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

Работа допущена к защите

Директор высшей школы

_____ О.Л. Власовой

«___»_____2020 г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И КИНЕТИКИ РЕЗОРБЦИИ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИ(L-ЛАКТИДА) И ПОЛИ(ε-КАПРОЛАКТОНА)

по направлению подготовки (специальности) 16.04.01: Техническая физика

Направленность (профиль) 16.04.01_10 Медицинская биотехнология

Выполнила

студентка гр.4741601/81001 _____ Н.А. Завражных

Руководитель

профессор ВШБСиТ ИБСиБ,

д.ф.-м. н., доцент _____ В.Е. Юдин

Консультант

по нормконтролю _____ В.П. Октябрьский

Санкт-Петербург

2020

РЕФЕРАТ

На с. 83, 30 рисунков, 6 таблиц, 2 приложения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ПОЛИ(L-ЛАКТИД), ПОЛИ(ε-КАПРОЛАКТОН), ЭЛЕКТРОФОРМОВАНИЕ, МИКРОВОЛОКНА, СТРУКТУРА, КИНЕТИКА РЕЗОРБЦИИ

Тема выпускной квалификационной работы: «Сравнительное исследование структуры и кинетики резорбции материалов на основе поли(L-лактида) и поли(ε-капролактона)».

Работа посвящена исследованию структуры и свойств материалов, полученных методом электроформования, из растворов поли(L-лактида) и поли(ε-капролактона), а также кинетике их резорбции в живом организме для дальнейшего использования в сосудистой хирургии. Были получены трубчатые образцы на основе микро- и нановолокон из поли(L-лактида) и поли(ε-капролактона), проведены исследования структуры с помощью рентгеноструктурного анализа и дифференциально-сканирующей калориметрии, оценены деформационно-прочностные свойства.

Для изучения пролиферативной активности клеток на полученных образцах были проведены исследования *in vitro*. Результаты показали высокую пролиферативную активность клеток, первичной культуры дермальных фибробластов человека, на поверхности матриц из микроволокон поли(L-лактида) и поли(ε-капролактона).

Эксперименты в условиях *in vivo* позволили оценить процессы резорбции при внутрибрюшинном введение в кровеносное русло, внутримышечном и субфасциальном. Результаты опытов продемонстрировали положительную динамику использования нановолоконных матриц на основе поли(L-лактида) и поли(ε-капролактона) в качестве биорезорбируемых имплантатов при лечение сердечно-сосудистых заболеваний.

Таким образом, в результате данной работы были получены матрицы на основе микро- и нановолокон из поли(L-лактида) и поли(ε-капролактона), а

также комбинированные матрицы на основе этих полимеров для сосудистой хирургии. Проведено исследование их структуры и деформационно-прочностных свойств.

ABSTRACT

83 pages, 30 figures, 6 tables, 2 appendice.

KEYWORDS: POLY(L-LACTIDE), POLY(ε-CAPROLACTONE), ELECTROSPINNING, MICROFIBERS, STRUCTURE, RESORPTION KINETICS

The theme of the final qualification work: «A comparative study of the structure and kinetics of resorption of materials based on poly(L-lactide) and poly(ε-caprolactone)».

The work is devoted to the study of the structure and properties of materials obtained by electrospinning from solutions of poly(L-lactide) and poly(ε-caprolactone), as well as the kinetics of resorption in a living organism for further use in vascular surgery. Tubular samples based on micro- and nanofibers made of poly(L-lactide) and poly(ε-caprolactone) were obtained, structural studies were performed using X-ray diffraction analysis and differential scanning calorimetry, and the deformation-strength properties were evaluated.

In vitro studies were performed to study the proliferative activity of cells in the obtained samples. The results showed a high proliferative activity of cells, the primary culture of human dermal fibroblasts, on the surface of poly(L-lactide) and poly(ε-caprolactone) microfibres.

In vivo experiments allowed us to evaluate the processes of resorption with intraperitoneal injection into the bloodstream, intramuscular and subfascial. The results of the experiments demonstrated the positive dynamics of the use of nanofiber matrices based on poly(L-lactide) and poly(ε-caprolactone) as bioresorbable implants in the treatment of cardiovascular diseases.

Thus, as a result of this work, matrices based on micro- and nanofibers from poly(L-lactide) and poly(ε-caprolactone) were obtained, as well as combined matrices based on these polymers for vascular surgery. The study of their structure and deformation-strength properties.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК АББРЕВИАТУРЫ 8
НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ 9
ВВЕДЕНИЕ 10
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 13
1.1. Патофизиология сердечно-сосудистых заболеваний 13
1.2. Целесообразность использования тканеинженерных материалов в лечение сердечно-сосудистых заболеваний 14
1.3. Эндопротезы на основе биодеградируемых полимеров для сосудистой хирургии 15
1.4. Структура материалов на основе микро- и нановолокон из полилактида 20
1.5. Структура и свойства материалов на основе микро- и нановолокон из поли(ε-капролактона) 22
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 25
2.1. Материалы 25
2.1.1. Поли(L-лактид) 25
2.1.2. Поли(ε-капролактон) 26
2.1.3. Растворитель 27
2.1.4. Лабораторные животные 27
2.1.4.1. Лабораторные животные для оценки резорбции материалов в мышечной ткани и фасции 27
2.1.4.2. Лабораторные животные для имплантации материалов в кровеносное русло 28
2.2. Методы 29
2.2.1. Приготовление растворов 29
2.2.2. Измерение плотности растворов 29
2.2.3. Измерение коэффициента поверхностного натяжения 30

2.2.4. Измерение электропроводности растворов 31
2.2.5. Реологические исследования 32
2.2.6. Получение материалов на основе нано- и микроволокон методом электроформования 32
2.2.7. Дифференциальная сканирующая калориметрия 34
2.2.8.Метод рентгеноструктурного анализа 35
2.2.9. Сканирующая электронная микроскопия 35
2.2.10. Исследование деформационно-механических характеристик 36
2.2.11. Исследование цитотоксичности в условиях in vitro 37
2.2.12. Исследование в условиях in vivo 38
2.2.12.1. Исследование процессов резорбции при внутримышечном и субфасциальном введении 38
2.2.12.2. Исследование процессов резорбции и образования новых тканей на основе полимерной матрицы, имплантированной в кровеносное русло 39
2.2.13. Гистологические исследования 40
2.2.13.1. Гистологическое исследование процессов резорбции при внутримышечном и субфасциальном введении 40
2.2.13.2. Гистологическое исследование процессов резорбции и образования новых тканей на основе полимерной матрицы, имплантированной в кровеносное русло 41
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ 43
3.1. Исследование свойств растворов 43
3.1.1. Коэффициент поверхностного натяжения 43
3.1.2. Электропроводимость растворов из полилактида и поли(ε-капролактона) 44
3.1.3. Реологические свойства растворов 44
3.2. Получение материалов методом электроформования 47
3.3. Исследование свойств материалов из полилактида и поли(ε-капролактона) 49

3.3.1. Рентгеноструктурный анализ 49
3.3.2. Дифференциальная сканирующая калориметрия 54
3.3.3. Деформационно-прочностные характеристики 57
3.4. Результаты испытаний in vivo и in vitro 61
3.4.1. Результаты исследования материалов в условиях in vitro 62
3.4.2. Результаты исследований материалов в условиях in vivo 63
3.4.2.1. Результаты исследования процессов резорбции при внутримышечном и субфасциальном введении 63
3.4.2.2. Исследование процессов резорбции и образования новых тканей на основе полимерной матрицы, имплантированной в кровеносное русло 66
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 71
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 73
Приложение 1. Фотографии материалов из полилактида и поли(ε-капролактона) при имплантации внутримышечно и субфасциально 82
Приложение2. Проведение операции по имплантации материала в сосудистое русло 83

СПИСОК АББРЕВИАТУРЫ

ПЛА - полилактид

ЭФ - электроформование (электроспиннинг)

ДСК - дифференциальная сканирующая калориметрия

СЭМ - сканирующая электронная микроскопия

МТТ тест - основан на способности живых клеток восстанавливать МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н- тетразолий бромид) до фиолетового кристаллического формазана

ПКЛ - поли(ε-капролактон)

ССС - сердечно-сосудистая система

ПГБ - полигидроксибутират

PGL - полигликолевая кислота

НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ

ГОСТ Р ISO 10993-1-2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка и исследования.

ГОСТ Р ISO 10993-2-2009 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2.Требования к обращению с животными.

ГОСТ ISO 10993-4-2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 4. Исследования изделий, взаимодействующих с кровью**.**

ГОСТ ISO 10993-6-2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследования местного действия после имплантации.

ГОСТ 33215-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур (Переиздание).

ГОСТ 33216-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами (Переиздание).

ВВЕДЕНИЕ

Заболевания сердечно-сосудистой системы в настоящее время занимают лидирующую позицию среди причин смертности в мире. Основным из методов лечения является замена пораженного участка сосуда с помощью протезирования или шунтирования. В качестве заменяемого материала используют аутотрансплантанты или синтетические протезы. Однако, применение синтетических имплантатов ограничено диаметром не менее 5 мм [73][35].

Цель тканевой инженерии - восстановление поврежденного органа в результате травм или болезней. При помещении в живой организм тканеинженерной конструкции происходит ее резорбция и регенерация нативной ткани органов. На данный момент успешное применение в качестве синтетических материалов нашли биодеградируемые полимеры. Как показали исследования [14][23][57][47][55], широкое использование нашли материалы из полилактида и поликапролактона. Изделия из данных полимеров применяются в медицине в качестве шовных материалов, имплантатов костной ткани, скоб, штифтов и т.д.

Важной характеристикой для материалов и продуктов резорбции является отсутствие токсического эффекта на окружающие ткани, а следовательно, и на организм в целом. К следующему критерию относится скорость резорбции, которая должна быть сопоставима со скоростью образования новой ткани. Также, искусственный материал должен соответствовать биологическим и деформационно-механическим свойствам сосудов, то есть полноценно воспроизводить работу замененного участка.

В настоящее время существует много способов получения тканеинженерных конструкций, например, методом экструзии из расплава, 3D-принтинг, метод мокрого формования и так далее. Но наиболее технологичным является метод электроформования, поскольку он позволяет получать пористые материалы, не только с требуемым размером пор и волокон, но и формы, в виде трубок [65][4][76]. Тканеинженерные конструкции на основе микро- и нановолокон

могут использоваться в качестве матрицы для лечения сердечно-сосудистых заболеваний [58][59].

В процессе жизнедеятельности организма сосуды испытывают высокие динамические нагрузки. Поэтому для успешного использования трубок в сосудистой хирургии необходим определенный уровень их прочностных и деформационных характеристик. Эти свойства зависят как от надмолекулярного строения отдельных волокон, размеров кристаллитов и наличия ламеллярных или фибриллярных образований, так и от макроструктуры образца – диаметра волокон, их ориентации относительно оси трубки.

Целью данной работы являлась разработка способа получения трубчатых материалов методом электроформования из поли(L-лактида) и поли(ε-капролактона) с последующим исследованием их структуры и кинетики резорбции. Для достижения поставленной цели необходимо было выполнить ряд задач:

1) Исследовать характеристики растворов поли(L-лактида) и поли(ε-капролактона) в хлороформе, а именно вязкость, плотность, поверхностное натяжение и электропроводимость.

2) Разработать способ получения пористых трубок на основе нановолокон из поли(L-лактида) и поли(ε-капролактона).

3) Исследовать структуру трубчатых образцов из поли(L-лактида) и поли(ε-капролактона) и их деформационно-прочностные свойства.

4) Исследовать цитотоксичность материалов из поли(L-лактида) и поли(ε-капролактона) в условиях *in vitro*.

5) Провести испытания *in vivo* трубчатых образцов в качестве имплантатов кровеносных сосудов, оценить кинетику их резорбции, а также эффективность использования трубчатых образцов в сосудистой хирургии.

6) Провести сравнительный анализ полученных данных.

Работа была выполнена на базе научно-исследовательской лаборатории "Полимерные материалы для тканевой инженерии и трансплантологии" Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого.

Результаты работы были представлены на конференциях всероссийского уровня с международным участием, таких как «Неделя науки СПбПУ» [8][10], «Физика – наукам о жизни» [9], всероссийской научно-практической конференции «Научные исследования и разработки в области дизайна и технологий» [7], на пятнадцатой международной Санкт-Петербургской конференции молодых ученых «Современные проблемы науки о полимерах» [72], а также на международной конференции EUPOC 2019 «Electrospinning and related techniques: from design to production of advanced polymer materials and device», 12-16 мая 2019, Como (Италия) [52]. По результатам работы опубликована статья в журнале Высокомолекулярные соединения [5].

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Патофизиология сердечно-сосудистых заболеваний

Заболевания сердечно-сосудистой системы занимают первое место в статистике смертности в мире. Ежегодно от патологий сердечно-сосудистой системы умирает около 17.9 млн человек - это около 31% всех смертей [77]. В США по статистике на 2017 год каждые 37 секунд умирает один человек от сердечно-сосудистых заболеваний и это составляет примерно 1 смерть на 4 человека [78].

Существует много факторов риска возникновения заболеваний сердца и системы, например, курение, высокий уровень холестерина, высокое артериальное давление, ожирение и избыточный вес, неправильная диета и малоподвижный образ жизни, и так далее.

Наибольший процент среди заболеваний сердечно-сосудистой системы по статистическим данным занимают такие болезни как атеросклероз, ишемическая болезнь и порок сердца, гипертоническая болезнь, инсульты и инфаркты.

Широкое распространение среди развитых стран Европы и Америки имеют заболевания артериосклерозом. Артериосклероз — это хроническое заболевание артерий, характеризующееся диффузным утолщением стенок и образованием бляшек. Происходит уплотнение стенки артерии, теряется эластичность, происходит сужение или расширение просвета и артерия принимает извилистый ход.

Различают следующие виды артериосклероза в зависимости от этиологических, патогенетических и морфологических признаков:

1) атеросклероз (метаболический артериосклероз);

2) артериосклероз, или гиалиноз (при гипертонической болезни);

3) воспалительный артериосклероз (сифилитический, туберкулезный);

4) аллергический артериосклероз (при узелковом периартериите);

5) токсический артериосклероз (адреналиновый);

6) первичный кальциноз средней оболочки артерий;

7) возрастной артериосклероз [18].

При нарушении липидного обмена преимущественно поражается внутренняя оболочка артерии. Поражение сосуда мышечного типа происходит при отложениях в стенки артерии извести - кальцинозе. Заболевания мельчайших артерий свойственно гиалиновое поражение стенки сосуда. Важной формой в клинической медицине является атеросклероз, так как он поражается крупные жизненно важные артерии и сосуды мозга.

В настоящее время, решением проблемы связанной с патологией ССС является оперативное вмешательство - выполняется протезирование или шунтирование пораженных сосудов. Подобного рода хирургические вмешательства требует пластичный материал, который воспроизводил бы функции замененного участка сосуда [41].

В качестве имплантатов в сосудистой хирургии используют ксенопротезы, аутотрансплантаты, синтетические протезы из природных или синтетических материалов, децеллюлязированные матрицы, материалы, полученные с помощью 3D-принтинга [38][30]. У имплантатов природного происхождения (ксенопротезов, аллотрансплантатов) существует ряд недостатков, в частности, иммунологическая несовместимость, трудности получения и хранения матриц, несовпадение размеров матрицы и заменяемого органа, возможность изменения размеров имплантата со временем, а также отсутствие подходящего трансплантата в результате болезней или травм. Материалы, полученные искусственным путем, лишены части этих дефектов, что способствует восстановлению кровеносного русла.

1.2. Целесообразность использования тканеинженерных материалов в лечение сердечно-сосудистых заболеваний

Тканевая инженерия начала развиваться как наука еще в конце XX века и является в настоящее время перспективным способом замены и лечения поврежденных органов и тканей с целью их дальнейшего восстановления. Данное

направление включает в себя такие дисциплины как физику, цитологию, медицину, молекулярную биологию, что позволяет исследовать поставленную проблему с разных сторон.

Тканеинженерные материалы получают как из природных, так и синтетических полимеров. В настоящее время наибольший интерес представляют биодеградируемые полимеры. Кинетика резорбции таких веществ в среде организма должна соответствовать скорости образования новых тканей. Быстрая или медленная скорость резорбции приводит к образованию дефектов различной формы и размеров, например, аневризм, тромбоза, стеноза и другие. Стоит отметить, что скорость деградации матриц (или по-английски «скаффолдов»), то есть материалов-носителей клеток, зависит не только от состава, но и от способа получения этих матриц.

Одним из подходов получения трехмерной матрицы для лечения сосудистых заболевания является метод электроформования. Данный метод позволяет получать пористые волоконные материалы разного диаметра из растворов полимеров. Скаффолды, полученные таким способом, можно модифицировать с помощью лекарственных веществ, факторов роста или клеток для того, чтобы увеличить совместимость с организмом и скорость регенерации тканей.

Среди преимуществ скаффолдов с микро- и нановолоконной структурой в сосудистой трансплантологии выделяют высокую пористость, что является благоприятным фактором для пролиферации клеток и прорастания коллагеновых и эластических волокон, а также хорошие механические свойства. Также, с такими материалами удобно проводить хирургические манипуляции.

1.3. Эндопротезы на основе биодеградируемых полимеров для сосудистой хирургии

История развития протезирования сосудов начинается в конце XIX века. В качестве первых попыток в 1882 году были применены трубки из металлов и костей для соединения артерий. Однако, замена сосудов искусственными кон-

струкциями из различных материалов, например, из слоновой кости, стекла, внутренняя поверхность которого покрыта парафином, полиэтилена, серебра, перьев птиц и прочее, свелась только к экспериментальным исследованиям. В середине XX века объектом изучения стали пористые матрицы на основе природных и синтетических полимеров для замены артерий и вен.

К природным биодеградируемым полимерам относят хитин, коллаген, хитозан, желатин, фиброин шелка [6], а также полимеры бактериального происхождения, например полигидроксиалканаты [19][20]. Среди синтетических биодеградируемых полимеров широкое применение в медицине нашли полилактиды, полигликолиды, поликапролактон и их сополимеры [43][70].

