имидизации распределения меняются слабо, средние размеры пор при различных концентрациях составляют 1–3 мкм.

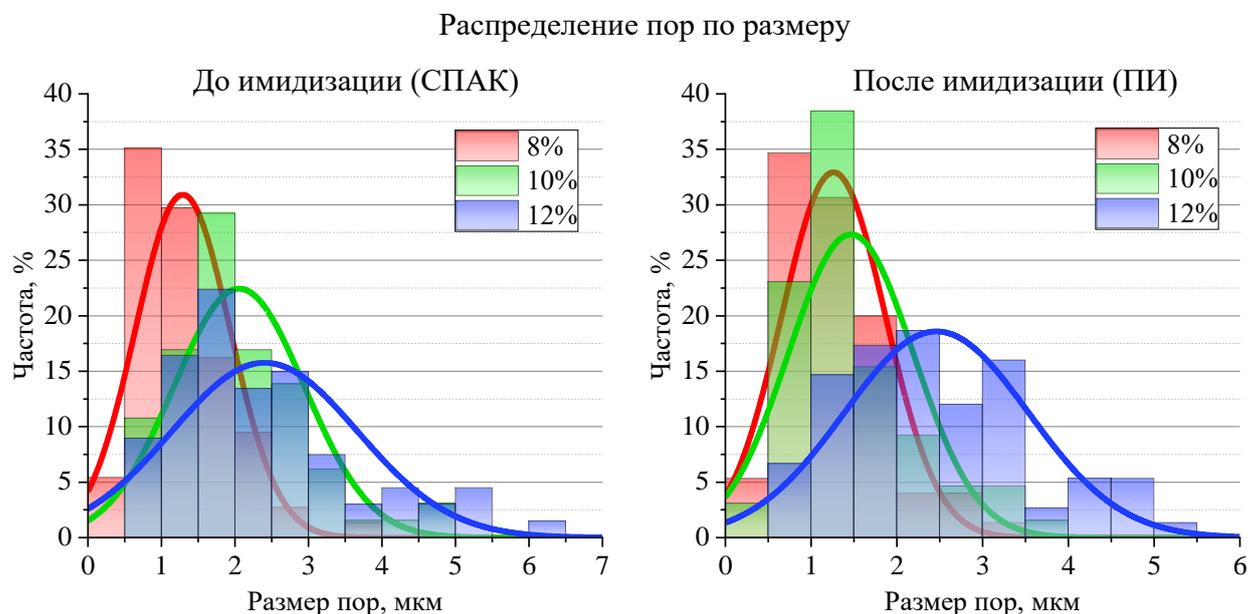


Рисунок 3.10. Распределение пор по размеру в зависимости от концентрации раствора СПАК до и после имидизации

Были определены также диаметры волокон после карбонизации нетканого материала (табл. 3.3). Отмечено уменьшение диаметра волокон при увеличении температуры карбонизации (рис. 3.11), а также уменьшение общей площади образцов.

Таблица 3.3

Распределение УНВ по диаметрам в зависимости от температуры карбонизации

Температура карбонизации, °С	600	650	700	800	900
Средний диаметр волокон, мкм	0,43±0,05	0,42±0,03	0,41±0,02	0,38±0,03	0,31±0,01

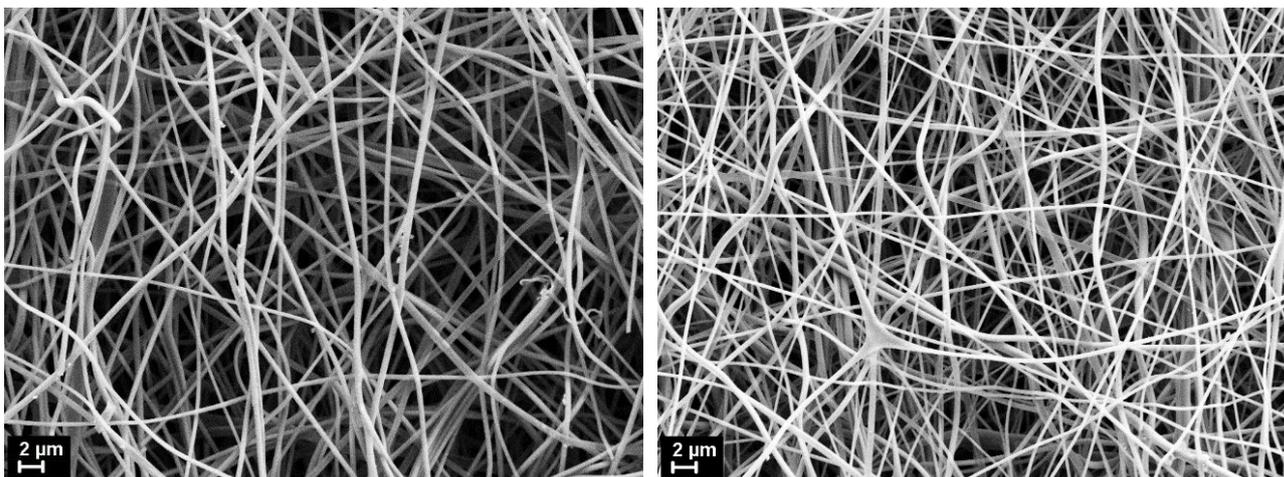


Рисунок 3.11. Микрофотографии карбонизованных нетканых матов.  
Температура карбонизации 600°C (слева), 900°C (справа)

Структуру трубчатых образцов также изучали методами СЭМ. Чтобы избежать деформации образцов, подготовку поперечных срезов выполняли при температуре жидкого азота. Ввиду адгезии нетканого материала к коллектору часть трубчатых образцов расслоилась при снятии. Задача дальнейшего исследования — разработка покрытия коллектора, которое уменьшает адгезию волокон, но при этом не увеличивает значительно диаметр коллектора, не ухудшает его электропроводность и не проявляет токсического действия (либо элиминируется перед имплантацией). Толщина стенок трубчатых образцов внутренним диаметром 1,2 мм составила, в зависимости от времени формования, от 250 до 350 мкм (рис. 3.12).

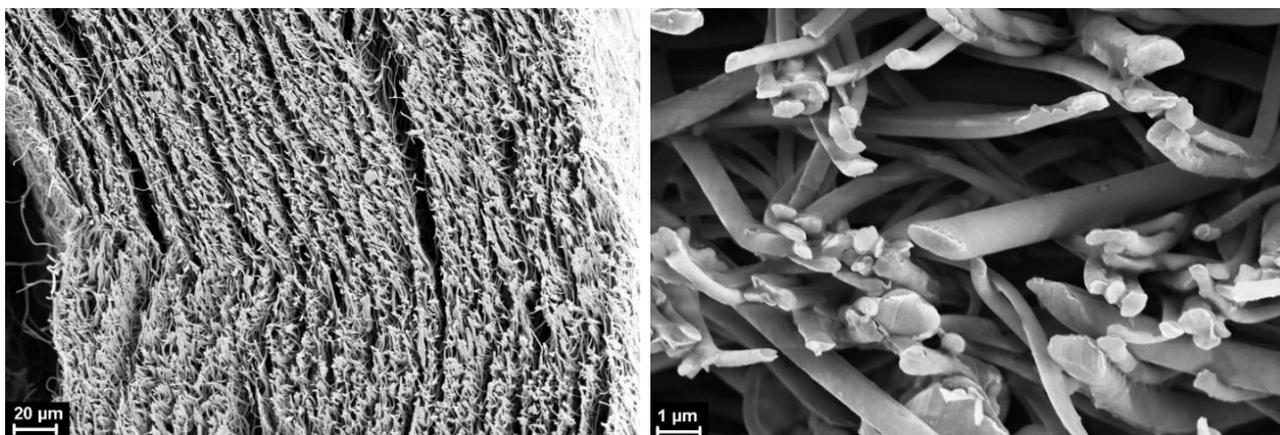


Рисунок 3.12. Поперечный срез трубчатого образца

Сканирующая электронная микроскопия обладает недостаточной разрешающей способностью для визуализации поверхности волокон (рис. 3.13). Однако наличие либо отсутствие пор и шероховатостей на наноуровне существенно влияет на адгезию клеток (раздел 2.2.5). БЭТ-анализ показал, что нетканый полиимидный материал обладает удельной площадью поверхности  $7,3 \text{ м}^2/\text{г}$ .

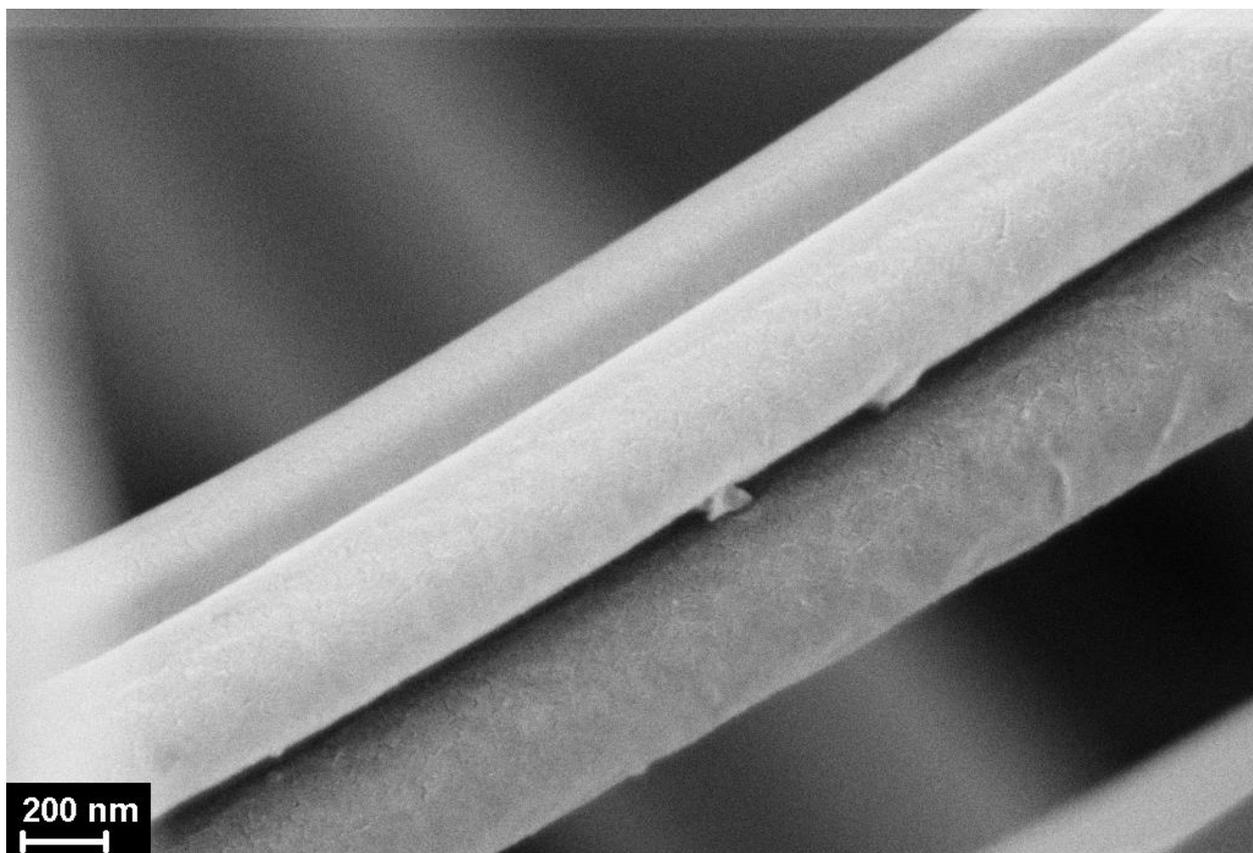


Рисунок 3.13. Микрофотография поверхности ПИ-волокон

Также адсорбционными методами установлено, что на поверхности волокон имеются нанопоры, что позволяет говорить о перспективности использования материала как тканеинженерной матрицы. Средний диаметр пор составил  $3,2 \text{ нм}$ .

### 3.3.2. Механические свойства нетканых материалов

Концентрацию раствора СПАК для получения тканеинженерных матриц выбрали с учетом результатов испытаний механических свойств полиимидных матов. Исследуемые образцы ориентировали вдоль преимущественного расположения волокон (перпендикулярно оси коллектора), что соответствует направлению, котором материал проявляет наибольшую прочность.

Результаты измерения модуля Юнга, прочности и деформации при разрыве для нетканых материалов с различными концентрациями растворов прекурсоров до и после имидизации приведены в таблице 3.4.

Таблица 3.4

## Механические характеристики матов СПАК и ПИ

Концентрация раствора СПАК	Модуль Юнга, МПа	Прочность, МПа	Деформация при разрыве, %
СПАК			
8%	99±13	6,5±0,4	17,9±1,6
10%	119±18	8,7±0,4	19,7±1,4
12%	128±12	7,9±0,6	17,0±1,9
ПИ			
8%	141±13	13,8±1,8	18,6±1,8
10%	159±5	22,1±1,5	26,5±1,9
12%	134±6	15,6±0,9	21,4±1,4

После имидизации прочность образцов возрастает в 2–2,5 раза, также увеличивается модуль упругости и область упругой деформации (рис. 3.14). Результаты измерений показали, что наибольшей прочностью и эластичностью обладают образцы с концентрацией прекурсора 10%. Падение прочности нетканых материалов при дальнейшем увеличении концентрации растворов СПАК можно объяснить появлением в материале дефектов, сопутствующих процессу электроформования сильновязких растворов СПАК.

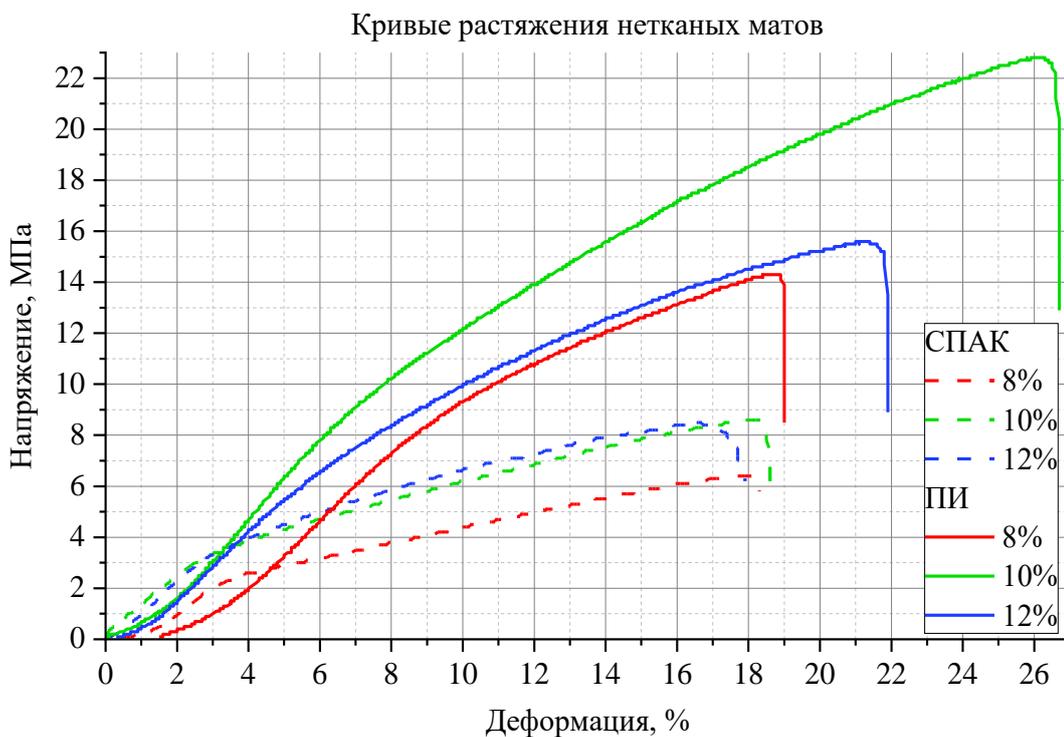


Рисунок 3.14. Кривые растяжения нетканых матов на основе СПАК и ПИ

Полиимидные маты с концентрацией раствора прекурсора 10% использовали для карбонизации и испытаний на биосовместимость.