Фиброин шелка является гетеродимером, который состоит из двух полипептидных цепей (легкой Fib-L и тяжелой Fib-H), ковалентно связанных дисульфидными связями. Его получают из коконов шелкопряда вида Bombyx mori. Фиброин кристаллизуется под воздействием алифатических спиртов, концентрированных растворов солей, при изменение pH, а также при высоких температурах. Сохранение формы и целостности тканеинженерных матриц, их стабильность в водных растворах в течение длительного времени обеспечивает насыщенная β-структурами форма белка [1]. Материалы на основе фиброина шелка, полученные методом электроформования, обладают высокой пористостью, подходящими механическими и морфологическими свойствами. Они показали высокую совместимость в экспериментах in vitro и in vivo, хорошую пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток, отсутствие тромбоза и аневризм. На основе фиброина можно получать синтетические сосуды малого диаметра, что демонстрирует эффективность использования для регенерации кровеносных сосудов [22].

Среди биополимеров выделяют спидроин - каркасный шелк, синтезируемый пауками. Каркасный шелк уникален тем, что его нити являются очень эластичными, прочными (по величине сопоставимы с такими волокнами, как Армос и Кевлар и существенно превышают прочность стали), также он устойчив к

внешним факторам, биосовместим и деградируем. Спидроин состоит из двух белков: спидроина 1, кодируемого геном MASP1, и спидроина 2, кодирующийся геном MASP2. Спидроин 1 образует кристаллическую β-складчатую структуру макромолекулы и отвечает за прочность материала, спидроин 2 - аморфная часть и характеризует эластичность. Причем четких границ между кристаллическими доменами и аморфным матриксом не наблюдается и макромолекула способна к структурным переходам, изменяя тем самым степень кристалличности [22]. Матрицы из спидроина способны поддерживать динамический рост клеток, прорастание ткани в матриксе. Через 8 недель при подкожной имплантации наблюдается полная деструкция образцов, образование мягких соединительных тканей и нервных волокон [56].Тканеинженерные матрицы из спидроина можно использовать для замены костной, сосудистой, нервной и других тканей.

Еще одним широко применяемым природным полимером является коллаген. В основном его используют в качестве добавки и улучшения свойств матрицы. В большинстве случаев используют коллаген I типа, поскольку по своему химическому составу и молекулярной структуре считается оптимальным для исследования в условиях in vitro и in vivo. Коллаген относится к структурным белкам и имеет большую нативную поверхность по сравнению с другими синтетическими материалами. Существует ряд проблем, связанных с антигенностью и иммуногенностью данного полимера. Однако показано, что при использовании коллагена в соединении с другими полимерами снижается риск отторжения матриц и возникновения воспалений [54]. Широкое применение для укрепления сосудистых графтов, для увеличения количества прикрепленных клеток и их пролиферации, а также уменьшения риска отторжения используют денатурированный коллаген - желатин [26].

Среди биодеградируемых природных полимеров выделяют хитозан. Он является аминополисахаридом 2-амино-2-дезокси-b-D-глюкана, который образуется при деацетилировании хитина. Хитозан отличается хорошими сорби-

рующими свойствами и способностью к связыванию органических водорастворимых веществ, а также обладает слизисто-адгезивными и антимикробными свойствами. Данный полимер относится к экологически чистому материалу, так как расщепляется до N-ацетил-D-глюкозамина и D-глюкозамина за счет ферментов - хитиназы и хитобиазы. На основе хитозана получают раневые покрытия, шовный материал. Особое внимание уделено применению хитозана для получения матриц для сосудистой хирургии. Структурное сходство полимера с гликозаминогликанами, являющихся компонентами внеклеточного матрикса, делает перспективным для использования в качестве сосудистых имплантатов [22][33][25].

Полигликолевая кислота (PGL) - биоразлагаемый, термопластичный, гидрофильный полимер, относящийся к группе линейных алифатических полиэфиров. PGL способен присоединять дополнительные химические цепочки, благодаря чему данный полимер приобретает новые свойства, а следовательно и расширяется диапазон его применения. PGL деградирует в течение 2-4х недель до углекислоты и воды, чем обусловлена быстрая потеря механических свойств тканеинженерных конструкций. В результате быстрой резорбции полимера происходит резкое увеличение pH окружающих тканей, что может привести к негативным последствиям, если имеются нарушения в метаболизме и буферных функциях. В настоящее время PGL широко используют в качестве шовного материала. Полигликолевая кислота обладает электропроводящими свойствами, что делает его перспективным материалом для получения матриц методом электроформования [22][5][50][3].

Поликапролактон биоразлагаемый высокоэластичный материал, деградирующий в течение 3 лет. Он устойчив к воде, различным маслам и ряду растворителей, легок в переработке. Синтетический ПКЛ нетоксичен, био - и гемосовместим, обладает хорошими механическими и прочностными свойствами. Недостатком ПКЛ является выраженная гидрофобность, которая замедляет рост и пролиферацию клеток на поверхности матриц [2]. Для улучшения адге-

зии на матрицах из PCL и снижения их жесткости наносят различные белковые модификации, например, такие, как сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), фактор роста фибробластов (bFGF) и так далее [26][17][16][3].

Полилактид - алифатический полиэфир, мономерное звено которого молочная кислота. В структурной молекуле содержится дополнительная метильная группа, в результате чего ПЛА имеет более выраженные гидрофобные свойства, чем PGL. Для молекулы молочной кислоты характерна зеркальная симметрия, поэтому выделяют две стереоизомерные формы — это D-PLA и L-PLA. Стереоизомер L-PLA представляет частично кристаллическую структуру с высокой механической прочностью и его синтез возможен из природных продуктов, содержащих L-молочную кислоту [26]. В работах [14][59] показана эффективность использования матриц из поли(L-лактида) в качестве имплантата в сосудистой хирургии в опытах на крысах. Наблюдается отсутствие тромбообразования и обильная пролиферация клеток.

Полилактид и поликапролактон относятся к семейству алифатических полиэфиров и одобрены управлением по контролю за продуктами и лекарствами (FDA) для использования в организме человека.

Одними из перспективных полимеров являются вещества бактериального происхождения - полиоксиалканоаты, а именно полиоксибутираты (полимеры β-оксимасляной кислоты). Данные полимеры имеют разнообразную структуру и физико-химические свойства в зависимости от химического состава. Полигидроксибутират схож по свойствам с полиэтиленом и полипропиленом. Весьма важное отличие ПГБ - это его биосовместимость и биодеградируемость, а также нетоксичность. Материалы на основе ПГБ удобны при стерилизации и их использовании в водных растворах [22]. Однако, в силу «бактериального происхождения» ПГА весьма трудно добиться стандартизации этого полимера по таким важным характеристикам как молекулярная масса и полидисперсность, что, соответственно, сказывается и на стандартизации его физических и био- свойств, ограничивающих пока его широкое применение в медицине.

Также создаются композиционные матрицы из нескольких полимеров для улучшения качества тканеинженерного материала. Экспериментальное исследование деградации материалов из ПГБ+ПЛА и ПГБ+ПКЛ, полученных методом электроформования, доказывает отсутствие токсического эффекта на организм и быстрые сроки деградации за счет пористой структуры образцов [20]. Для скаффолдов из ПГБ+ПЛА через 30 суток характерна рыхлая структура и отсутствие границы между матрицей и фиброзной оболочкой. Скорость деградации материалов из ПГБ+ПКЛ проходит медленнее, то есть ПКЛ замедляет сроки резорбции.

Сополимер PLCL, состоящий из звеньев ПЛА и ПКЛ, обладает хорошими прочностными свойствами. Так как имплантат для замены сосуда должен выдерживать высокое давление, большую скорость кровотока и обладать эластичностью, то PLCL является одним из перспективных сополимеров для тканевой инженерии [26].

Существующие на данный момент сосудистые имплантаты малого диаметра содержат в своем составе недеградируемые полимеры, такие как полиэтилентерефталат, политетрафторэтилен и полиуретаны. Таким образом поиск новых матриц для тканевой инженерии играет важную роль для сосудистой хирургии. В качестве биодеградируемого материала можно использовать ПЛА и ПКЛ, так как они имеют высокие механические свойства и не уступают по свойствам нативному сосуду.

1.4. Структура материалов на основе микро- и нановолокон из полилактида

Кинетика резорбции полимеров в активных средах зависит от надмолекулярной структуры, механических нагрузок, характеристик кристаллической структуры [15].

ПЛА является частично-кристаллическим полимером. Для него характерны две кристаллические модификации, α и β [45][29][38]. При нагревании и

растяжение ПЛА происходит превращение кристаллитов из α формы в β. Авторами работы [45] показано, что невытянутые волокна имеют α-структуру и псевдоромбические ячейки с параметрами a = 10.62, b = 6.11, c = 28.79 Å. Вытяжка волокон при высоких температурах приводит к образованию β-структуры с параметрами элементарной ячейки a = 10.31, b = 18.21 и c = 9.00 Å. Стоит отметить, что спиральные конформации l0/3 и 3/1 α и β цепей имеют примерно равные энергии упаковки. Хотя и наблюдается сходство между двумя кристаллическими модификациями, α и β формами, но переход между ними становится возможным только при воздействии температуры и растягивающих напряжений. В работе [45] продемонстрировано, что α-структура характеризуется кристаллитами со сложенными цепями и имеет ламеллярное строение, а β-структура фибриллярное.

При получении волокон из ПЛА методом экструзии следует учитывать скорость вытяжки и температуру. Авторами работы [60] были получены волокна прочностью σ = 2.3 ГПа при температуре вытяжки T = 191 ^{o}C. Исследование структуры волокон с помощью рентгеновского и калориметрического анализа показало, что на прочностные параметры оказывают влияние обе кристаллические модификации [53]. Однако, связь между количеством α- или β-структуры и прочностью волокон не доказана. Предположено, что на соотношение α и β структур оказывают влияние как условия получения волокон, так и их морфология. Так, увеличение числа переплетений между соседними ламелями препятствует полному превращению ламеллярной структуры в фибриллярную с удлиненной элементарной ячейкой.

Важным параметром, влияющие на качество микроволокон при получении из расплава методом электроформования, является температура как фильеры, так и зоны формования [75]. С помощью высокоскоростной фотосъемки выявлено, что, если температура в зоне формования микроволокна ниже температуры стеклования полимера, то разделение струи подавляется быстрым осаждением полимера в зоне формования. Разница в температурах нарушает процесс

вытяжки микроструй, что приводит к увеличение диаметра волокон. Однако, изменение химической структуры ПЛА не наблюдается. В результате высокой скорости перехода расплава в твердое состояние, волокна из ПЛА имели преимущественно аморфную структуру, а также отмечалось небольшое присутствие в них β-кристаллов. Кристаллизация полимера при температуре около 95 °С имеет зависимость от ориентации макромолекул ПЛА и условий термообработки волокон.

Влияние температуры на формирование кристаллической структуры ПЛА продемонстрировано в работе [44]. Обработка материалов из ПЛА в течение 2 часов при температуре 90 °С приводит к образованию ламеллярных кристаллитов и отсутствию перехода в сферолиты.

Однако, структура микро- и нановолокон, полученных методом электроформования и влияние термической обработки на их структуру и свойства остаются малоизученными.

1.5. Структура и свойства материалов на основе микро- и нановолокон из поли(ε-капролактона)

Тщательному исследованию ПКЛ особое внимание было уделено с 1980-х годов. Структура материалов из ПКЛ и его сополимеров хорошо изучена в качестве шовного материала, системы доставки веществ и так далее. Тканеинженерные материалы из ПКЛ используют для замещения различных тканей: хрящей [48][49], кровеносных сосудов [67], костной [46][63][61] и сердечно-сосудистой тканей, сухожилий, нервов [66] и так далее.

ПКЛ как и ПЛА относится к аморфно-кристаллическим полимерам, но в отличии от ПЛА имеет низкую температуру плавления около 60 °С и температуру стеклования около -60 °С [24]. Низкая температура стеклования и особенности структуры позволяют достичь высокой эластичности материалов из ПКЛ [21]. Однако, низкая температура плавления затрудняет производство тканеинженерных матриц и требует разработки определенных способов получения ка-

чественных материалов. В работе [32] отмечено, что на химические свойства влияет степень полимеризации ПКЛ, следовательно, происходит изменение и таких свойств, как кристалличность, скорость деградации, растворимость и далее. Модифицировать материалы из ПКЛ можно не только использованием синтетических полимеров, но и природных, например, крахмала, гидроксиапатита, хитозана, желатина [24].

Согласно литературным данным выделяют два этапа процесса резорбции ПКЛ: на первом этапе происходит ферментативное гидролитическое расщепление сложноэфирных групп, а на втором, полимер подвергается внутриклеточным разрушениям с помощью макрофагов и гигантских клеток фибробластов [71]. Негативным фактором, влияющий на пролиферацию клеток и уменьшение биосовместимости ПКЛ, является его низкая поверхностная энергия, связанная с гидрофобностью материала [69].

С помощью рентгеновского исследования была продемонстрирована кристалличность ПКЛ и для него характерно наличие на дифрактограммах двух пиков на углах 21.3° и 23.8° [31]. В работе [28] была изучена структура материалов из ПКЛ-полиуретана, где в качестве мягкого домена выступает ПКЛ. Авторами показано, что ПКЛ придает материалам прочность, подвергается кристаллизации только при малом содержании тяжелого сегмента - полиуретана. Расчет брэгговских интервалов при пиках 3.75, 4.15 и 4.60 Å доказывает кристаллическую структуру гомополимера ПКЛ с пиками 3.75, 4.14 и 4.57 Å.

Для волокон свойственна ориентация кристаллической фазы ПКЛ. Как и для ПЛА, для ПКЛ характерна ромбическая кристаллическая структура. Радиальный профиль волокон из ПКЛ показывает несколько пиков, а именно (110) при 2Θ = 9.65°; (200) при 2Θ = 10.75°; (210) при 2Θ = 13.4°; (120) при 2Θ = 17.28°; (310) при 2Θ = 18.40°; (220) при 2Θ = 19.50°; (207) при 2Θ = 20.0° и аморфное гало с максимумом 2Θ = 19.0° [50].

На свойства скаффолда из ПКЛ влияет не только кристалличность материала, но и условия его получения. В работе [40] авторами было изучено влия-

ние расстояния между электродами при получении нановолоконных матриц из ПКЛ методом электроформования на структуру и свойства этих скаффолдов. Показано, что при увеличении скорости вращения приемного электрода происходит направленная укладка волокон и повышается прочность каркаса за счет сцепки микроволокон между собой. При этом, увеличение расстояния между электродами влечет за собой возрастание механических свойств в несколько раз. Анализ распределения диаметра волокон, полученных методом электроформования, показал, что можно их рассматривать как бимодальные [34].

Тканеинжененые матрицы являются одним из перспективным способом лечения патологий сердечно-сосудистых заболеваний. Среди полимеров, применяемых для изготовления материалов, широкое применение нашли биорезорбируемые полимеры. Тканеинженерные конструкции требует комплексного изучения структуры и свойств биоразлагаемых матриц. Особое внимание следует уделять таким свойствам как: биосовместимость, механические свойства, структуре и кинетике резорбции матриц. Оценка эффективности использования таких матриц требует длительных хронических экспериментов в условиях in vivo. Описанные задачи решали в данной работе.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Поли(L-лактид)

Полилактид (ПЛА) представляет собой биоразлагаемый алифатический эфир, мономером которого является молочная (2-гидроксипропановая) кислота. ПЛА получают из возобновляемых ресурсов, таких как кукуруза или сахарный тростник. Существует следующие пути синтеза: полимеризация лактида, поликонденсация молочной кислоты или при совместное проведении этих реакций. Отрицательной стороной реакции поликонденсации является получение только низкомолекулярного полилактида. Поэтому низкомолекулярный ПЛА деполимеризуют до димера молочной кислоты - лактида. А затем при высоких температурах и добавление катализатора получают высокомолекулярный полилактид.

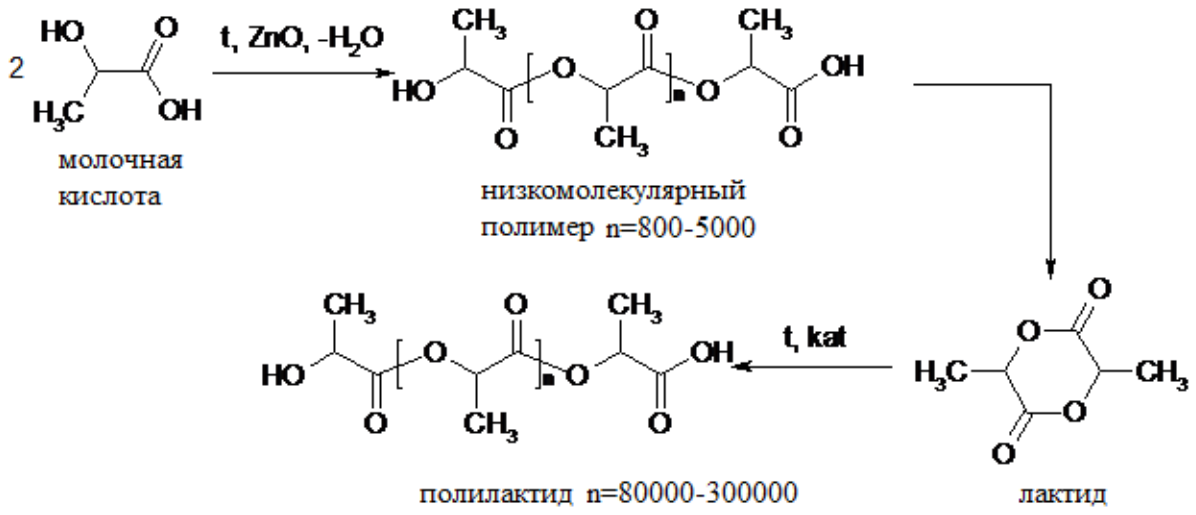


Рис. 2.1. Схема синтеза полилактида

Преимущества использования ПЛА в медицине в том, что полимер не оказывается токсического действия, гипоаллергенен, обладает хорошими физико-химическими свойствами. Продукты разложения полилактида используются в

цикле трикарбоновых кислот организма, конечными продуктами реакции которого являются углекислый газ и вода.

Существует две изомеризационные структуры ПЛА - это L- и D- формы, отличающиеся между собой пространственным расположение метильной группы -CH_3 и атомом водорода -H (см. рис. 2.2).

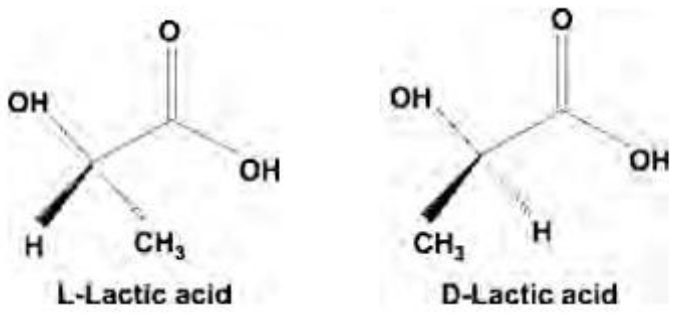


Рис. 2.2. Изомерные структуры молочной кислоты [68]

В качестве объекта исследования в работе был использован биоразлагаемый полимер на основе полилактида L-формы PL10 фирмы Corbion PURAC (Нидерланды). Полимер выпускается в виде гранул. Его молекулярная масса составляет около 90 кДа.

2.1.2. Поли(ε-капролактон)

Поликапролактон (ПКЛ) является биоразлагаемым полиэфиром, который синтезируется из ε-капролактона при нагревании и использовании катализаторов (рис. 2.3), и имеет кристаллическую структуру. Данный полимер имеет низкую температуру плавления (59 - 65 ^{o}C). Разложение ПКЛ происходит в два этапа и достигает около 3-х лет. В ходе первого этапа, происходит уменьшение молекулярной массы, при этом отсутствует деформация материала. Далее, полимер начинает расщепляться на фрагменты, происходит их абсорбция с последующим выведением из организма человека в виде капроновой кислоты, воды и углекислого газа.

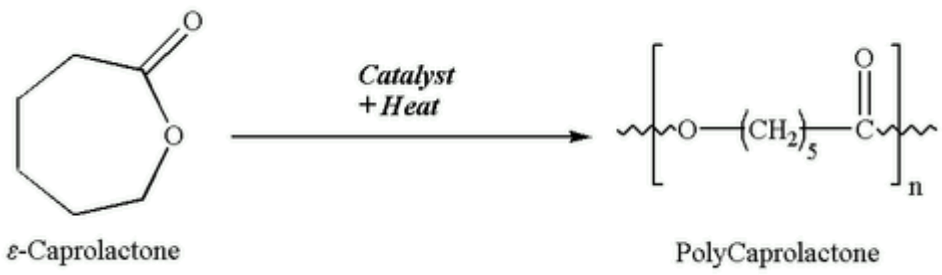


Рис. 2.3. Синтез поликапролактона

Поли(ε-капролактон) нашел широкое применение в медицине благодаря своим свойствам: высокой биосовместимости, отсутствию токсического эффекта, биоразлагаемости, эффекту памяти. ПКЛ применяют в качестве шовного материала (компания Solvay и Union Carbide), скоб, повязок, саморассасывающегося дермального имплантата пролонгированного действия для стимуляции роста фиброзной ткани.

В работе использовался поли(ε-капролактон) PC12 фирмы Corbion PURAC (Нидерланды), который выпускается в виде гранул. Молекулярная масса данного полимера составляет около 115 кДа.

2.1.3. Растворитель

В качестве растворителя использовался трихлорэтан, стабилизованный 0.6% спиртом, марки ХЧ производства АО «ВЕКТОН» (Россия). Это бесцветная летучая жидкость с характерным запахом с химической формулой $CHCl_3$.

2.1.4. Лабораторные животные

2.1.4.1. Лабораторные животные для оценки резорбции материалов в мышечной ткани и фасции

Имплантационные испытания in vivo проводились совместно с лабораторией «Экспериментальной хирургии» Научно-исследовательский центр «Санкт-петербургский государственный педиатрический медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации. Проведение экспериментов было согласовано и одобрено локальным этическим комитетом. Проводимые испытания строго соответствовали ГОСТ Р ISO 10993-2-2009 и ГОСТ Р ISO 10993-6-2011. Содержание и эвтаназия экспериментальных животных осуществлялось в соответствии с ГОСТ 33215 и 33216 (2014 г.). Экспериментальная работа выполнена на самцах крыс линии Wistar–Kyoto весом 230–250 гр. Все манипуляции с животными осуществлялись в условиях полной анестезии в асептических условиях.

2.1.4.2. Лабораторные животные для имплантации материалов в кровеносное русло

Для экспериментов в условиях in vivo использовались самцы крыс породы Wistar, выведенных в питомнике «Рапполово» РАМН г. Санкт-Петербург, весом 200-250 гр. Животные содержались в отдельных вентилируемых клетках и имели свободный доступ к чистой питьевой воде и корму. Наблюдение и уход за животными выполняли в соответствии с требованиями приказа Министерства здравоохранения Российской Федерации от 23 августа 2010 г. №708н «Об утверждении Правил лабораторной практики».

Проведение исследования разрешено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. При выполнении испытаний также руководствовались требованиями приказов №1179 МЗ СССР от 10.10.1983 г., №267 МЗ РФ от 19.06.2003 г., «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», принципами Европейской конвенции (г. Страсбург, 1986 год) и Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996 год).

2.2. Методы

2.2.1. Приготовление растворов

Для получения нано- и микроволоконных пористых материалов растворы должны быть стабильными, то есть с течением времени не наблюдается разделение фаз на составляющие компоненты, а также обладать необходимой вязкостью. Такими оптимальными характеристиками обладают растворы из ПЛА и ПКЛ в концентрациях 16 и 14 мас.% соответственно.

Приготовление растворов проводилось по следующему алгоритму:

1. Проводились расчеты необходимого массового количества полимера и объема растворителя для получения требуемой концентрации.
2. В растворитель, хлороформ, вносилось рассчитанное количество полимера в виде гранул.
3. Полученную смесь непрерывно перемешивали при комнатной температуре (25 °C) в течение 1.5 - 2.0 часов с помощью механической мешалки ЭКРОС ES-8300 со скоростью 1000 об/мин до полного растворения гранул полимера и получения прозрачного однородного раствора.
4. После раствор отфильтровывали через тканевой фильтр.

2.2.2. Измерение плотности растворов

Определение плотности раствора проводили с помощью пикнометрического метода.

Истинная плотность раствора рассчитывалась как отношение массы раствора m к занимаемому раствором объему V. Для определения объема пикнометра измеряется плотность дистиллированной воды. Для этого сначала определяется масса сухого пикнометра m_0 и масса пикнометра с водой m_1. Искомый объем пикнометра рассчитывается как:

$$V = \frac{m_1 - m_0}{\rho_1},$$

где ρ_1 - плотность дистиллированной воды.

Таким образом, вычисление плотности исследуемой жидкости сводится к следующему выражению:

$$\rho = \frac{m - m_0}{V},$$

где m - масса пикнометра с раствором полимера.

2.2.3. Измерение коэффициента поверхностного натяжения

Оценка коэффициента поверхностного натяжения проводилось методом висящей капли, который позволяет осуществлять измерения при высокой температуре и давлении. Для измерения поверхностного натяжения раствора использовался тензиометр DSA 30 фирмы Kruss (Германия) (рис. 2.4).

Методика заключается в следующем. Поршень действует на шприц и выдавливает каплю раствора, которая вытягивается до уравновешивания под действием сил гравитации. Если силы гравитации не действуют, капля приобретает форму сферы, так как поверхностное натяжение стремится минимизировать площадь.

Согласно уравнению Лапласа, можно рассчитать поверхностное натяжение, зная разницу давлений и радиусы кривизны контура. Для этого фотографируется форма капли и рассчитывается поверхностное натяжение согласно следующему уравнению (рис. 2.4):

$$\sigma = \frac{\Delta P}{1/r1 - 1/r2},$$

где ΔP - разница давлений, действующих на кончик капли и в других ее точках, r1, r2 - радиус кривизны контура.

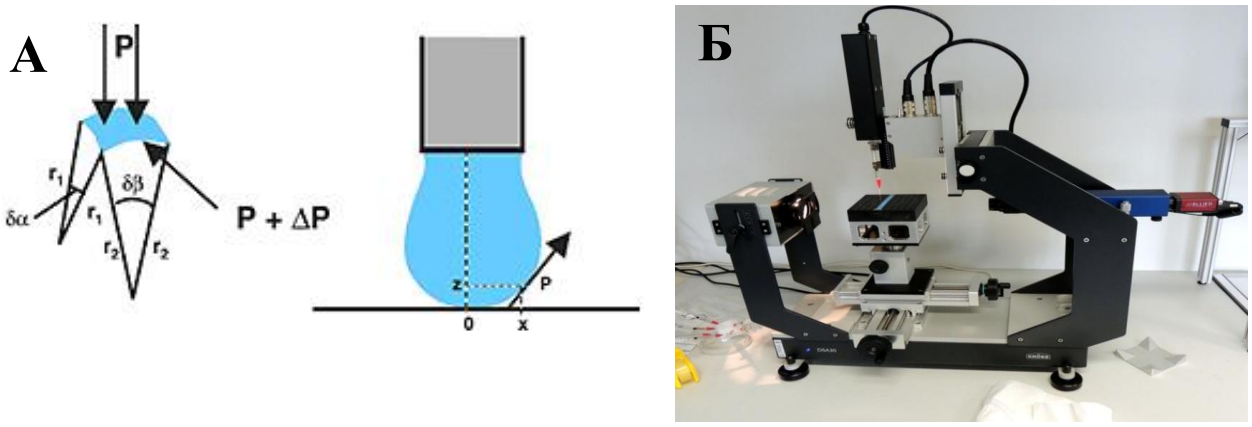


Рис. 2.4. Схема, иллюстрирующая расчетную формулу для коэффициента поверхностного натяжения (А) и установка DSA30 (Б)

2.2.4. Измерение электропроводности растворов

Одним из важных физико-химических параметров растворов для получения материалов методом электроформования является электропроводимость. Электропроводность - это величина обратно пропорциональная электрическому сопротивлению R, измеряется в Ом$^{-1}$ или Сименсах (См).

С помощью метода кондуктометрии можно проанализировать и оценить способность раствора проводить электрический ток. Прямой метод кондуктометрического анализа основан на измерение активного сопротивления раствора между погруженными в него электродами. Сопротивление раствора электролита получают при сравнении с эталонным значением сопротивления.

Рис. 2.5. Кондуктометр Mettler Toledo Seven Compact S230

Измерение электропроводности проводили с помощью кондуктометра Mettler Toledo Seven Compact S230 (Швейцария) (рис. 2.5).

2.2.5. Реологические исследования

Реологические свойства растворов ПЛА и ПКЛ определялась с помощью реометра «Physica MCR-301», фирмы «Anton Paar» (Австрия) (рис. 2.6). Проводилось измерение зависимости величины эффективной вязкости от скорости сдвига при увеличении скорости сдвига (Top) и ее снижении (Down) в двойном цилиндрическом измерительном узле DG26.7-SN4044 (DIN 54453) в диапазоне скоростей сдвига от 0.1 $с^{-1}$ до 10000 $с^{-1}$. Для исследования в кювету помещался раствор объемом 6 мл.

Рис. 2.6. Реометр «Physica MCR-301», фирмы «Anton Paar» (Австрия)

2.2.6. Получение материалов на основе нано- и микроволокон методом электроформования

Формование материалов на основе нано- и микроволокон проводили на установке «Nanon-01A», фирмы Mechanics electronics computer corporation (Япония) методом электроформования (рис. 2.7).

Рис. 2.7.Установке «Nanon-01A», фирмы Mechanics electronics computer corporation (Япония)

Метод заключается в следующем. Раствор полимера с помощью инжекторного насоса подается через электрод-фильеру в поле высокого напряжения (E = 2.5 - 3.0 В·м$^{-1}$). За счет взаимодействия электростатических сил и сил поверхностного натяжения происходит движение струи раствора по сложной траектории, которая описывается так называемым конусом Тейлора. Капля деформируется и разбивается на микроструи. Струи попадают на приемный электрод (коллектор), который имеет противоположный заряд. При движении струи от подающего электрода к приемному происходит испарение растворителя и образуется нановолоконная структура (рис. 2.8).

В данной методике следует учитывать такие параметры как свойства раствора - динамическую вязкость, поверхностное натяжение, молекулярную массу, состав и природу растворителя, электропроводность, а также параметры формования нановолокон - скорость подачи раствора, расстояние между электродами, напряжение электрического поля.

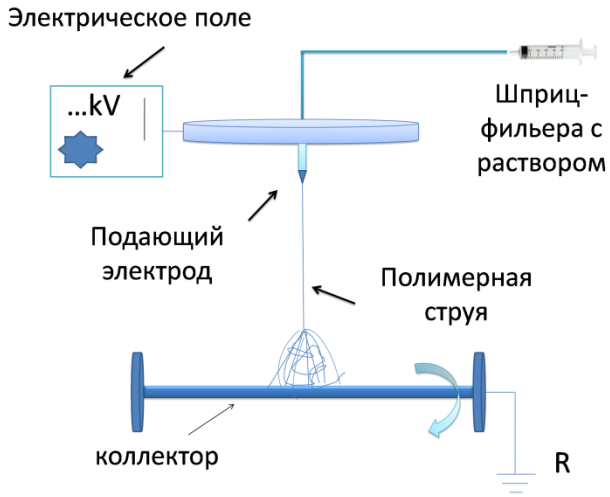


Рис. 2.8.Схема метода электроформования

Для получения образцов использовался цилиндрический коллектор диаметром $1.2 \cdot 10^{-3}$ м, скорость вращения которого составляла 2500 оборотов в минуту. Раствор подавался через электрод-фильеру со скоростью $2.8 \cdot 10^{-6} \div 7.0 \cdot 10^{-4}$ $см^3/с$. Расстояние между электродами составляло 0.15 м.

2.2.7. Дифференциальная сканирующая калориметрия

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) - это метод термического анализа, изучающий фазовые переходы полимеров при нагревании.

Метод ДСК заключается в следующем. Калориметр имеет две ячейки: в одну из них помещают исследуемый образец, а другую – тигель сравнения. Затем образец нагревают. Для нагревания ячейки с образцом требуется больше тепла, чем для ячейки с тиглем. В результате эксперимента определяют временную зависимость разницы температур между ячейкой с образцом и ячейкой сравнения.

Исследование проводилось на калориметре фирмы NETZSCH (Германия) DSC 204 F1 Phoenix. Навеска образца составляла 3.5-4.0 мг, скорость нагрева составляла 10 °С в минуту.

2.2.8.Метод рентгеноструктурного анализа

Изучение кристаллической структуры образцов проводили с помощью метода рентгеновской дифракции, измерения проводили на дифрактометре Bruker D2 PHASER (Германия) с использованием CuK_{α} – излучения, фильтрованного Ni. Параметры элементарной ячейки и размеры кристаллитов рассчитывали при полнопрофильном уточнении (метод Ритвельда), с использованием программы TOPAS 5.0 (Bruker). Степень кристалличности определяли по отношению интегральных интенсивностей рассеяния от кристаллических областей и диффузного рассеяния.

2.2.9. Сканирующая электронная микроскопия

Одним из основных методов исследования особенностей структуры нановолокон и материалов на их основе является метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). В работе использовался сканирующий электронный микроскоп Carl Zeiss Supra 55 VP, фирмы Carl Zeiss (Германия) (рис. 2.9). Предварительно на образец напыляется слой платины.

Суть метода заключается в следующем. Пучок электронов, испускаемый катодом, фокусируется и направляется в сторону образца после прохождения системы электронной оптики - линз(обычно электромагнитных, иногда электростатических). В результате взаимодействия первичных электронов с образцом генерируются низкоэнергетичные вторичные электроны, собирающихся детектором вторичных электронов. Интенсивность электрического сигнала детектора зависит как от природы образца (в меньшей степени), так и от топографии (в большей степени) образца в области взаимодействия. Таким образом возможно получить карту рельефа анализируемой зоны.

В результате на детекторе получаем данные о координатах пучка на образце и величину отраженного сигнала. На экран монитора выводится изображение, которое позволяет изучить структуру образца.

Рис. 2.9. Сканирующий электронный микроскоп Carl Zeiss Supra 55 VP

2.2.10. Исследование деформационно-механических характеристик

Исследование механических свойств материалов проводили на разрывной машине Instron 5943, фирмы Instron (США) (рис. 2.10).

Образцы пленок и трубок растягивали до их разрушения с помощью плоских пневматических и цанговых зажимов со скорость 15 мм/мин, длина испытываемого участка составляла 20 мм. Были получены диаграммы растяжения и рассчитаны значения модуля Юнга E (МПа), прочности σ (МПа) и деформации при разрушении (%).

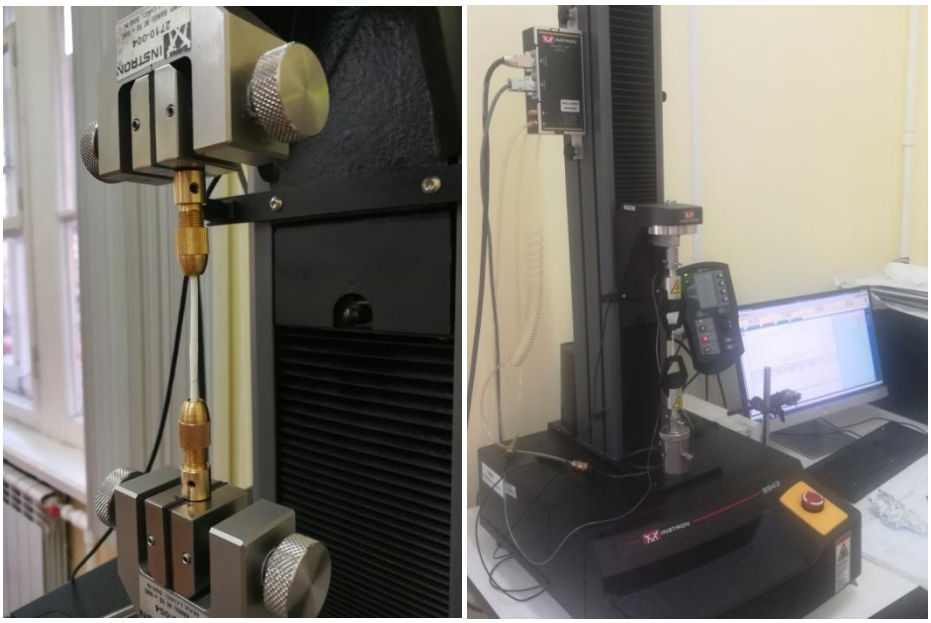


Рис. 2.10. Разрывная машина Instron 5943

2.2.11. Исследование цитотоксичности в условиях in vitro

Оценку пролиферативной активности фибробластов человека выполняли на пленочных образцах с использованием первичной культуры дермальных фибробластов человека.