Механические характеристики трубчатых образцов близки к параметрам нативных сосудов крыс [54] и значительно превосходят их для крупного рогатого скота [13]: модуль упругости составляет 14–19 МПа (против 17 МПа для крыс и 0,3 МПа для КРС), а прочность на разрыв — 1,8–2,2 МПа (против 2,3 и 1,3 МПа, соответственно). Основным фактором, ухудшающим механические свойства полиимидных имплантов, является расслоение образца; кроме уменьшения адгезии материала к коллектору необходимо увеличить сцепление между слоями волокон в объеме сосуда.

Следует отметить, что тканеинженерные импланты на основе полиимидов проявляют меньшую прочность, чем биорезорбируемые протезы сосудов [54]. Это объясняется тем, что биodeградируемые импланты должны иметь значительный запас прочности, чтобы не допустить разрыва, так как в процессе резорбции механические характеристики матрицы неизбежно ухудшаются.

Были определены также механические свойства карбонизованных матов в сравнении с исходными полиимидными (табл. 3.5).

Таблица 3.5

## Механические свойства карбонизованных матов

Материал нановолокна	Температура карбонизации, °С	Модуль Юнга, ГПа	Прочность на разрыв, МПа	Деформация при разрыве, %
ПИ	—	0,16±0,01	22,1±1,5	26,5±1,9
Углерод	600	0,44±0,03	2,5±0,5	1,0±0,1
	650	0,47±0,07	3,1±0,3	0,9±0,1
	700	0,77±0,11	3,8±0,5	0,9±0,1
	800	0,79±0,12	4,5±0,9	0,9±0,3
	900	0,92±0,13	4,5±1,4	0,8±0,1

Наблюдается устойчивый рост модуля упругости материала с увеличением температуры карбонизации, при этом прочность и предельная деформация после термообработки значительно сокращаются.

**3.3.3. Электропроводность**

Полиимиды являются хорошими диэлектриками, крупнопористая структура нетканого мата дополнительно уменьшает электропроводность. Углеродные же волокна проводят электрический ток, при этом сопротивление покрытия, состоящего из УНВ, уменьшается с увеличением температуры карбонизации (табл. 3.6). Дополнительно отмечено, что проводимость нетканого мата различается в зависимости от расположения измерительного устройства, так как волокна имеют преимущественную ориентацию. Таким образом, при измерении вдоль волокон (перпендикулярно оси коллектора) зарегистрирована большая электропроводность материала, чем при измерении поперек волокон (вдоль оси).

Таблица 3.6

## Сопротивление карбонизованных нетканых материалов

Температура карбонизации, °С		600	650	700	800	900
Сопротивление, Ом/квadrat	Вдоль волокон	$>10^{11}$	$19 \cdot 10^4$	4095	298	62
	Поперек волокон	$>10^{11}$	$25 \cdot 10^4$	5488	342	91

### 3.4. Биосовместимость полиимидных нетканых матриц

#### 3.4.1. МТТ-тест

С использованием культуры дермальных фибробластов человека провели исследование адгезии и выживаемости клеток при контакте с материалом. С помощью сканирующей электронной микроскопии показано (рис. 3.15), что клетки стабильно взаимодействуют с волокнами материала и однородно распределяются по материалу, что говорит о его биосовместимости и однородности его свойств при контакте с живыми объектами.

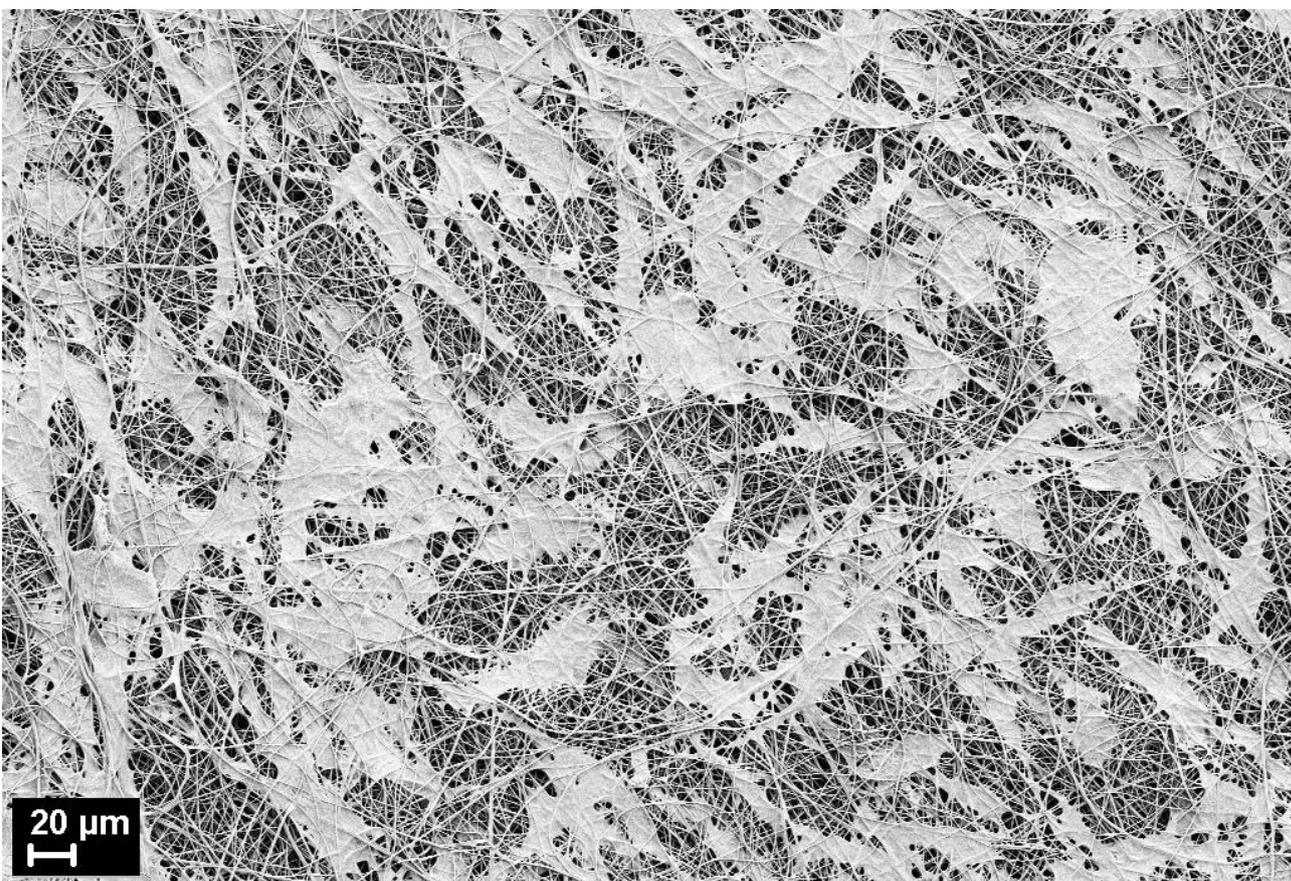


Рисунок 3.15. Адгезия дермальных фибробластов человека к поверхности нетканого полиимидного материала

Показатели выживаемости клеток при проведении МТТ-теста после трех суток культивирования на материале свидетельствуют о его нетоксичности (рис. 3.16). При оптимизации методов посева клеток на материал матрицы на его основе могут поддерживать адгезию и пролиферацию дермальных фибробластов человека.

Также показана возможность криоконсервации тканеинженерных препаратов, состоящих из нетканой матрицы и дермальных фибробластов. После размораживания таких препаратов выживаемость клеток падала по сравнению с интактными образцами, однако криоконсервированные образцы демонстрировали достаточную концентрацию живых клеток, которые были ассоциированы с матрицей. Механические свойства материала матрицы также оставались стабильными — матрица сохраняла упругость после замораживания в жидком азоте.

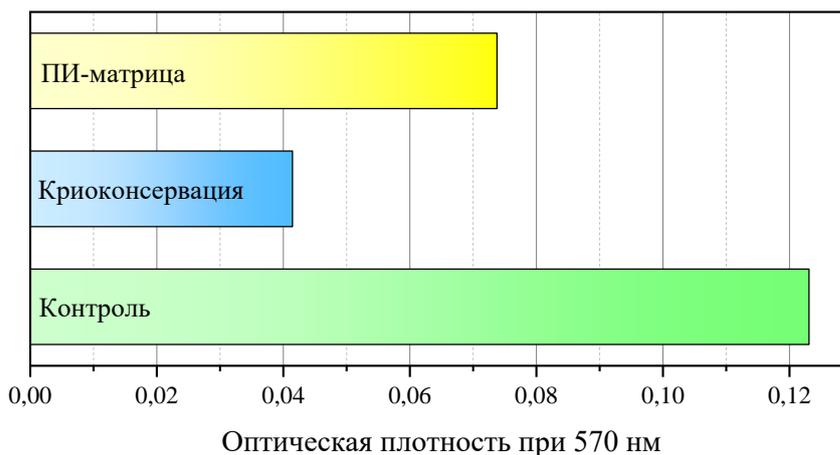


Рисунок 3.16. МТТ-тест: показатели выживаемости клеток на ПИ матрице при температуре 37°C и при криоконсервации

Также была исследована адгезия дермальных фибробластов при контакте с карбонизованными матрицами (рис. 3.17).

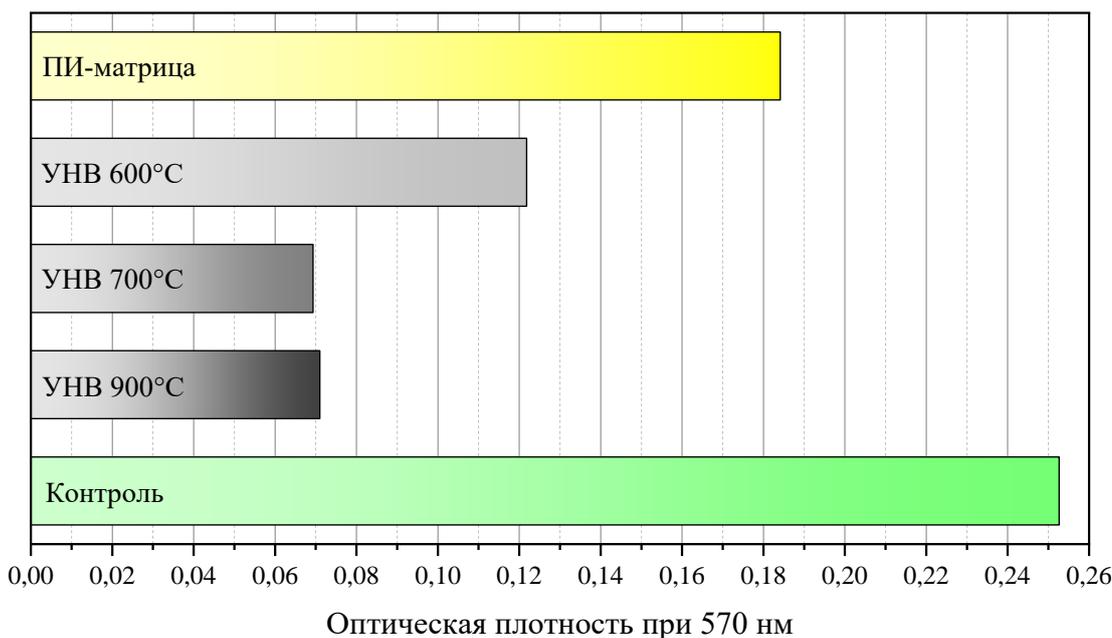


Рисунок 3.17. МТТ-тест: показатели выживаемости клеток на ПИ матрице и матрицах, карбонизованных при температуре 600, 700 и 900°C

Вероятной причиной снижения биосовместимости при увеличении температуры обработки образцов является ломкость волокон. Клетки располагаются в объеме образцов, но при с большим увеличении видны острые края и отломки волокон, которые могут ухудшать взаимодействие клеток с материалом (рис. 3.18). Для подтверждения биосовместимости углеродного материала на основе полиимида планируется провести МТТ-тест для плоских карбонизованных пленок.

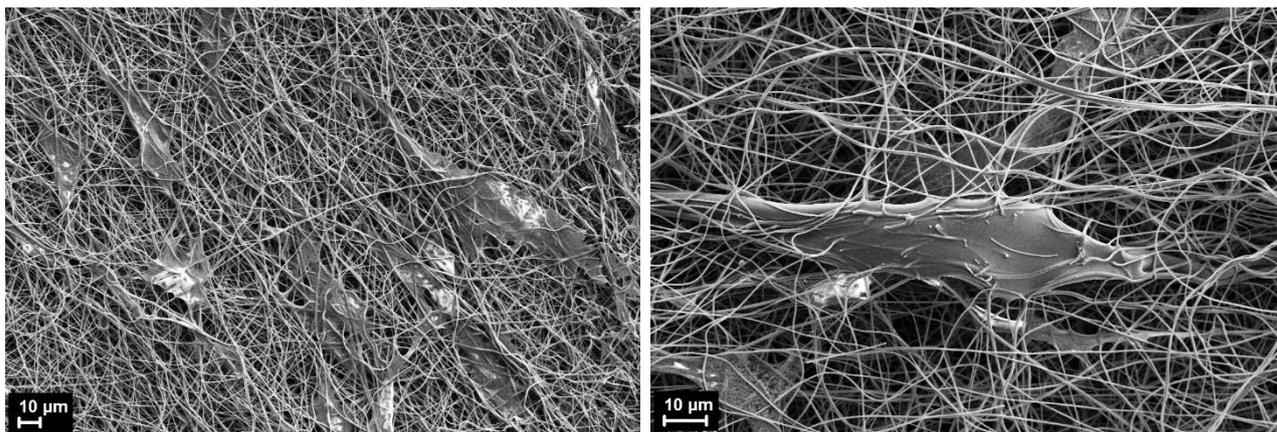


Рисунок 3.18. Адгезия дермальных фибробластов человека к поверхности нетканого углеродного материала

Причиной разрушения волокон в процессе карбонизации может быть фиксация образцов между стеклами. При термообработке значительно уменьшается площадь образцов. Будучи зафиксированными, волокна, подвергающиеся усадке, сокращаются неравномерно и повреждаются. Задача дальнейшего исследования — разработка методики карбонизации нетканых матов, позволяющей сохранить целостность волокон.

#### 3.4.2. Исследование *in vivo*

Для изучения биосовместимости и биоактивности полиимидного нетканого материала в биологической системе образцы вводили крысам субфасциально на 14 и 91 сутки.

При микроскопическом исследовании пленок из полиимида, имплантированных субфасциально на 14 сутки наблюдения (рис. 3.19), среди волокон соединительной ткани фасции выявляются крупные очаги лимфомакрофагальной инфильтрации с примесью немногочисленных гигантских многоядерных клеток

типа инородных тел. Полиимид представлен нитями бурого цвета, выявляющимися среди клеток инфильтрата.