Культивирование клеток проводили в питательной среде α-MEM с добавлением L-глютамина, 10 % бычьей эмбриональной сыворотки и антибиотиков (100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (реактивы фирмы Gibco, США)). Пленочные образцы стерилизовали в виде кругов диаметром 8 мм в сухом состоянии в пластиковой чашке Петри под ультрафиолетом в течение 20 минут с каждой стороны.

Далее, образцы вымачивали в питательной среде 1 час и помещали в лунки 96-луночного планшета, покрытые агарозой. Суспензию дермальных фибробластов человека объемом 200 мкл с концентрацией $10*10^4$ клеток/лунка в среде α-MEM вносили в лунку с образцом. Культивирование клеток проводили в течение 5 суток при 37 °C в CO_2-инкубаторе (5% CO_2 в воздухе).

Оценку жизнеспособности и пролиферативной активности оценивали на 5 сутки культивирования клеток с помощью МТТ-теста. Методика основана на

способности дегидрогеназ живых клеток, восстанавливать МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н- тетразолий бромид) до нерастворимого в воде фиолетового кристаллического формазана. После указанного срока, в лунки добавляли 10 мкл раствора МТТ в свежей среде α-МЕМ (5 мг/мл), после чего продолжали инкубацию в течение 2 часов. Аккуратно удаляли среду, добавляли в лунки 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) для растворения кристаллов формазана и измеряли оптическую плотность растворов при 570 нм с помощью планшетного спектрофотометра.

2.2.12. Исследование в условиях in vivo

Для оценки резорбции материалов на основе микроволокон из ПЛА и ПКЛ в организме животного выполнены следующие эксперименты:

- матрицы помещали в фасцию и мышечную ткань крысы;
- протезирование брюшной части аорты.

2.2.12.1. Исследование процессов резорбции при внутримышечном и субфасциальном введении

Наркотизация животных проводилась путем внутримышечной инъекции смеси тилетамина гидрохлорида и золазепама гидрохлорида (Золетил 100). Расчет дозировки для каждого животного был индивидуальным, применялась дозировка 15 мг/ кг веса животного и в среднем составляла 3.75 мг, разведенного в прилагаемой к препарату воде для инъекций.

Для проведения субфасциальной имплантации экспериментальных образцов животное фиксировалось к операционному столу с помощью лигатур с последующей депиляцией области спины при помощи машинки для стрижки животных и бритвенного станка. Поверхность кожных покровов трехкратно обрабатывалась кожным антисептическим средством «экобриз».

После обработки кожи на спине в районе левой и правой m. lattissimusdorsi производился разрез длиной 1.0 см до фасции. В разрез вводился рамочный ра-

норасширитель, края разреза фиксировались для обеспечения проводимых манипуляций. Фасция надрезалась и раздвигалась при помощи крючков остроконечных четырехзубых. Далее исследуемые материалы закладывались под фасцию. После помещения образцов фасция ушивалась при помощи шовного материала Vicryl 4-0. Кожный разрез ушивался при помощи шовного материала Vicryl 2-0. Аналогичным образом образцы помещались и в проекции правой m. lattissimusdorsi.

Внутримышечное введение образцов проводилось в районе m. lattissimusdorsi. Выполнялся разрез длиной 1 см до фасции. В разрез вводился рамочный ранорасширитель, края разреза фиксировались для обеспечения проводимых манипуляций. Фасция надрезалась и раздвигалась при помощи крючков остроконечных четырехзубых. Производилось 2 разреза капсулы m.latissimusdorsi на расстоянии 0.3 - 0.5 см друг от друга. В получаемые разрезы вводились исследуемые образцы, после чего производилось последовательное сшивание мышечной капсулы, собственной фасции спины и кожи материалами Vicryl 4-0 и Vicryl 2-0 соответственно.

Для сравнительного анализа резорбции материалов из ПЛА и ПКЛ образцы располагали следующим образам: слева в мышечную ткань и фасцию фиксировались образцы из ПЛА, справа - из ПКЛ. Сроки наблюдения: 14 и 183 дня. Прооперировано 8 крыс: на каждом сроке выводилось по четыре крысы.

2.2.12.2. Исследование процессов резорбции и образования новых тканей на основе полимерной матрицы, имплантированной в кровеносное русло

Важными характеристиками для полимерной матрицы, имплантированной в кровеносное русло, являются отсутствие аневризм и тромбообразования, хорошими барьерными свойствами, а также образование нативной ткани. Экспериментальное in vivo проводили в операционной лаборатории инвазивных технологий научно-исследовательского центра ПСПбГМУ им. И.П. Павлова.

Полимерную матрицу имплантировали в брюшную аорту крысы. Операции выполняли под анестезией (атропин сульфат - 0.03мг/кг, «Рометар» - 1.6 мг/кг, «Золетил - 100»- 5 мг/кг) в течение 60-90 минут. Во время хирургических вмешательств использовали операционный стереоскопический микроскоп МБС - 10 (ОАО «ЛЗСО», Россия). Для доступа к аорте выполняли Y-образную лапаротомию и перемещали органокомплекс в правую половину брюшной полости. Проводилась мобилизация инфаренального отдела аорты, путем перевязывания поясничных артерий нитью пролен 8-0 (W2970, Ethilon, Ethicon, США) и наложения микрохирургических клипс. Далее выполнялась резекция брюшной аорты аорты 2.0±0.5 мм и протезировали ее матрицей. Протез матрицы имел внутренний диаметр 1.2 мм и длину 10±1 мм. Проксимальный и дистальный анастомозы выполняли нитью пролен 9-0 (W2970, Ethilon, Ethicon, США) по типу конец в конец узловыми швами (Приложение 2).

После протезирования проводилось восстановление кровотока и гемостаз, а также визуальный контроль проходимости имплантата. Время ишемии нижней части тела составило 30±5 минут. Оценку проходимости осуществляли классической методикой сразу после вшивания и через 30 минут. Разрез брюшной стенки ушивали послойно рассасывающейся нитью с антибактериальным покрытием (Vicryl Plus, 4-0VCP496H, Ethicon, США). В послеоперационный период за животными выполнялся общий уход. На каждом рассматриваемом сроке прооперировано по 5 крыс.

2.2.13. Гистологические исследования

2.2.13.1. Гистологическое исследование процессов резорбции при внутримышечном и субфасциальном введении

Иссечение биоптатов проводили вместе с окружающими тканями. Отобранные образцы фиксировались в 10%-ном нейтральном формалине с дальнейшей проводкой через спирты повышающихся концентраций в гистопроцессоре Thermoscientific Excelsior AS в течение 12 часов. Заливку в парафин про-

водили на станции Thermoscientific Histo Star, нарезку парафиновых блоков — на микротоме Microm HM 430. Окраска полученных срезов выполнялась в автоматической гистологической станции Microm HMS 740 с использованием «эозина водно-спиртового», «гематоксилина Майера» и «пикрофуксина по Ван-Гизону». Морфогистологическое исследование полученных препаратов проводили при помощи световой микроскопии.

2.2.13.2. Гистологическое исследование процессов резорбции и образования новых тканей на основе полимерной матрицы, имплантированной в кровеносное русло

Иссечение имплантатов проводили вместе с проксимальным и дистальным участками брюшной аорты. Эвтаназию животных выполняли введением препарата натрия пентобарбитонат/нембутал (Sodium Pentobarbitone) 200 мг/кг внутрибрюшинно. Полученные образцы фиксировали в 10% нейтральном стабильном фиксирующем растворе формалина (pH 7.4) не менее одних суток. Далее, разделяли биопрепарат на две равные половины (рис. 2.11). Одну из которых анализировали в продольном сечении, вторую в поперечном. Закрепление материала в парафиновых блоках проводилось по стандартному гистологическому методу с помощью изопропилового спирта или эфира. Далее парафиновые срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Чтобы выявить соединительную ткань и эластические волокна, было проведено окрашивание по методу Маллори и методу Массона (реактивы Bio-Optica, Италия).

Микроскопический анализ гистологических препаратов и фотосъемку проводили с помощью светового микроскопа Leica DM750 (Германия) при окуляре 10, объективе 4, 10, 40 и 100 и фотокамеры ICC50 (Leica, Германия).

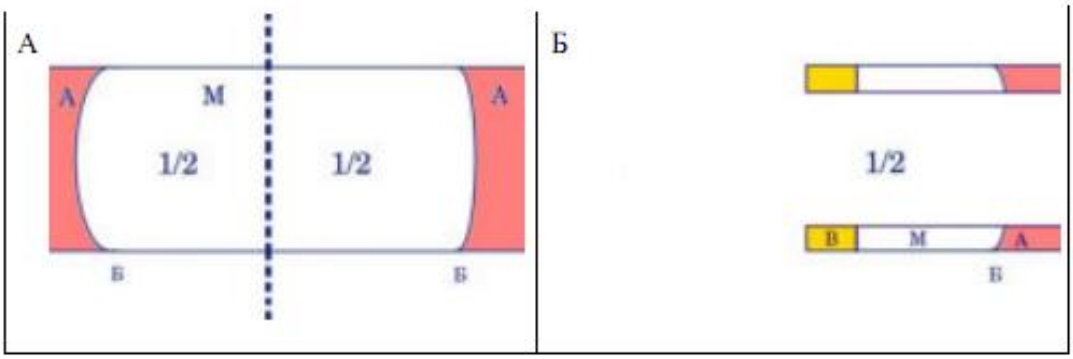


Рис. 2.11. Схема гистологического среза препарата матрицы. А — брюшная аорта крысы, Б — линия анастомоза, В — зона морфометрического анализа, М — матрица [13]

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Исследование свойств растворов

Данная часть работы посвящена исследованию свойств растворов для получения микро- и нановолокон из полилактида и поли(ε-капролактона) методом электроформования. Так как на процесс формования волокон и качество материалов влияют электрофизические, реологические и химические параметры растворов, в работе было проведено исследование структуры и свойств материалов на основе микро- и нановолокон в зависимости от характеристик формовочной смеси.

3.1.1. Коэффициент поверхностного натяжения

Для получения микро- и нановолокон методом электроформования, одной из важных характеристик формовочного раствора является значение поверхностного натяжения. Чем ниже коэффициент поверхностного натяжения, тем устойчивее жидкая струя [14].

В таблице 3.1 представлены значения плотности и коэффициента поверхностного натяжения формовочных растворов ПЛА PL 10 и ПКЛ PC12 в хлороформе.

Таблица 3.1

Значения плотности и коэффициента поверхностного натяжения растворов ПЛА PL10 и ПКЛ PC12в хлороформе

Концентрация, %	Плотность, г/см^3	Поверхностное натяжение, Н/м
PL10		
12	1.43±0.01	28.62±0.85
14	1.45±0.01	29.38±1.27
16	1.45±0.02	29.56±0.65
18	1.45±0.01	29.65±1.59
PC12		
10	1.42±0.02	27.88±1.80
12	1.43±0.01	29.51±0.41
14	1.43±0.01	30.31±0.69

На основании полученных данных можно сказать, что плотность растворов ПЛА и ПКЛ слабо зависит от количества полимера в растворе. Для растворов из полилактида плотность равна 1.45±0.01 г/см^3, а для растворов из поликапролактона - 1.43±0.01 г/см^3.

Значения поверхностного натяжения формовочных смесей лежат в диапазоне от 28 до 30 Н/м. Данные показатели поверхностного натяжения являются оптимальными для получения микро- и нановолокон методом электроформования из растворов, что продемонстрировано в работах [36][37].

3.1.2. Электропроводимость растворов из полилактида и поли(ε-капролактона)

Исследование удельной электропроводимости исходных формовочных растворов из полилактида и поликапролактона показало, что значение удельной электропроводности для растворов из ПЛА составляет 7 - 10 мкСм/см, а для растворов из ПКЛ 1 - 3 мкСм/см. Данные показатели являются удовлетворительными для получения материалов методом электроформования согласно литературным данным [4].

3.1.3. Реологические свойства растворов

На рис. 3.1 приведены зависимости эффективной вязкости растворов ПЛА концентрацией 10 и 18 мас.% от скорости сдвига при T = 20 ºC в режиме Down.

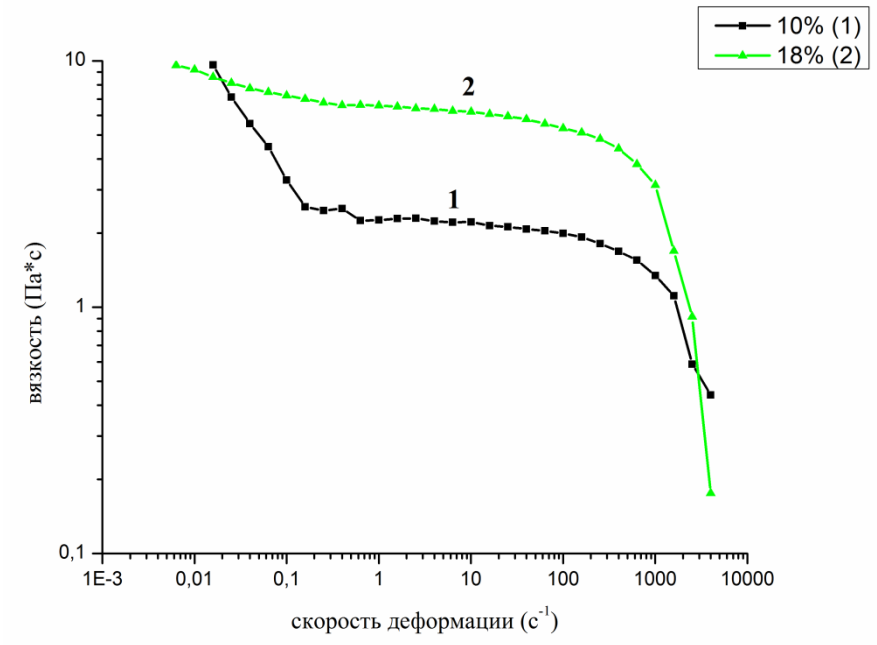


Рис. 3.1. Зависимости эффективной вязкости растворов ПЛА в хлороформе концентрацией 10 и 18 мас.% , кривые 1 и 2 от скорости сдвига

Видно, что вязкость раствора ПЛА концентрацией 10 мас.% (кривая 1) в широком диапазоне скоростей сдвига – неньютоновская жидкость. Его вязкость зависит от скорости сдвига. Однако, при величинах от 0.1 до 1000 $с^{-1}$ вязкость раствора практически не зависит от скорости сдвига. Раствор является ньютоновской жидкостью. При дальнейшем увеличении скорости сдвига наблюдается уменьшение вязкости.

Рост концентрации раствора до 18 мас.% (кривая 2) повышает значение вязкости, а также увеличивает отклонение раствора ПЛА от ньютоновского поведения.

Исследование реологических свойств растворов из полилактида показало, что вне зависимости от концентрации, все составы в широком диапазоне скоростей сдвига являются неньютовскими жидкостями со слабой молекулярной структурой**.** Увеличение концентрации раствора приводит к росту вязкости (табл. 3.2)

Таблица 3.2

Значения вязкости растворов ПЛА разной концентрации

Концентрация мас. %	Среднее значение вязкости, Па·с	Стандартное отклонение вязкости, Па·с	Относительное стандартное отклонение, %
10	0.50	0.011	2.3
14	1.42	0,049	3.5
18	6.33	0.39	6.2

Раствор поликапролактона концентрацией 14 мас. % в диапазоне скоростей сдвига от 1 до 500 $с^{-1}$ является также являются ньютовской жидкостью с высокой вязкостью. Среднее значение вязкости при скоростях сдвига от 0.1 до 100 $с^{-1}$ составляет 1.40±0.16 Па·с, а условный предел текучести 0.34 Па.

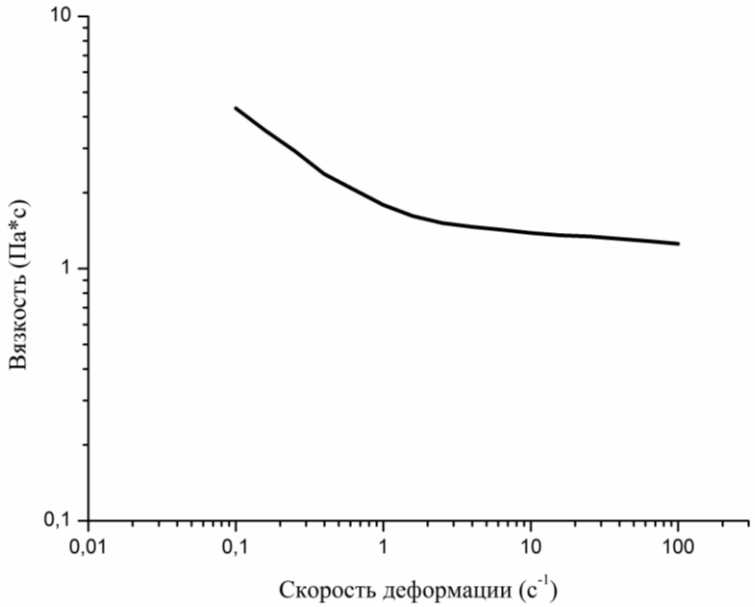


Рис. 3.2. Зависимость вязкости от скорости сдвига раствора поликапролактона концентрацией 14 мас.%

3.2. Получение материалов методом электроформования

Пористые материалы на основе микро- и нановолокон получали методом электроформования из раствора.

На рис.3.3 приведена фотография трубки на основе микроволокон из ПЛА (рис. 3.3 а) и ПКЛ (рис. 3.3 б). Внутренний диаметр трубок составляет ~ 1.2 мм, а толщина стенок ~ 0.3 мм для ПЛА и 0.5 мм для ПКЛ.