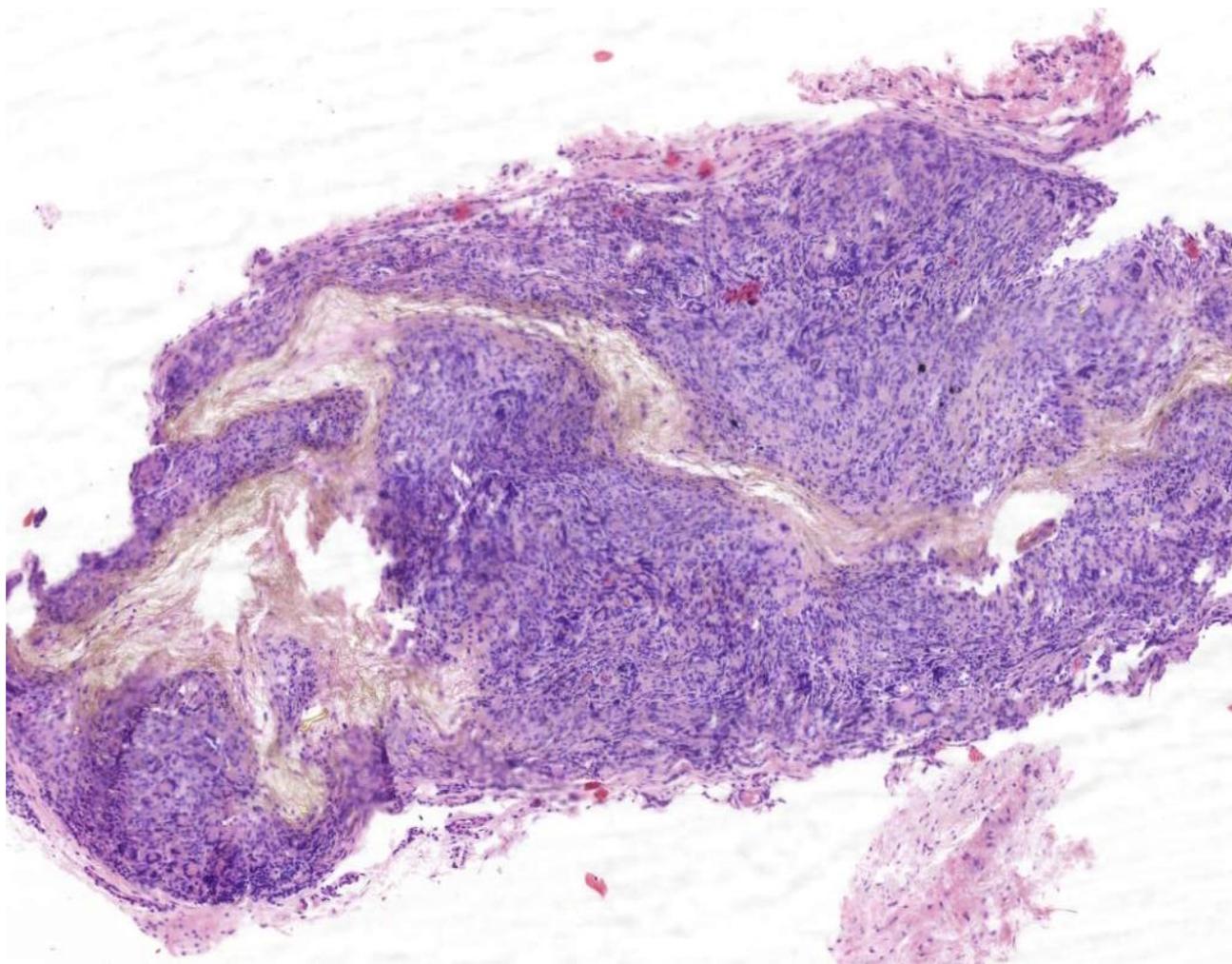


Рисунок 3.19. Лимфомакрофагальная инфильтрация на 14 сутки эксперимента (гематоксилин-эозин, увеличение  $\times 50$ )

К 91 суткам эксперимента в ткани фасции отмечается скопление бурых нитей полиимида с разрастанием грубоволокнистой соединительной ткани и крупной макрофагальной гранулемой с многочисленными гигантскими многоядерными клетками инородных тел (рис. 3.20).

Формирование соединительнотканной капсулы вокруг образца связано с нерезорбируемостью исследуемого материала. Обоснование продолжительной воспалительной реакции требует дальнейших экспериментов по исследованию биосовместимости полиимидных нетканых матов.

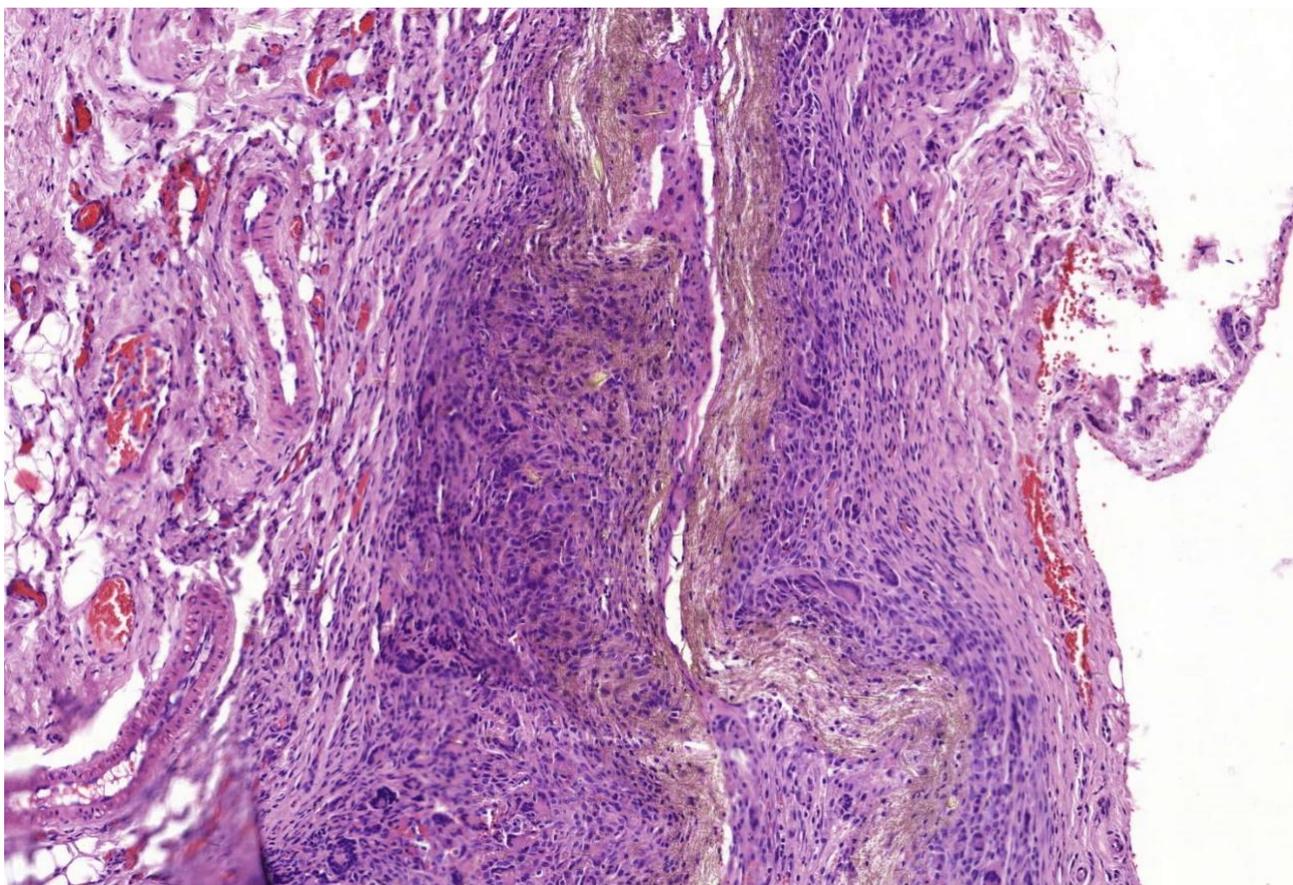


Рисунок 3.20. Макрофагальная гранулема с гигантскими многоядерными клетками инородных тел на 91 сутки эксперимента (гематоксилин-эозин, увеличение  $\times 100$ )

Возможность использования полиимидных нетканых материалов в качестве тканеинженерных сосудистых имплантов изучали в рамках эксперимента, включающего протезирование инфраренального отдела аорты крыс. Значимого кровотечения по линии анастомозов или сквозь стенку матрицы после восстановления кровотока не отмечено. В течение четырех недель эксперимента проводили наблюдение за цветом и температурой кожных покровов задних конечностей животных, их двигательной активностью.

Через четыре недели вокруг матрицы формируется соединительнотканная капсула. Импланты проходимы, не тромбируются. Целостность матрицы не нарушена, нет признаков кровотечения (рис. 3.21). Можно сделать вывод о гемосовместимости полиимидного материала и возможности его использования как тканеинженерной матрицы для протезирования сосудов.

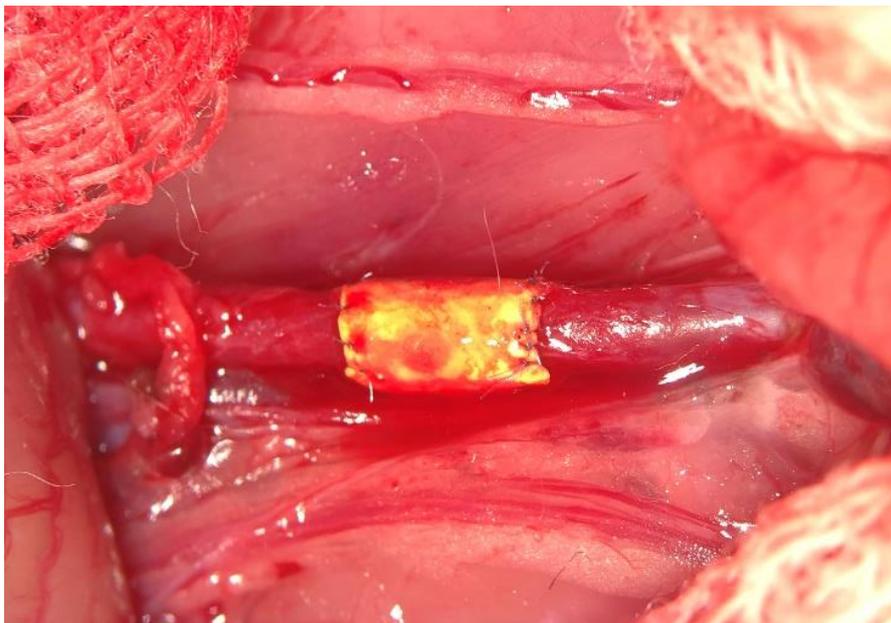


Рисунок 3.21. Тканеинженерный сосудистый имплантат после четырех недель эксперимента

Дальнейшая разработка этого направления исследования будет включать имплантацию на срок 12, 24, 48, 56 и 64 недели с гистологическим контролем и изучением состояния матрицы на каждом этапе.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данной работы были изучены свойства прекурсоров ароматических полиимидов, в частности, полиамидокислоты на основе пиромеллитового диангида и 4,4'-оксидианилина производителей «Эстроком» и «Sigma-Aldrich» и их солей на основе триэтиламина, аммиака и карбоната натрия.

Методом электроформования получены плоские и трубчатые матрицы; с учетом результатов инфракрасной спектроскопии и термогравиметрического анализа разработаны режимы имидизации и карбонизации. Изучены прочностные, электропроводящие свойства полученных матриц, их микро- и наноструктура. Сделан вывод, что оптимальная концентрация растворов форполимеров для электроформования составляет 10 мас. %.

Проведено исследование биосовместимости полученных полиимидных и углеродных нетканых материалов *in vitro* на культуре дермальных фибробластов человека. Подтверждена возможность использования рассматриваемых матриц в качестве подложек для хранения клеток, в том числе долговременного с использованием технологии криоконсервации.

Биоактивность материала в биологической системе *in vivo* оценена при субфасциальной имплантации образцов материала крысам на 14 и 91 сутки. Отмечены признаки воспалительной реакции, которые требуют дополнительных исследований безопасности материала как имплантируемого тканеинженерного объекта. Изучена возможность использования полиимидных нетканых материалов в качестве нерезорбируемых тканеинженерных сосудистых имплантов. Подтверждена гемосовместимость и достаточная прочность трубчатых образцов.

Таким образом, нетканые материалы, полученные методом электроформования на основе ароматических полиимидов, являются перспективными тканеинженерными объектами, которые могут быть использованы в различных областях тканевой инженерии и регенеративной медицины, в частности, хранении и криоконсервации клеток, получении электропроводящих матриц и использовании скаффолдов в качестве протезов кровеносных сосудов.

Дальнейшие исследования по данной теме включают эксперименты по длительному хранению замороженных тканеинженерных препаратов; доработку методики карбонизации полиимидных нетканых материалов с изучением электро-стимуляции пролиферации клеток; доработку методики получения трубчатых полиимидных нетканых материалов и долгосрочные испытания тканеинженерных сосудистых имплантов на их основе.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. ГОСТ Р ИСО 10993-2-2009. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными. 2009.
2. ГОСТ ISO 10993-6-2011. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследования местного действия после имплантации. 2011.
3. ГОСТ 33215-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур. 2014.
4. ГОСТ 33216-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами. 2014.
5. Алексеев И.С. [и др.]. Влияние технологических параметров процесса электроформования полимера и характеристик раствора на структуру и свойства нетканых материалов // Вестник витебского государственного технологического университета: Химическая технология и экология. 2015. № 29. С. 84–91.
6. Бессонов М.И. [и др.]. Полиимиды — класс термостойких полимеров / М.И. Бессонов, М.М. Котон, В.В. Кудрявцев, Л.А. Лайус, Ленинград: Наука, 1983. 328 с.
7. Добровольская И.П. [и др.]. Полимерные матрицы для тканевой инженерии / И.П. Добровольская, В.Е. Юдин, П.В. Попрядухин, Е.М. Иванькова, Санкт-Петербург: Издательско-полиграфическая ассоциация университетов России, 2016. 224 с.
8. Котон М.М. [и др.]. О влиянии природы амидного растворителя на молекулярные характеристики поли(4,4-оксидифенилен)пиромеллитамидокислоты // Высокомолекулярные соединения. 1979. № 3 (21А). С. 532–535.
9. Матреничев В.В. [и др.]. Получение нановолокон из ароматического

полиимида и материалов на их основе для клеточных технологий // *Высокомолекулярные соединения*. 2018. № 4 (60). С. 296–303.

10. Попов Г.И. Разработка и оценка эффективности тканеинженерного сосудистого имплантата на основе биodeградируемой полимерной матрицы. Санкт-Петербург, 2018.

11. Светличный В.М. [и др.]. Электроформование водных растворов триэтиламмонийной соли полиамидокислоты и свойства полиимидного нетканого материала // *Журнал прикладной химии*. 2020. № 1 (93). С. 48–58.

12. Светличный В.М. [и др.]. Синтез водорастворимых солей полиамидокислот и структурные особенности полученных из них волокон и пленок // *Высокомолекулярные соединения. Серия Б*. 2020. № 2 (62). С. 1–13.

13. Севостьянова В.В. [и др.]. Выбор оптимальных параметров электроспиннинга для изготовления сосудистого графта малого диаметра из поликапролактона // *Фундаментальные исследования*. 2014. № 10 (1). С. 180–184.