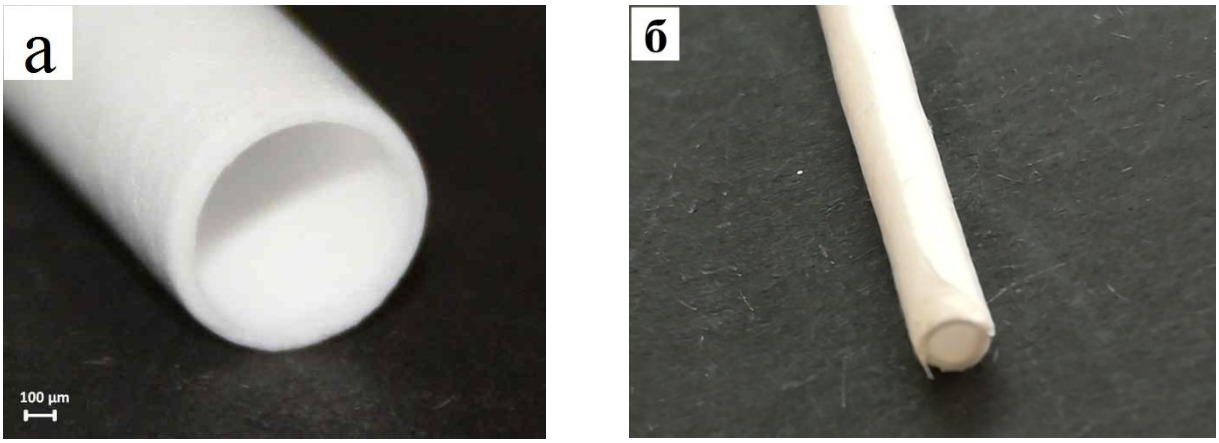


Рис. 3.3. Фотографии трубок из полилактида (а) и поликапролактона (б)

На рис. 3.4 представлены микрофотографии, полученные с помощью СЭМ при большом увеличении. Данный метод позволил оценить диаметр микроволокон. Так, для материалов из ПЛА диаметр волокон примерно 2 мкм, а из ПКЛ около 4 мкм.

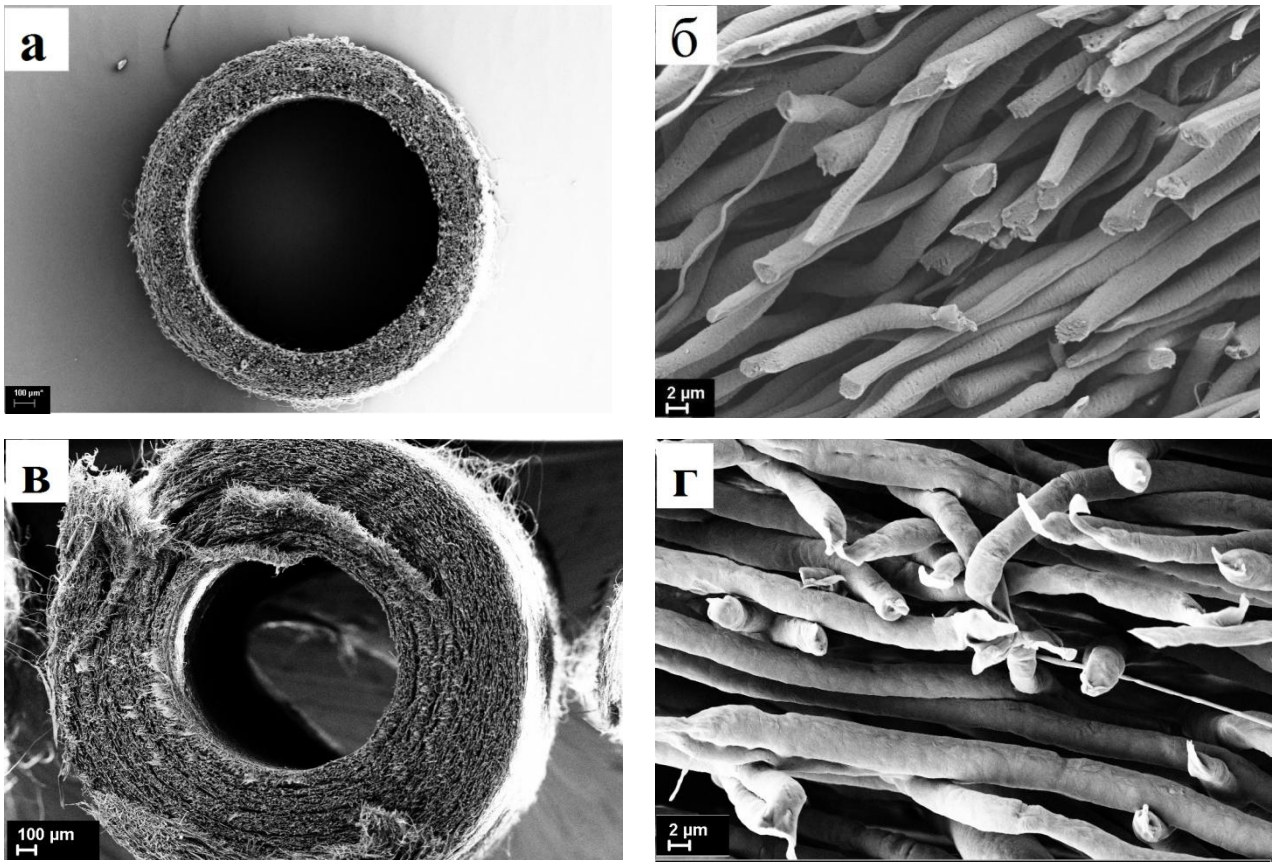


Рис. 3.4. Микрофотография трубки и ее стенки из полилактида (а, б) и поликапролактона (в, г)

Образцы на основе полилактида после электроформования подвергали термообработке в диапазоне температур 40 - 160°С в изотермическом режиме, время выдержки на воздухе составляло 1 час. Для трубок на основе свежесформованных микро- и нановолокон из ПКЛ дополнительная температурная выдержка не требовалась, так как ПКЛ обладает низкой температурой плавления и имеет кристаллическую структуру.

Также были получены комбинированные матрицы из полилактида и поликапролактона. В работах [64][42] показано, что такие матрицы обладают лучшими деформационно-прочностными свойствами, высокой пролиферацией клеток, отсутствием тромбоза. На основания этих данных и для сравнительного исследования сформованы образцы с послойным нанесением полимеров:

1. Трубка с внутренним слоем из нановолокон ПЛА, которую обрабатывали при температуре 90 °С, после чего сверху напыляли слой из ПКЛ (рис. 3.5 а).

2. Трубка, внутренний слой которой состоял из ПКЛ, а внешний из ПЛА. Данный образец не подвергался дополнительной термообработке (рис. 3.5 б).

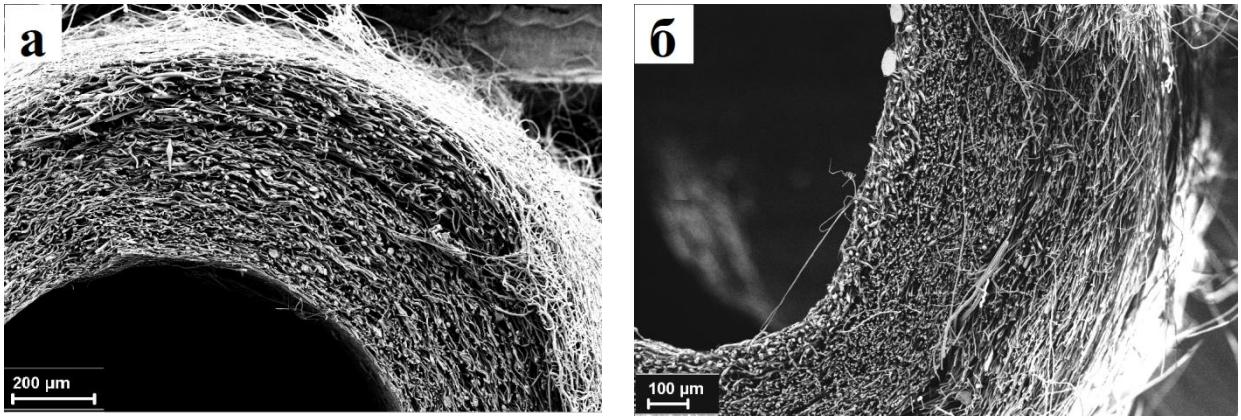


Рис. 3.5. Микрофотографии трубок: с внутренним слоем из ПЛА и внешним из ПКЛ (а) и внутренним слоем из ПКЛ и внешним из ПЛА (б)

3.3. Исследование свойств материалов из полилактида и поли(ε-капролактона)

В данном разделе были проведены исследования структуры и свойств материалов из полилактида и поли(ε-капролактона).

3.3.1. Рентгеноструктурный анализ

Полилактид является хорошо кристаллизующимся полимером, что показано исследованием его кристаллической структуры в работах [45][29][38]. Рентгеноструктурный анализ гранул исходного ПЛА и пленки, сформованной из раствора, кристаллизация которой происходила в условиях, приближенных к равновесным при температуре 20 °С подтверждает данные исследования. На дифрактограммах обоих образцов, приведенных на рис. 3.6 (кривые 8 и 9) видны рефлексы на углах 2θ = 12.1º, 14.8º, 16.7º, 18.9º, 22.4º, 27.4º, 29.1º, соответст-

вующие отражениям от плоскостей α-формы кристаллической ячейки ПЛА [45][44][39].

По результатам рентгеноструктурного анализа микро- и нановолокон, полученных методом электроформования и обработанных при низких температурах, T = 40 - 60 ºС, (рис. 3.6, кривые 1 и 2), можно наблюдать только размытое гало, что свидетельствует об аморфной структуре этих микроволокон.

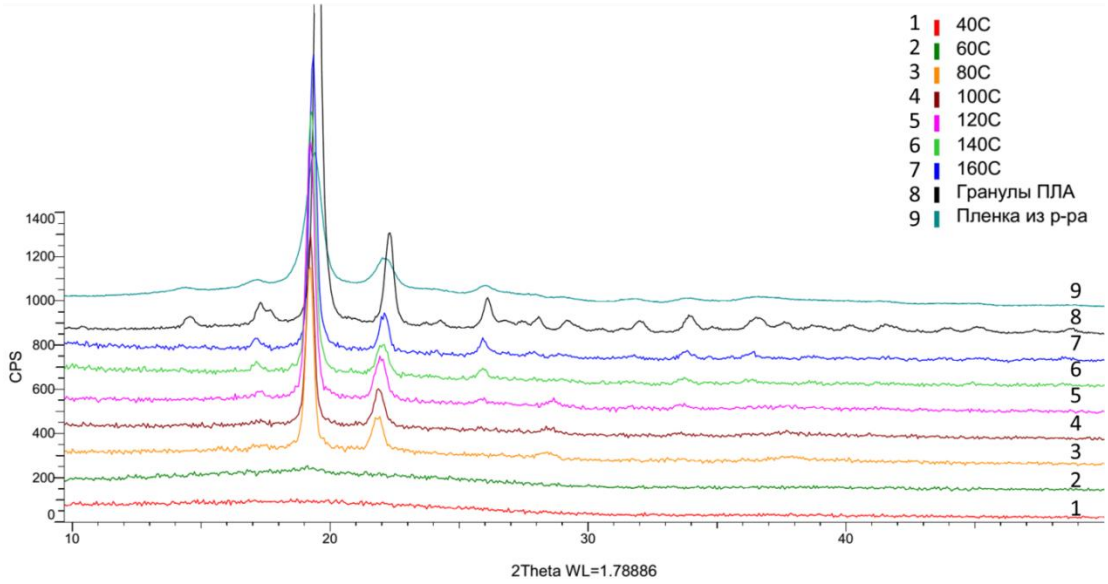


Рис. 3.6. Рентгенодифрактограммы волокон, обработанных при T = 40 (1), 60 (2), 80 (3), 100 (4), 120 (5), 140 (6) и 160 ºС (7), гранул ПЛА (8) и пленки, полученной из раствора (9)

При термообработке 80 ºС и выше на рентгенограмме можно увидеть появление узких дифракционных максимумов разной интенсивности, свидетельствующих о наличии в термообработанных микроволокнах кристаллических областей (рис. 3.6, кривые 3-7). Увеличение температуры обработки трубок из ПЛА до 160 ºС существенно не меняет дифракционную картину, однако можно отметить закономерное смещение пиков в большие углы. Данный результат свидетельствует о сжатии элементарной ячейки – преимущественно в направлениях b и c. Уменьшение размеров кристаллической ячейки в процессе термообработки свидетельствует об уменьшении дефектности кристаллов ПЛА, что,

свою очередь, должно приводить к увеличению межмолекулярного взаимодействия.

В таблице 3.3 приведены значения параметров элементарной ячейки, размеров кристаллитов L и степени кристалличности исходных волокон из ПЛА и обработанных при различных температурах. Для сравнения приведены аналогичные значения для пленки, полученной из раствора методом сухого формования и исходных гранул.

Таблица 3.3.

Значения параметров элементарной ячейки, размеров кристаллитов L и степени кристалличности трубок на основе микроволокон из ПЛА, обработанных при различных температурах, а также пленки, полученной методом сухого формования и исходных гранул

Образец	Параметры элементарной ячейки, Å			Размер кристаллита *L*, нм	Степень кристалличности, %
	a	b	c		
Гранула	10.61±0.02	6.087±0.007	28.70±0.03	25.5±0.2	90
Пленка	10.50±0.01	6.29±0.02	30.26±0.09	13.0±2.0	58
80 °C	10.67±0.03	6.20±0.01	29.22±0.03	34.0±8.0	67
100 °C	10.67±0.03	6.20±0.02	29.14±0.03	33.0±8.0	78
120 °C	10.67±0.03	6.21±0.02	29.04±0.06	27.0±6.0	79
140 ^{0}C	10.69±0.03	6.14±0.02	29.06±0.09	25.0±3.0	89
160 °C	10.67±0.02	6.14±0.02	28.95±0.06	30.0±3.0	90

Анализ полученных данных подтверждает хорошо развитую кристаллическую структур микроволокон из ПЛА, подвергнутых термической обработке при температурах выше 80 °C. Исследование микроволокон методом СЭМ по-

казало, что микроволокна состоят из ламелей, включающих кристаллы α-модификации. На рис. 3.7 приведены микрофотографии с разным увеличением волокон, полученных методом электроформования и обработанных при 90 ºС. На поверхности волокон можно наблюдать значительное количество пор с размерами 100 - 300 нм (рис. 3.7 а), а также ламелей с размерами ~ 20х200 нм (рис. 3.7 б). Высота ламелей составляет около 20 нм и близка к величине размеров кристаллитов микроволокон, определенных по данным большеугловой рентгеновской дифракции, 25 – 34 нм. Ламеллярная структура характерна для большинства гибкоцепных полимеров в неориентированном состоянии [74][11]. Складчатая структура макромолекул, наличие ламелей, препятствуют образованию проходных цепей, соединяющих отдельные элементы структуры. Такая надмолекулярная структура не позволяет реализовать высокие прочностные и упругие свойства полимера. Отметим, что согласно [60], высокие прочности достигнуты на волокнах из ПЛА исключительно с фибриллярной структурой.

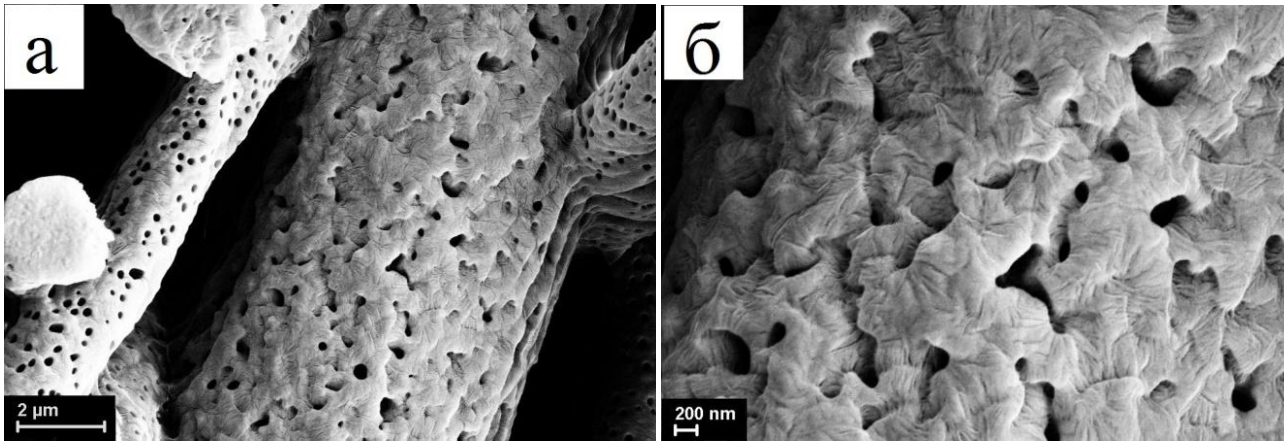


Рис. 3.7. Микрофотографии микроволокон из ПЛА, полученных методом электроформования и обработанных при T = 90 ºС

Одним из факторов, влияющих на прочность волокон, полученных методом электроформования из раствора, является их высокая пористость. При осаждении микроструи от фильеры к приемному электроду происходит испарение растворителя, в результате чего образуются поры. Следует отметить, что метод электроформования является, по сути, вариантом метода сухого формования

волокон. Как известно, большинство волокон, полученных «сухим» формованием из растворов, как правило, характеризуются высокой пористостью [12].

Также было проведено исследование кристаллической структуры образцов ПКЛ, а именно, гранул, пленки, полученной из раствора при комнатной температуре и материала, полученного методом электроформования. На рис. 3.8 представлены их дифрактограммы.

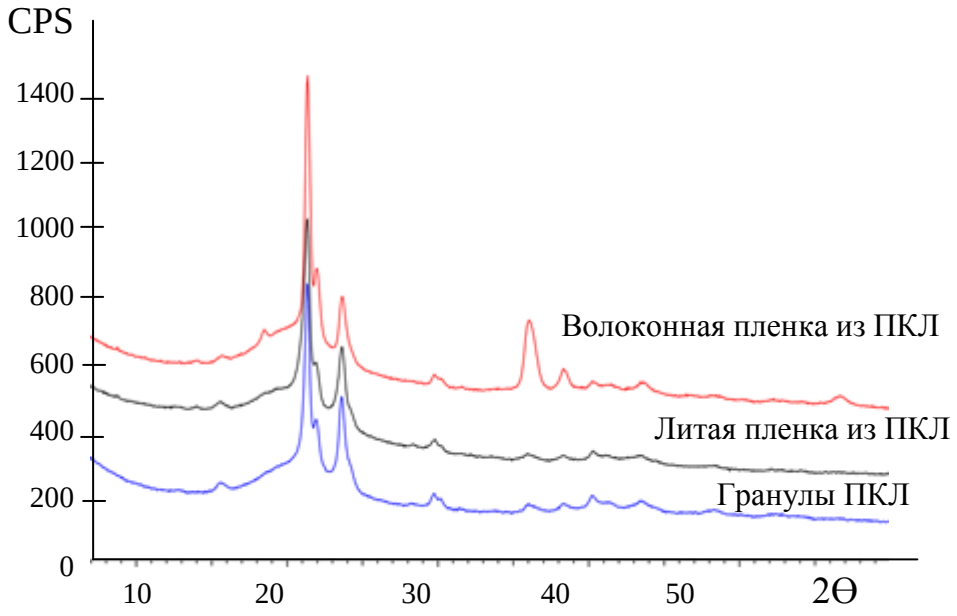


Рис. 3.8. Рентгенодифрактограмма гранул ПКЛ, пленки из ПКЛ, полученной из раствора при комнатной температуре и ПКЛ материала, полученного методом электроформования

Из полученных данных видно, что ПКЛ имеет кристаллическую структуру. Вне зависимости от способа получения материала и исходного образца наблюдаются дифракционные максимумы на углах 2Θ = 21.3° и 25.3°, что согласуется с данными в работе [31].

В таблице 3.4 представлены значения параметров размеров кристаллитов L и степени кристалличности исходных гранул и образцов из ПКЛ.

Таблица 3.4.

Значения размеров кристаллитов L и степени кристалличности пленки на основе микроволокон из ПКЛ, а также пленки, полученной методом сухого формования и исходных гранул

Материал	Угол 2θ, °	Размер кристаллита L, нм	Степень кристалличности, %
Гранула	20.67	2.8±0.1	56.7
Пленка волоконная	19.66	1.7±0.02	54.6
Пленка литая	20.52	3.5±0.02	57.9

Видно, что образцы из ПКЛ имеют примерно одинаковую степень кристалличности вне зависимости от способа получения.

На основании полученных данных видно, что оптимальными параметрами кристаллической структуры обладают матрицы из ПЛА, обработанные при T = 80 - 100 °C. Материалы из ПКЛ имеют достаточную кристаллическую структуру, следовательно, дополнительной обработки не требуют, иначе произойдет потеря свойств, требуемых для сосудистых имплантатов.

3.3.2. Дифференциальная сканирующая калориметрия

С помощью метода ДСК было проведено исследование кристаллизации материалов из ПЛА и ПКЛ.

На рис. 3.9 приведены кривые ДСК исследуемых образцов из ПЛА. Из полученных данным видно, что при нагревании трубка на основе свежесформованных микроволокон происходит скачок теплоёмкости при T = 60 ºC (рис. 3.9, кривая 1), обусловленный увеличением сегментальной подвижности макромолекул при температуре стеклования полимера, что согласуется с данными работ [62][12]. При дальнейшем нагреве при T = 95 ºC на кривой можно видеть экзомаксимум, который, как показал рентгеноструктурный анализ выше, связан с кристаллизацией ПЛА. При T = 179 ºC наблюдается эндомаксимум, связанный

с плавлением кристаллитов. Следует отметить, что плавление кристаллитов микроволокон происходит при более низких температурах, чем плавление кристаллитов гранул (рис. 3.9, кривые 1 и 2), что может быть связано с дефектностью кристаллитов микроволокон, их высокой пористостью.

Исходные гранулы ПЛА (рис. 3.9, кривая 2) обладают наиболее термостабильной структурой. При их нагреве вплоть до температуры плавления T = 191 ºC практически не наблюдается никаких эндо- и экзо- эффектов. Аналогичную картину можно наблюдать и для пленки, полученной из раствора (рис. 3.9, кривая 3). В случае плёнки ПЛА процесс плавления наблюдается при T = 185 ºC, что несколько ниже, чем для гранул ПЛА. Такие различия в значениях температур плавления гранул и пленок, очевидно, связаны с различной дефектностью кристаллитов, а также разной степенью кристалличности, что следует из результатов рентгеноструктурного анализа.

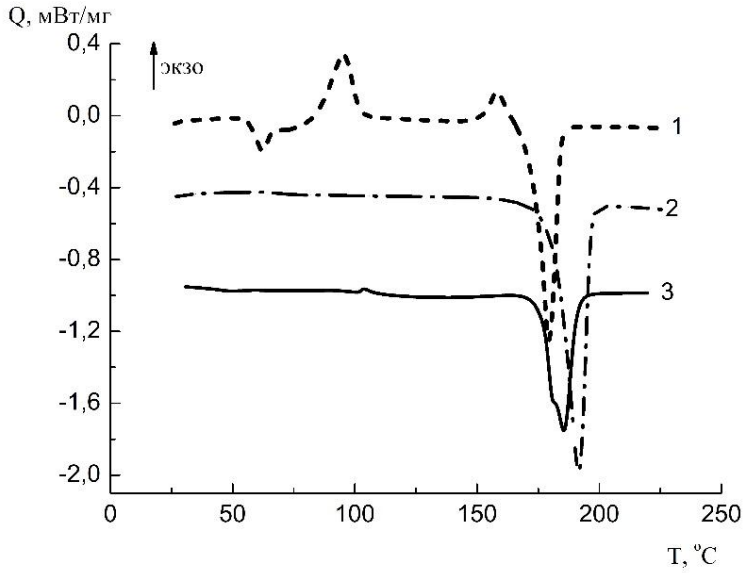


Рис. 3.9. Кривые ДСК трубки на основе свежесформованных микроволокон, гранул ПЛА и пленки, полученной из раствора; кривые 1, 2, 3

Также исследовались термические свойства материалов из ПКЛ. Результаты кривых представлены на рис. 3.10 и в таблице 3.5.

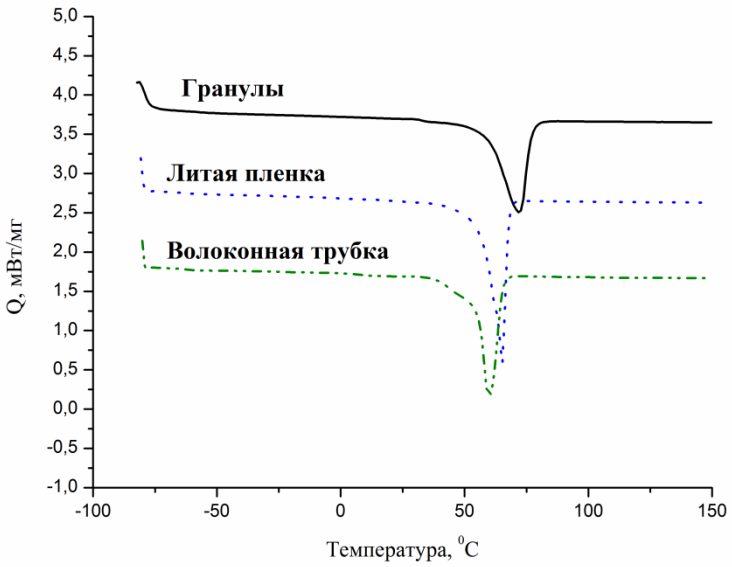


Рис. 3.10. Кривые ДСК гранул ПКЛ, литой пленки и волоконной трубки

Таблица 3.5

Температура плавления материалов на основе поли(ε– капролактона)

Материал	$T_{пл}$, °C
Гранулы	72.0
Пленка литая	65.3
Пленка на основе микроволокон	59.9

Для ПКЛ кривые ДСК исходных гранул и пленок, полученных из раствора и методом электроформования несущественно различаются. Поликапролактон является кристаллизующимся полимером с низкой температурой плавления, поэтому материалы на его основе дополнительной термообработки не требуют.

Можно предположить, что скаффолды, состоящие из ПЛА и ПКЛ, будут обладать повышенным значениями прочности и модуля упругости, так как структура характеризуется наличием кристаллических и аморфных доменов.

3.3.3. Деформационно-прочностные характеристики

Важной характеристикой материалов на основе микро- и нановолокон являются деформационно-прочностные свойства. Скаффолды, которые можно использовать в сосудистой трансплантологии, должны обладать хорошими механическими свойствами как в сухом состоянии, так и в водных средах, обеспечивающим возможность хирургических манипуляций, а также стерилизацию матриц [65][27].

Следующей важной особенностью сосудистых имплантатов является способность выдерживать высокие механические нагрузки при прохождении кровотока крови. В литературе [52][51] показано, что сосуды человека выдерживают давление от 100 кПа до 400 кПа. Следует отметить, что при таких больших значениях давления крови не должна происходить пластическая деформация трубки и уменьшение толщины её стенок. Иначе, истончение сосудистой стенки может привести к образованию аневризм, что является критическим дефектом, приводящему к быстрому разрушению сосуда и серьезным сердечно-сосудистым заболеваниям.

Вследствие этого было проведено исследование зависимости прочностных и деформационных характеристик трубок на основе микроволокон из ПЛА от температуры их термообработки. На рис. 3.11 приведены диаграммы нагрузка-деформация трубок, обработанных при T = 40 - 160 ^{0}C.

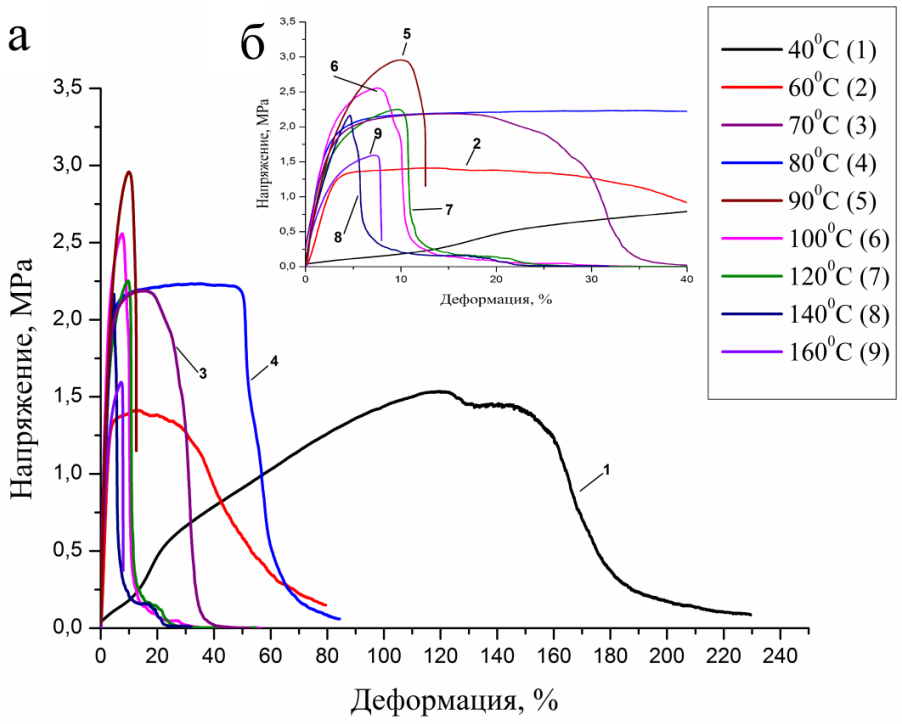


Рис. 3.11. Зависимости напряжения от деформации при растяжении трубок из ПЛА, обработанных при T = 40 - 160 ^{0}C (а) и фрагмент диаграммы (б)

Проанализировав полученные кривые, приведенные на рис. 3.11 а можно отметить, что температурная обработка существенно влияет на изменение характера зависимостей нагрузка-деформация. При температурах обработки выше 80 ºС резко уменьшается величина деформации образцов и повышается их прочность. Стоит отметить, что практически на всех кривых (рис. 3.11 б) наблюдается линейный участок, который демонстрирует наличие упругой составляющей деформации. Величина упругой деформации равна 2.5 – 3.0%, что является важным показателем для имплантатов сосудов. Зависимости величины напряжения и деформации при разрыве от температуры обработки приведены на рис. 3.12.

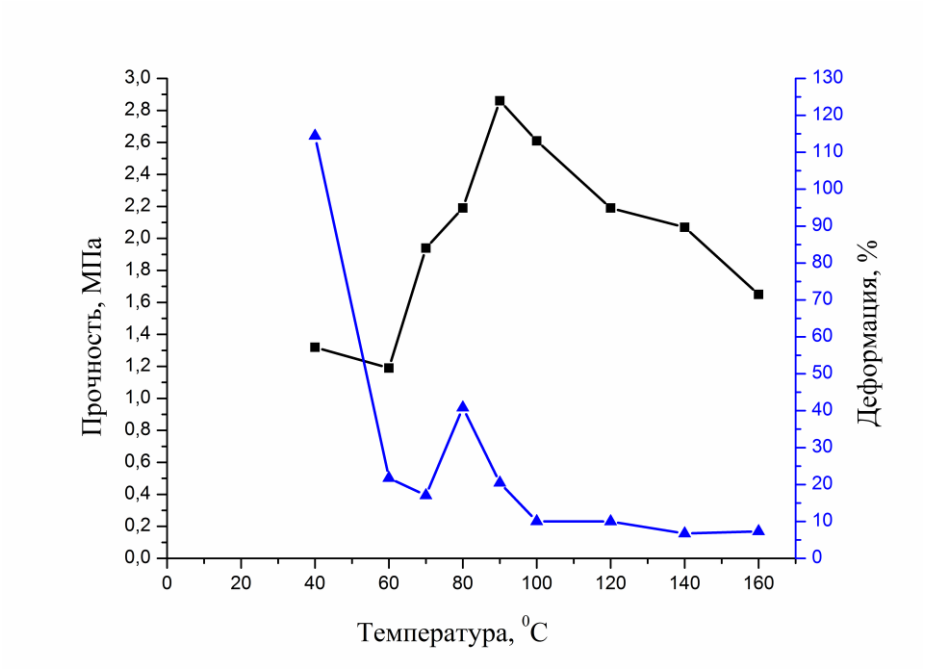


Рис. 3.12. Зависимости прочности и деформации при разрыве трубок из ПЛА, обработанных при Т = 40 – 160 ^{0}C

Из приведенных на рис. 3.12 данных следует, что максимальной прочностью ~ 3 МПа обладают трубки, обработанные при 90 ^{0}C, что более, чем в 10 раз, превышает значения давления, действующего на сосуды человека при прохождении через них потока крови [52][51]. Одновременно с этим, образец обладает достаточной эластичностью, позволяющей проводить хирургические манипуляции без его хрупкого разрушения. Такие механические свойства обусловлены не только характером укладки волокон, но и надмолекулярной структурой микроволокон из ПЛА. Как было показано выше в результатах дифракционных и ДСК-исследованиях, при температурах 80 - 100 ^{0}C происходит кристаллизация ПЛА и увеличивается его степень кристалличности. Именно это и обуславливает существенное повышение прочности, уменьшение пластической деформации. При увеличении температуры выше 110 °C происходит дальнейшая кристаллизация ПЛА (согласно табл. 3.3. кристалличность практически не растёт – скорее начинается термодеструкция материала ПЛА), что приводит к повышению хрупкости трубчатых образцов. Такие образцы невозможно использовать в хирургической практике.

На рис. 3.13 представлены кривые исследования деформационно-прочностных характеристик трубчатых образцов из ПКЛ.

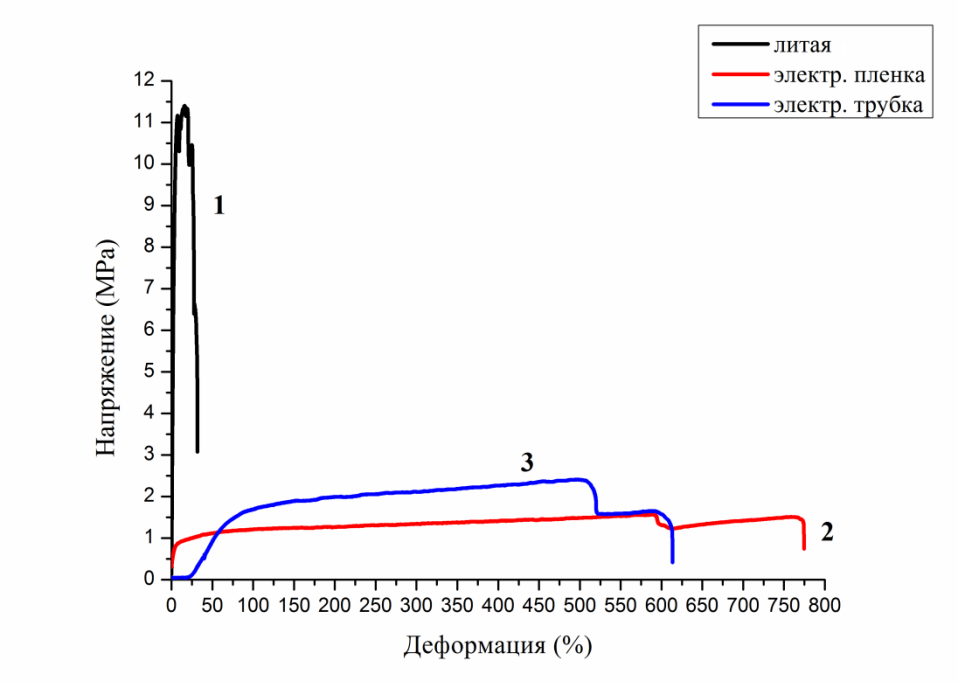


Рис. 3.13. Зависимости напряжения от деформации при растяжении литой (1), и микроволоконной пленок (2), а также трубки на основе микроволокон (3) из ПКЛ

Видно, что для матриц, полученных методом электроформования, и состоящих из микроволокон, характерен протяженный, практически горизонтальный участок деформации, величина которой достигает 500% (кривые 2 и 3). Вместе с тем, для пленки, полученной из раствора, величина деформации невелика и составляет ~ 20%. Можно предположить, что столь высокие значения величины пластической деформации материалов на основе микроволокон связаны не столько с деформацией самих ПКЛ микроволокон, а в большей степени с деформацией сетки из ПКЛ микроволокон, которая формируется на подложке в процессе электроформования.