14. Уэндландт У. Термические методы анализа / У. Уэндландт, под ред. В.А. Степанов, В.А. Берштейн, 2-е изд., Москва: Мир, 1978. 527 с.

15. Филатов Ю.Н. Электроформование волокнистых материалов (ЭФВ-процесс) / Ю.Н. Филатов, под ред. В.Н. Кириченко, Москва: Нефть и газ, 1997. 297 с.

16. Хенч Л.Л., Джонс Д.Р. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей: монография / Л.Л. Хенч, Д.Р. Джонс, Москва: Техносфера, 2007. 304 с.

17. Динамический механический термический анализ. NETZSCH Gerätebau GmbH [Электронный ресурс]. URL: <https://www.netzsch-thermal-analysis.com/ru/produkty-reshenija/dinamicheskii-mekhanicheskii-termicheskii-analiz/>.

18. Acland R. Signs of patency in small vessel anastomosis // *Surgery*. 1972. № 5 (72). С. 744–748.

19. Balci D., Can A. The Assessment of Cryopreservation Conditions for Human Umbilical Cord Stroma-Derived Mesenchymal Stem Cells towards a Potential Use for

Stem Cell Banking // *Current Stem Cell Research & Therapy*. 2013. № 1 (8). С. 60–72.

20. Batnyam O., Suye S., Fujita S. Direct cryopreservation of adherent cells on an elastic nanofiber sheet featuring a low glass-transition temperature // *RSC Advances*. 2017. (7). С. 51264–51271.

21. Bit A. [и др.]. Crosstalk between substrates and rho-associated kinase inhibitors in cryopreservation of tissue-engineered constructs // *Stem Cells International*. 2017. (2017). С. 1–9.

22. Cai D. [и др.]. Synthesis, characterization and hydrolytic stability of poly(amic acid) ammonium salt // *Polymer Degradation and Stability*. 2011. (96). С. 2174–2180.

23. Dhandayuthapani B. [и др.]. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review // *International Journal of Polymer Science*. 2011. № 2 (2011). С. 1–19.

24. Ding Y. [и др.]. Electrospun polyimide nanofibers and their applications // *Progress in Polymer Science*. 2016. (61). С. 67–103.

25. Ding Y., Bikson B., Nelson J.K. Polyimide membranes derived from poly(amic acid) salt precursor polymers. 1. Synthesis and characterization // *Macromolecules*. 2002. № 3 (35). С. 905–911.

26. Fahy G.M. Vitrification as an approach to organ cryopreservation: past, present, and future / G.M. Fahy, под ред. C.T. Smit Sibinga, P.C. Das, H.T. Meryman, Norwell: Kluwer Academic Publishers, 1990. 255–268 с.

27. Ghasemi-Mobarakeh L. [и др.]. Electrospun poly( $\epsilon$ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering // *Biomaterials*. 2008. № 34 (29). С. 4532–4539.

28. Gofman I.V. [и др.]. Peculiarities of the initial stages of carbonization processes in polyimide-based nanocomposite films containing carbon nanoparticles // *Cogent Chemistry*. 2015. № 1 (1). С. 1–14.

29. Gong G., Wu J. Novel Polyimide Materials Produced by Electrospinning // *High Performance Polymers – Polyimides Based – From Chemistry to Applications*.

2012. (7). С. 127–144.

30. Gosden R. Cryopreservation: A cold look at technology for fertility preservation // *Fertility and Sterility*. 2011. № 2 (96). С. 264–268.

31. Harrison R.H., St-Pierre J.-P., Stevens M.M. Tissue engineering and regenerative medicine: A year in review // *Tissue Engineering - Part B*. 2014. № 1 (20). С. 1–16.

32. Huang Z.-M. [и др.]. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites // *Composites Science and Technology*. 2003. № 15 (63). С. 2223–2253.

33. Jiang S. [и др.]. Polyimide nanofibers by «green» electrospinning via aqueous solution for filtration applications // *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. 2016. (4). С. 4797–4804.

34. Jiang X. [и др.]. In vitro and in vivo evaluation of a photosensitive polyimide thin-film microelectrode array suitable for epiretinal stimulation // *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation*. 2013. № 48 (10). С. 1–12.

35. John Morris G., Acton E. Controlled ice nucleation in cryopreservation - A review // *Cryobiology*. 2013. (66). С. 85–92.

36. Ju Y.M. [и др.]. Bilayered scaffold for engineering cellularized blood vessels // *Biomaterials*. 2010. № 15 (31). С. 4313–4321.

37. Kankala R.K. [и др.]. Cardiac Tissue Engineering on the Nanoscale // *ACS Biomaterials Science and Engineering*. 2018. № 3 (4). С. 800–818.

38. Kannan R.Y. [и др.]. Current status of prosthetic bypass grafts: A review // *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. 2005. № 1 (74). С. 570–581.

39. Kanno M. [и др.]. Biocompatibility of fluorinated polyimide // *Journal of Biomedical Materials Research*. 2002. № 1 (60). С. 53–60.

40. Karamancheva I. [и др.]. FTIR spectroscopy and FTIR microscopy of vacuum-evaporated polyimide thin films // *Vibrational spectroscopy*. 1999. № 2 (19). С. 369–374.

41. Kuleshova L.L., Gouk S.S., Hutmacher D.W. Vitrification as a prospect for

cryopreservation of tissue-engineered constructs // *Biomaterials*. 2007. № 1 (28). С. 1585–1596.

42. Ladd M.R. [и др.]. Co-electrospun dual scaffolding system with potential for muscle-tendon junction tissue engineering // *Biomaterials*. 2011. № 6 (32). С. 1549–1559.

43. Lago N. [и др.]. Assessment of biocompatibility of chronically implanted polyimide and platinum intrafascicular electrodes // *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 2007. № 2 (54). С. 281–290.

44. Lee K.-K. [и др.]. Polyimide-based intracortical neural implant with improved structural stiffness // *Journal of Micromechanics and Microengineering*. 2004. № 1 (14). С. 32–37.

45. Li J. [и др.]. Preparation of solution blown polyamic acid nanofibers and their imidization into polyimide nanofiber mats // *Nanomaterials*. 2017. № 11 (7).

46. Liu B.L. [и др.]. Cellular response of Murine Osteoblasts to Cryopreservation: the influence of attachment to Hydroxyapatite (HA) scaffolds // *African Journal of Biotechnology*. 2006. № 21 (5). С. 2014–2019.

47. Liu W., Thomopoulos S., Xia Y. Electrospun Nanofibers for Regenerative Medicine // *Advanced healthcare materials*. 2012. (1). С. 10–25.

48. Lu W., Sun J., Jiang X. Recent advances in electrospinning technology and biomedical applications of electrospun fibers // *Journal of Materials Chemistry B*. 2014. № 17 (2). С. 2369–2380.

49. Luyet B.J. The vitrification of organic colloids and of protoplasm // *Biodynamica*. 1937. (1). С. 1–14.

50. Maeda T. [и др.]. The design of temperature-responsive nanofiber meshes for cell storage applications // *Fibers*. 2017. № 1 (5). С. 1–10.

51. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications // *The American journal of physiology*. 1984. (247). С. 125–142.

52. Mehrabi A. [и др.]. Development of a novel electroactive cardiac patch based on carbon nanofibers and gelatin encouraging vascularization // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2020. № 3 (190). С. 931–948.

53. Pham Q.P., Sharma U., Mikos A.G. Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review // *Tissue Engineering*. 2006. № 5 (12). С. 1197–1211.

54. Popryadukhin P. V. [и др.]. Tissue-Engineered Vascular Graft of Small Diameter Based on Electrospun Polylactide Microfibers // *International Journal of Biomaterials*. 2017. (2017). С. 1–10.