В таблице 3.6 представлены значения модуля упругости, прочности и деформации трубок и пленки на основе микроволокон, а также литой пленки.

Таблица 3.6

Значения модуля упругости, прочности и деформации трубок и пленки на основе микроволокон, а также литой пленки

Тип образца	Толщина, мкм	Модуль упругости, МПа	Прочность, МПа	Деформация, %
Пленка литая	126.00±12.33	332.91±27.68	11.80±1.10	16.70±1.21
Пленка микроволоконная	196.00±12.50	16.48±1.74	1.36±0.14	345.97±187.12
Трубка микроволоконная	514.21±84.43	3.70±1.32	1.18±0.74	558.48±131.84

Трубки на основе микроволокон из ПКЛ обладают низкими показателями прочности, высокой пластической деформацией. Такие материалы, в отличии от трубок на основе микроволокон из ПЛА, нельзя рекомендовать в качестве имплантатов кровеносных сосудов. Однако, ПКЛ можно использовать в качестве материала для улучшения деформационных-прочностных свойств и кинетики резорбции микроволоконных матриц из ПЛА.

3.4. Результаты испытаний in vivo и in vitro

Важной характеристикой для материалов является отсутствие токсического действия как на организм, так и на окружающие ткани. Еще одним показателем является хорошая пролиферация клеток. Таким образом, материал не должен содержать вредных веществ и примесей, оказывающих отрицательный эффект на рост клеток.

Так как ПЛА и ПКЛ являются биодеградируемыми полимерами, то необходима оценка скорости резорбции материалов. Поэтому следующим этапом

исследования было проведение in vitro и in vivo тестов на микро- и нановолоконных материалах из ПЛА и ПКЛ.

3.4.1. Результаты исследования материалов в условиях in vitro

Для оценки пролиферативной активности пленочных материалов из ПЛА и ПКЛ на поверхности образцов культивировали клетки фибробластов кожи человека. На 5 сутки после культивирования проводилось исследование с помощью МТТ-теста.

На основе полученных результатов (рис. 3.14) можно сделать следующие выводы:

1. материалы из ПЛА и ПКЛ являются нетоксичными, но по сравнению с контролем пролиферативность клеток на них ниже;
2. клетки хуже растут на образцах из ПКЛ, чем из ПЛА, что обусловлено структурой микроволокон и пористостью материала, а также адгезивными свойствами ПКЛ.

Также были получены микрофотографии (рис. 3.15), на которых положительная динамика роста клеток, что свидетельствует о хорошей адгезии и отсутствие токсического эффекта материала.

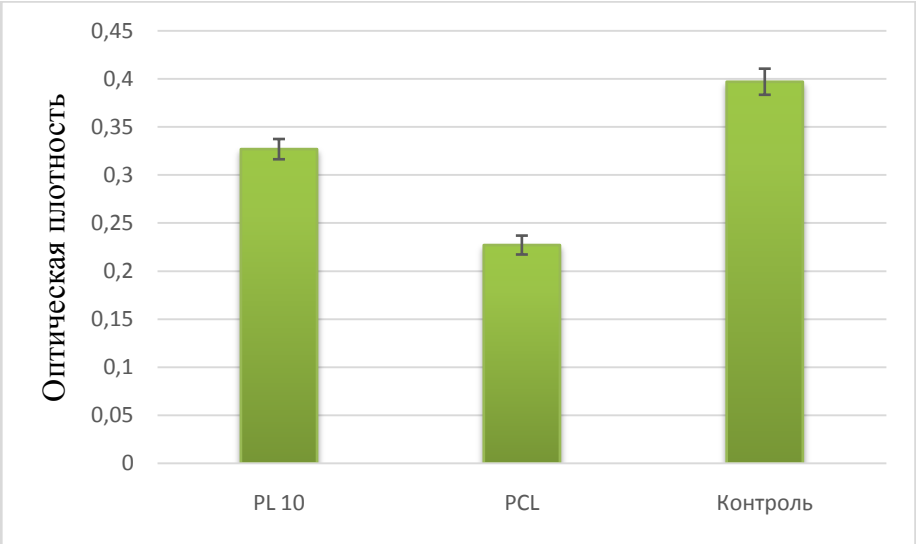


Рис. 3.14. Оценка клеточной активности фибробластов человека на 5 день на пленочных образцах из ПЛА и ПКЛ

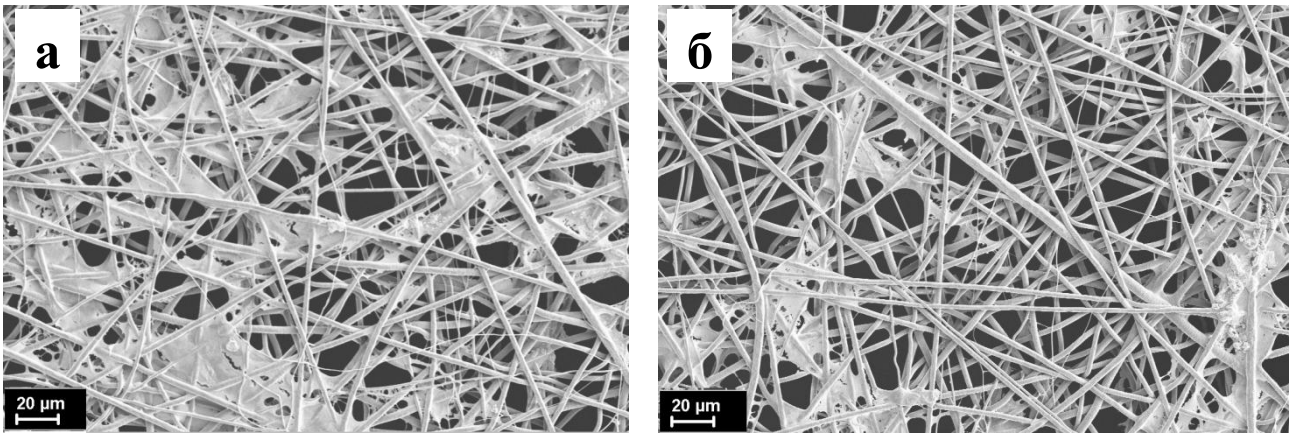


Рис. 3.15. Микрофотографии материалов из ПЛА (а) и ПКЛ (б) с населенными на них фибробластами на 5 сутки культивирования

3.4.2. Результаты исследований материалов в условиях in vivo

3.4.2.1. Результаты исследования процессов резорбции при внутримышечном и субфасциальном введении

Исследование процессов резорбции пленочных материалов из ПЛА показало следующие результаты. При внутримышечном введение на 14 сутки наблюдения среди поперечно-полосатых миоцитов, отмечается крупная макрофагальная гранулема, прорастающая в полупрозрачные нити полилактида (Приложение 1, рис. 2). Кроме того, в составе инфильтрации вокруг инородного тела выявляются многочисленные гигантские многоядерные клетки типа инородных тел, мелкие очаги скопления полиморфноядерных лейкоцитов и немногочисленные в поле зрения лимфоциты. К 183 суткам эксперимента отмечается резорбция полилактида в гранулеме, полупрозрачные нити наблюдаются лишь в цитоплазме гигантских многоядерных клеток типа инородных тел. Наряду с этим гранулемы подвергаются организации в виде перифокального образования рубцовой ткани (рис. 3.16).

Морфогистологическое исследование пленок из ПЛА, имплантированных субфасциально на 14 сутки наблюдения, в волокнистой соединительной ткани фасции показало наличие многочисленных небольших макрофагальных гранулем с гигантскими многоядерными клетками инородных тел, окружающие нити полилактида. К 183 суткам эксперимента в объеме

материала выявляется фрагмент поперечно-полосатой мышечной ткани, с небольшим участком фасции.

Таким образом, на 183 сутки наблюдается полная резорбция полилактида: образцы не были обнаружены ни на макропрепарате, ни на биопсийном препарате.

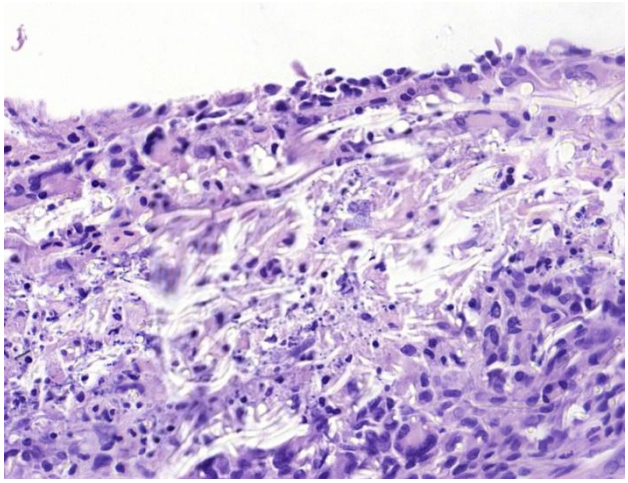


Рис. 3.16. Гистологический снимок материала из полилактида при внутримышечном через 14 дней. Окраска гематоксилин эозин. На 14 сутки нити полилактида находятся в гранулеме, отмечается инфильтрация нейтрофильными лейкоцитами

Микроскопическое исследование пленок из ПКЛ, имплантированных внутримышечно на 14 сутки наблюдения, показало наличие среди поперечно-полосатых миоцитов крупного очага лимфомакрофагальной инфильтрации с примесью большого числа нейтрофильных лейкоцитов, окружающего инородное тело (Приложение 1, рис. 1). К 183 суткам эксперимента (рис. 3.17 А) в поперечно-полосатой мышечной ткани сформировалась крупная макрофагальная гранулема с небольшими очагами инфильтрации лимфоцитами и многочисленными гигантскими многоядерными клетками инородных тел.

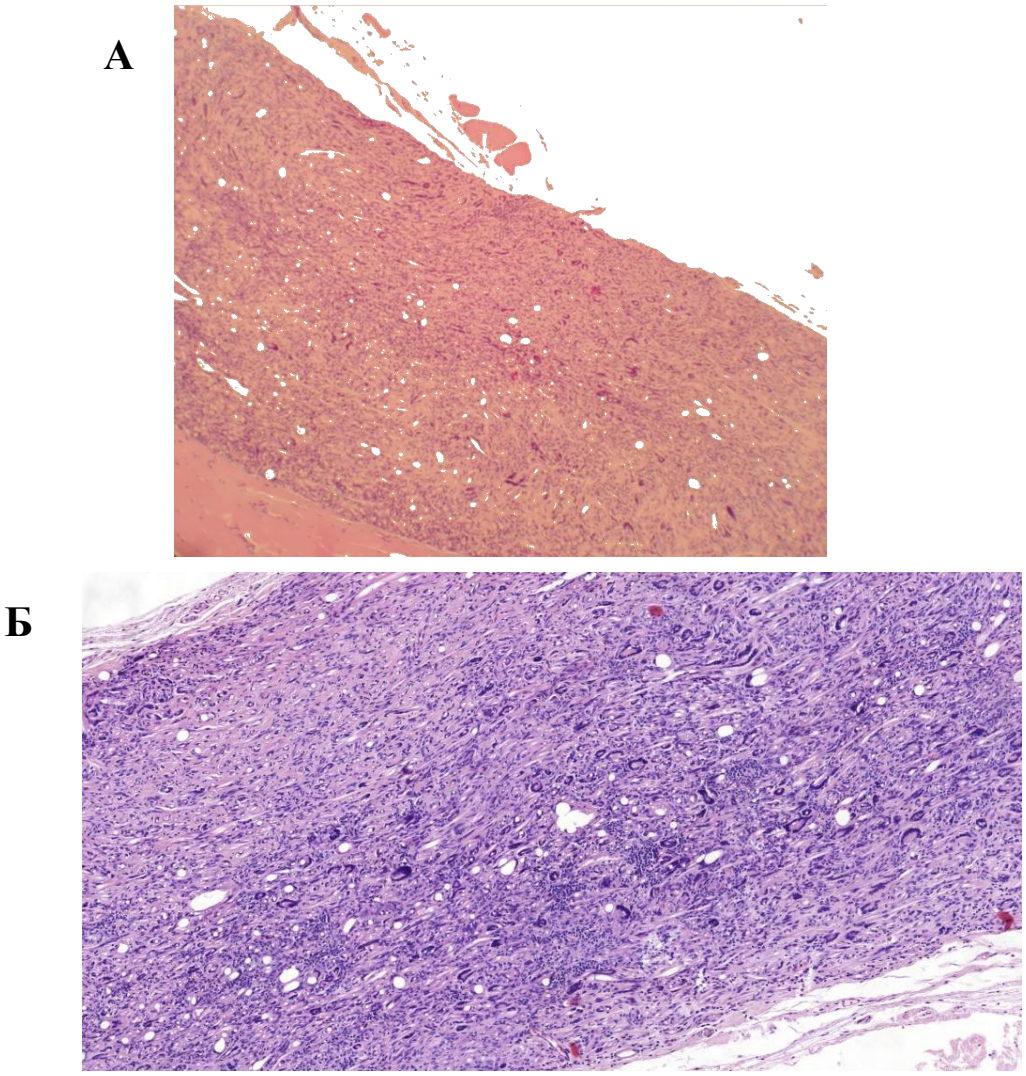


Рис. 3.17. Снимки гистологических срезов материалов из поликапролактона при внутримышечном (А) и субфасциальном (Б) введение через 183 дней. Окраска гематоксилин эозин. Увеличение х100. А - отмечается макрофагальная гранулема с гигантскими многоядерными клетками инородных тел Б - отмечается гранулема с очагами лимфоцитарной инфильтрации и гигантскими многоядерными клетками инородных тел

Через 14 суток при исследование пленок из ПКЛ, введенных субфасциально, наблюдается фрагмент поперечно-полосатой мышечной ткани с прилежащей фасцией. Среди волокон соединительной ткани фасции выявляются крупные макрофагальные гранулемы, окружающие инородные тела, с немногочисленными гигантскими многоядерными клетками типа инородных тел и небольшими, разрозненными очагами инфильтрации лимфоцитами. На 183 сутки эксперимента (3.17 Б) в ткани фасции отмечается очаг разрастания грубоволокнистой соединительной ткани с инфильтрацией

макрофагами и немногочисленными лимфоцитами с многочисленными гигантскими многоядерными клетками типа инородных тел. В данном случае на макропрепарате хорошо наблюдается пленочный образец, что подтверждается гистологическим исследованием. Таким образом, полученные данные демонстрируют, что резорбция материалов из ПКЛ является длительным процессом по сравнению с материалами из ПЛА.

3.4.2.2. Исследование процессов резорбции и образования новых тканей на основе полимерной матрицы, имплантированной в кровеносное русло

Для изучения процесса резорбции и образования новых тканей на основе полимерной матрицы, имплантированной в кровеносное русло, были выбраны следующие материалы:

1. трубка из ПЛА. Исследование проводили на 2 сутки, 2, 4, 8, 24, 48 неделях. Данный образец рассматривали как контрольный, за счет быстрых сроков резорбции по сравнению с ПКЛ.

2. трубка, состоящая из внутреннего слоя из ПЛА и наружным из ПКЛ. Эксперимент проводили на 2 сутки, 4, 8, 48 недель.

Также была проведена имплантация следующих матриц:

1. трубка из ПКЛ.

2. трубка с внутренним слоем из ПКЛ и наружным из ПЛА.

Данные образцы нецелесообразно учитывать в работе на основании литературных данных и результатов in vitro. Сроки резорбции ПКЛ достигают 3 лет, следовательно использовать трубчатые материалы из ПКЛ в качестве контроля нерационально. Образец с внутренним слоем ПКЛ стоит рассматривать на более поздних сроках.

Морфогистологический анализ трубок из ПЛА на 2-е сутки исследования показал, что не возникает признаков острой воспалительной реакции, происходит покрытие внутренней поверхности матрицы и заполнение пор между волокнами фибрином, но на таком сроке еще не наблюдается резорбция микрово-

локон. Выявляются нейтрофилы, лимфоциты, единичные фибробласты, а также клетки крови (рис. 3.18 а, б). Следует отметить, что на всех рассматриваемых сроках имплантации отсутствует гиперплазия в областях анастомозов.

Через 2 недели эксперимента сохраняется проходимость имплантированных матриц, отсутствуют дефекты в зоне анастомоза. С внутренней стороны происходит формирование эндотелиального и субэндотелиального слоев. С наружной стороны имплантата наблюдаются макрофаги и фибробласты, также происходит формирование тонких коллагеновых волокон. Продолжается процесс заселения матрицы клетками, преимущественно в наружной части стенки. Толщина соединительнотканной капсулы увеличивается.

Гистологический анализ через 4 неделе показал, что имплантируемая матрица с внутренней стороны полностью покрыта эндотелием. По всей длине имплантата наблюдается субэндотелиальный слой, содержащий тонкую сеть коллагеновых волокон. Стенки матрицы заполнены клетками, а именно макрофагами и фибробластами. Следует отметить, что со стороны адвентиции толщина коллагеновых волокон меньше.

Биорезорбция микро- и нановолокон из ПЛА начинает наблюдаться через 8 недель. Происходит фрагментация волокон и появляется пористая структура. Увеличивается толщина неоинтимы, продолжается рост клеток и появляются многочисленные многоядерные клетки инородных тел (рис. 3.18 в, г).

На сроках 24 неделе на микроволокнах можно наблюдать многочисленные поперечные трещины и их выраженную пористую структуру. Морфологический анализ указывает на полностью сформированные слои эндотелия и субэндотелия. Стенки матрицы пронизаны коллагеновые волокнами по всей длине и увеличивается количество клеток. Снаружи матрицы окружена соединительнотканной капсулой с гигантскими многоядерными клетками инородных тел.

Через 48 недель микроволокна ПЛА можно увидеть в виде отдельных фрагментов, окруженных соединительной тканью. Неоинтима представлена плотно расположенными коллагенновыми волокнами и единичными эластич-

ными. Стенка матрицы выстлана макрофагами, фибробластами и неупорядоченными пучками коллагеновых волокон. В результате резорбции ПЛА образуются полости между фрагментами волокон, которые заполняются слабооксифильным содержимым. Наружная капсула содержит рыхлую волокнистую соединительную ткань с сосудами и гигантские многоядерные клетки инородных тел.