55. Popryadukhin P. V [и др.]. Vascular Prostheses Based on Nanofibers from Aliphatic Copolyamide // *Cardiovascular Engineering and Technology*. 2016. № 1 (7). С. 78–86.

56. Ramakrishna S. [и др.]. Electrospun nanofibers: Solving global issues // *Materials Today*. 2006. № 3 (9). С. 40–50.

57. Richardson R.R., Miller J.A., Reichert W.M. Polyimides as biomaterials: preliminary biocompatibility testing // *Biomaterials*. 1993. № 8 (14). С. 627–635.

58. Rusu R.D., Damaceanu M.D., Constantin P.C. *Intelligent Polymers for Nanomedicine and Biotechnologies* / R.D. Rusu, M.D. Damaceanu, P.C. Constantin, под ред. М. Aflori, 1-е изд., Boca Raton: Taylor & Francis, 2018. 226 с.

59. Serbezeanu D. [и др.]. Functional polyimide-based electrospun fibers for biomedical application // *Materials*. 2019. № 19 (12). С. 1–15.

60. Sill T.J., Recum H.A. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering // *Biomaterials*. 2008. № 13 (29). С. 1989–2006.

61. Starr P., Agrawal C.M., Bailey S. Biocompatibility of common polyimides with human endothelial cells for a cardiovascular microsensor // *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2016. № 2 (104). С. 406–412.

62. Thorvaldsson A. [и др.]. Electrospinning of highly porous scaffolds for cartilage regeneration // *Biomacromolecules*. 2008. № 3 (9). С. 1044–1049.

63. Zhang B.G.X. [и др.]. Recent advances in nerve tissue engineering // *International Journal of Artificial Organs*. 2014. № 4 (37). С. 277–291.

64. Zhang C. [и др.]. Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats // *European Polymer Journal*. 2005. № 3 (41). С. 423–432.

65. Zhang Q.-H., Dong J., Wu D.-Z. Advanced polyimide fibers // *Advanced*

Polyimide Materials. 2018. (2). С. 67–92.

66. Zhang Y. [и др.]. Electrospun biomimetic nanocomposite nanofibers of hydroxyapatite/chitosan for bone tissue engineering // Biomaterials. 2008. № 32 (29). С. 4314–4322.

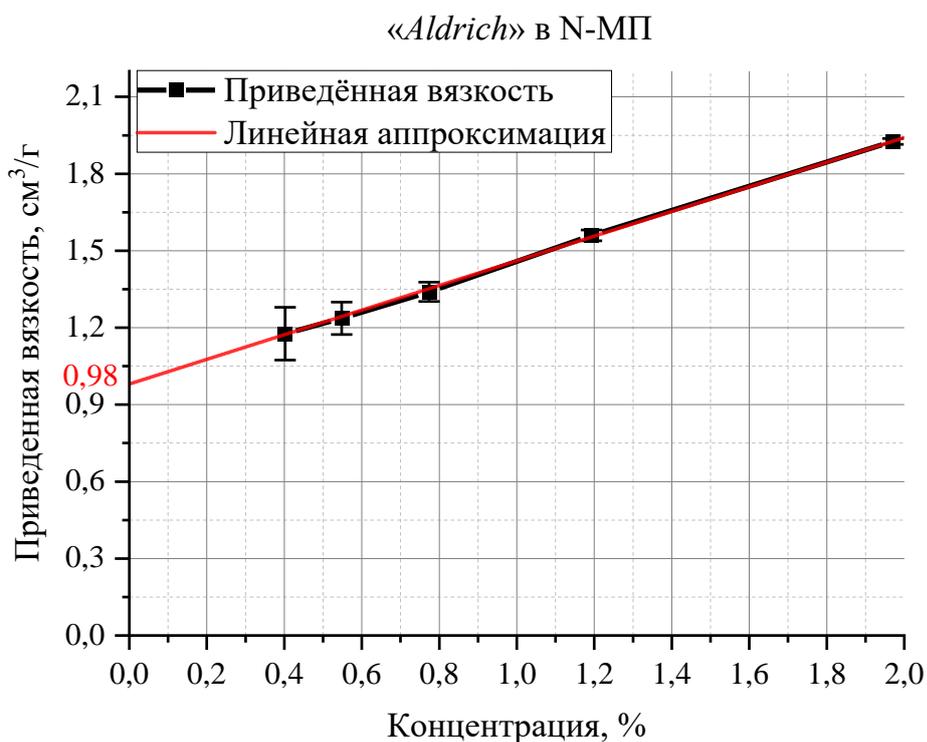
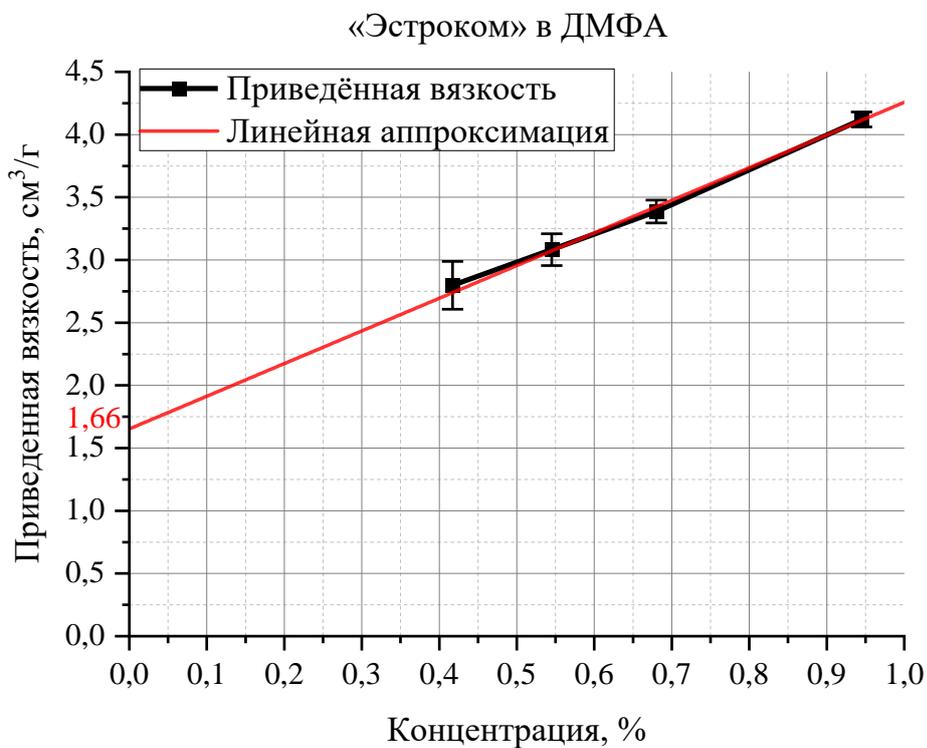
67. Zhao Q. [и др.]. A rapid screening method for wound dressing by cell-on-a-chip device // Advanced Healthcare Materials. 2012. № 5 (1). С. 560–566.

68. Zhu J. [и др.]. Highly flexible electrospun carbon/graphite nanofibers from a non-processable heterocyclic rigid-rod polymer of polybisbenzimidazobenzophenanthroline-dione (BBB) // Journal of Materials Science. 2018. № 12 (53). С. 9002–9012.

69. AATCC Test Method 76-2005. Electrical Surface Resistivity of Fabrics. 2005.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1. ВИСКОЗИМЕТРИЯ ПОЛИАМИДОКИСЛОТЫ

Графики приведенной вязкости ПАК на основе ПМ ДА-ОДА производителей «Эстроком» и «*Sigma-Aldrich*» в зависимости от концентрации раствора (вискозиметрический метод определения молекулярной массы).



## ПРИЛОЖЕНИЕ 2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ВОЛОКОН ПО ДИАМЕТРАМ

Гистограммы распределения волокон по диаметрам, сгруппированные слева по концентрации прядильного раствора: 8, 10 и 12 мас. %, справа по имидизации: до (СПАК) и после (ПИ).