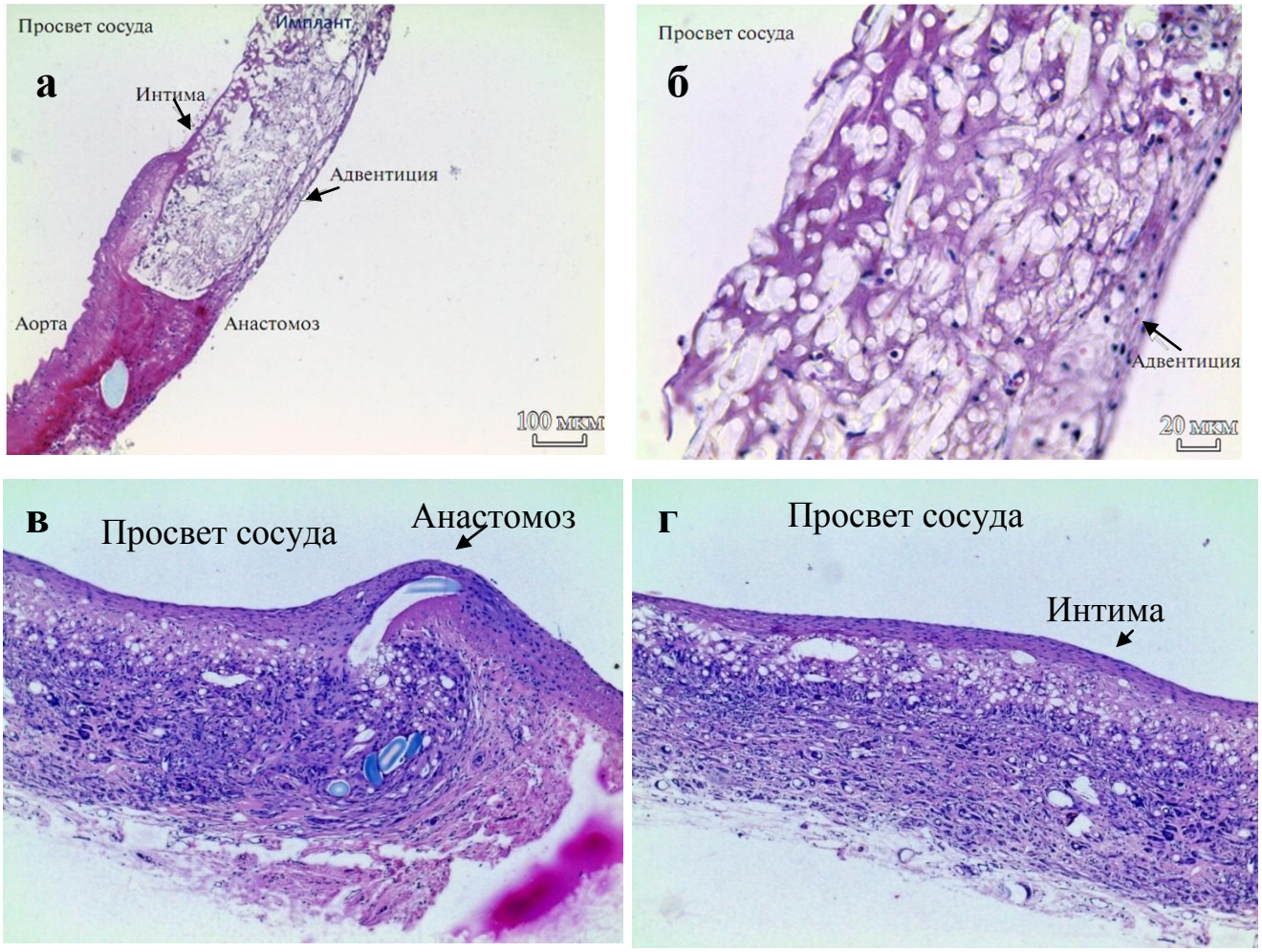


Рис. 3.18. Гистологические снимки продольного среза имплантируемого сосуда из полилактида через 2суток (а, б) и 2 месяца (в, г) после операции в зоне анастомоза (а, в) и стенки (б, г).

Теперь рассмотрим трубки из ПЛА и ПКЛ. Через 2 суток матрица остается проходимой, отсутствует образование острых воспалительных реакций. Анало-

гично, как и в имплантируемой матрице из ПЛА на 2 сутки происходит выстилка внутренней поверхности и заполнение пор (рис. 3.19 а).

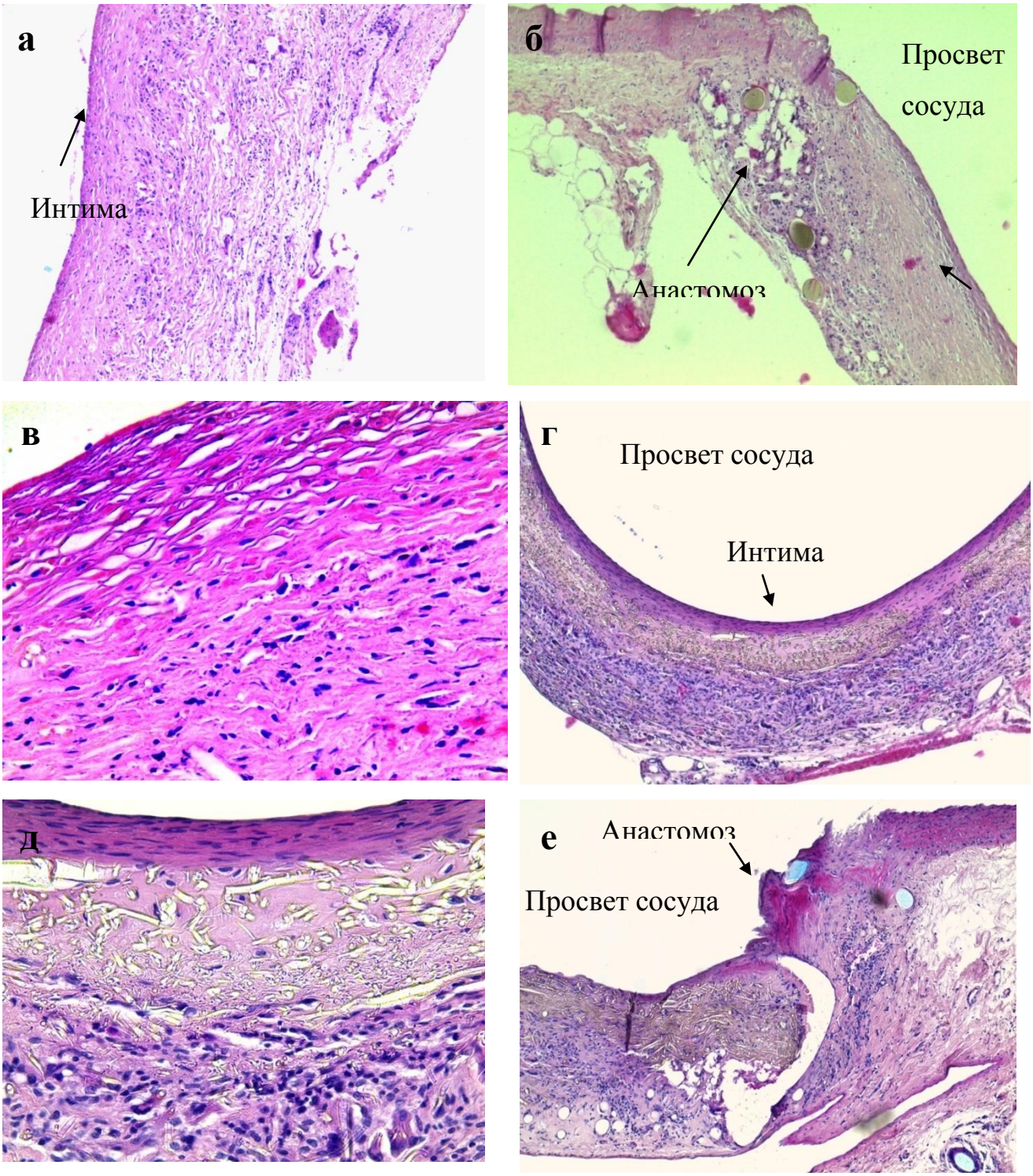


Рис. 3.19. Гистологические снимки срезов имплантируемого сосуда из полилактида и поликапролактона через 4 (а), 8 (б, в) и 48 недель (г, д, е) после операции в зоне анастомоза (б, е) и стенки (а, в, г, д).

Через 4 недели происходит формирование неоинтимы с внутренней стороны имплантируемого сосуда. Стенка матрицы населена макрофагами, фибробластами, также происходит образование коллагеновых волокон и фрагментирование микроволокон из полилактида. В слое из ПКЛ наблюдаются многочисленные многоядерные клетки инородных тел (рис. 3.19 б, в).

Через 48 неделю морфогистологический анализ показал, что слой из ПКЛ хорошо фрагментирован, формируется пористая структура, продолжается рост клеток. Слой неоинтимы полностью сформирован, пронизан пучками коллагеновых и эластичных волокон. Начинается резорбция слоя из ПКЛ. Снаружи матрица окружена соединительнотканной капсулой (рис. 3.19 г, д, е).

Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что совместное использование полилактида и поликапролактона с послойным нанесением не ухудшают качество и свойства имплантата. За счет долгих сроков резорбции ПКЛ происходит формирование достаточного слоя неоинтимы сосуда, что способствует лучшей пролиферации клеток и прочности вновь образуемого сосуда.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе, посвященной разработке материалов на основе микро- и нановолокон из полилактида и поликапролактона, были проведены исследования свойств растворов этих полимеров. На основании результатов измерения значения поверхностного натяжения, электропроводности и реологических характеристик растворов полимеров были подобраны оптимальные параметры получения микроволокони трубок на их основе методом электроформования.

Структура полученных материалов была исследована с помощью методов рентгеноструктурного анализа, дифференциальной сканирующей калориметрии и сканирующей электронной микроскопии. Показано, что свежесформованные микроволокна из полилактида имеют аморфную структуру, трубчатые образцы на их основе не отвечают требованиям для имплантатов кровеносных сосудов. Были получены зависимости деформационно-прочностных характеристик полилактидных трубок от температуры обработка. На основании полученных результатов был определен оптимальный диапазон температур, T = 80 - 100 ºC, при котором трубки обладают оптимальным сочетанием прочности, упругости и эластичности.

Сформованные образцы трубок на основе нановолокон из поликапролактона характеризуются кристаллической структурой, как и исходные гранулы. Их прочностные и деформационные характеристики не позволяют их рекомендовать в качестве имплантатов кровеносных сосудов.

Для оценки пролиферативной активности клеток на матрицах из полилактида и поликапролактона были проведены экспериментальные исследования in vitro. На 5 сутки после культивирования наблюдался активный рост клеток, заполнение пористой структуры клеточными кластерами.

Оценку кинетики резорбции образцов проводили на двух моделях: при внутримышечном и субфасциальном введение в крысу на сроки 14 и 183 дня, при имплантации материала в кровеносное русло, а именно брюшную часть аорты крысы (сроки 2 суток, 4, 8, 48 недель). На 183 сутки матрицы из полилак-

тида при внутримышечном и субфасциальном введение не были обнаружены как на макропрепарате, так и при морфогистологическом анализе места имплантации и окружающих тканей, что нельзя наблюдать для образцов из поликапролактона. Морфогистологический анализ на 183 сутки матриц показал наличие гранулемы с очагами лимфоцитарной инфильтрации и гигантскими многоядерными клетками инородных тел и отсутствие начала резорбции, что характерно для данного полимера (сроки полного разрушения до 3 лет).

Исследование резорбции в кровеносном русле также демонстрирует положительные результаты по отношению к имплантатам из полилактида. Через 48 недель внутренний слой матрицы выстлан плотным слоем эндотелия, стенки пронизаны пучками коллагеновых и эластичных волокон и обильно заселены клетками. Нановолокна из полилактида сильно фрагментированы. Просвет сосуда чистый, не наблюдается тромбозов и аневризм. Аналогичная ситуация наблюдается и на образцах с внешним слоем из поликапролактона и внутренним из полилактида. Отличительной особенностью является усиленный каркас из поликапролактоновых микроволокон, который служит дополнительной механической поддержкой, способствует дальнейшему процессу образования нативной ткани и лучшим деформационно-прочностным свойствам.

Таким образом, были получены полимерные матрицы на основе микро- и нановолокон из полилактида и поликапролактона. Данные материалы можно использовать в качестве имплантатов для сосудистой хирургии. Они обладают всеми требуемыми характеристиками: эластичные, прочные, упругие, отсутствует негативный эффект как от полимера, так и от продуктов резорбции, тромборезистентны, удобны для проведения хирургических операций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агапова О.И., Агапов И.И. Биодеградируемые изделия на основе фиброина шелка для тканевой инженерии и регенеративной медицины / О.И. Агапова, И.И. Агапов, Москва: Техносфера, 2018. 12–13 с.

2. Антонова Л.В., Насонова М.В., Кудрявцева Ю.А., Головкин А.С. Возможности использования полиоксиалканоатов и поликапролактона в качестве сополимерной основы для создания тканеинженерных конструкций в сердечно - сосудистой хирургии // Бюллетень сибирской медицины. 2012. № №1. Р. 2012.

3. Антонова Л.В., Матвеева В.Г., Борисов В.В., Кремено С.В., Насонова А.С., Кудрявцева М.В., Головкин Ю.А. Тканеинженерный матрикс, модифицированный биологически активными молекулами для направленной регенерации тканей // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2016. (№1). Р. 18–25.

4. Добровольская И.П., Юдин В.Е., Попрядухин П.В., Иванькова Е.М. 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.

5. Добровольская И.П., Завражных Н.А., Попрядухин П.В., Касаткин И.А., Попова Е.Н., Иванькова Е.М., Сапрыкина Н.Н., Юдин В.Е. Структура и термомеханические свойства трубок на основе микроволокон из поли(L-лактида) // Высокомолекулярные соединения. Серия А. 2020. № 4 (62). Р. 1–8.

6. Еремеев А.В., Светлаков А.В., И.Н Б., В.В В., Арапов В.А. Функции культивируемыз эмбриональных клеток на коллаген-хитозановой матрице // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, Том 4, №2. 2009. Р. 55–62.

7. Завражных Н.А., Добровольская И.П., Юдин В.Е. Имплантаты сосудов на основе нановолокон из поли(L-лактида) // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Научные исследования и разработки в области дизайна и технологий». 2019. (291). Р. 124–126.

8. Завражных Н.А., Юдин В.Е., Добровольская И.П., Попрядухин П.В. Получение и исследование свойств пористых материалов на основе нановолокон из полилактида для сосудистой хирургии // Неделя науки СПбПУ: материалы научной конференции с международным участием, 19-24 ноября 2018 года. Институт биомедицинских систем и технологий. 2018. (235). P. 65–68.

9. Завражных Н.А., Юдин В.Е., Добровольская И.П., Попрядухин П.В. Получение и исследование свойств пористых материалов на основе нановолокон из полилактида для тканевой инженерии // Тезисы докладов Третьей международной конференции со школой молодых ученых «Физика — наукам о жизни». 2019. P. 184.

10. Завражных Н.А., Добровольская И.П., Касаткин И.А., Иванькова Е.М., Юдин В.Е. Структура материалов на основе микроволокон из поли(L-лактида) // Неделя науки СПбПУ : материалы научной конференции с международным участием, 18–23 ноября 2019 г. Институт биомедицинских систем и биотехнологий. В 2 ч. Ч. 2. Высшая школа биомедицинских систем и технологий. 2019. (159). P. 13–16.

11. Марихин В.А., Мясникова Л.П. Надмолекулярная структура полимеров / В.А. Марихин, Л.П. Мясникова, Химия-е изд., Ленинград:, 1977.

12. Перепелкин К.Е. Физико-химические основы формования химических волокон / Перепелкин К.Е., Москва:, 1978.

13. Попов Г.И. Разработка и оценка эффективности тканеинженерного сосудистого имплантата на основе биодеградируемой полимерной матрицы // Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук (14.01.26). 2018. 237 с.

14. Попов Г.И., Попрядухин П.В., Добровольская И.П., Юдин В.Е., Вавилов В.Н., Юкина Г.Ю., Иванькова Е.М. Разработка и оценка эффективности матрицы из L-полилактида для создания тканеинженерного сосудистого имплантата // Ангиология и сосудистая хирургия. 2018. (24 №1). P.

39–45.

15. Регель В.Р., Слуцкер А.И., Томашевский Э.Е. Кинетическиая природа прочности твердых тел / В.Р. Регель, А.И. Слуцкер, Э.Е. Томашевский, Москва: Наука, 1974.

16. Севостьянова В.В., Elgudin Y.L., Wnek G.E., Lubysheva S., Emancipator T., Головкин А.С., Барбараш Л.С. Свойства тканеинженерных матриксов из поликапролактона, импрегнированных факторами роста VEGF и bFGF // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2012. № 3 (VII). P. 62–67.

17. Севостьянова В.В., Миронов А.В., Глушкова Т.В., Бураго А.Ю., Матвеева В.Г., Антонова Л.В., Кудрявцева Ю.А., Сейфалиан А.М., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С. Регенерация кровеносного сосуда на основе графта из поликапролактона в экспериментальном исследовании // Сибирский медицинский журнал. 2016. № 1 (31). P. 53–57.

18. Струков А.И., Серов В.В. Патологическая анатомия: учебник / А.И. Струков, В.В. Серов, Москва: Литтерра, 2010. 880 с.

19. Шишацкая Е.И. Клеточные матриксы из резорбируемых полигидроксиалканатов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, Том 2, №2. 2007. № 3912. P. 68–75.

20. Шишкова Д.К., Насонова М.В., Кудрявцева Ю.А., Shishkova D.K., Nasonova M. V, Kudryavtseva Y.A. Исследование биодеградируемых матриц, изготовленных для сердечно-ссудистой хирургии // Сибирский медицинский журнал. 2016. № 2 (31). P. 116–119.

21. Abedalwafa M., Wang F., Wang L., Li C. Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: A review // Reviews on Advanced Materials Science. 2013. № 2 (34). P. 123–140.

22. Agapova O.I. Silk fibroin and spidroin bioengineering constructions for regenerative medicine and tissue engineering // Sovremennye Tehnologi iv Medicine. 2017. № 2 (9). P. 190–204.

23. Armentano I., Dottori M., Fortunati E., Mattioli S., Kenny J.M.

Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review // Polymer Degradation and Stability. 2010. (95). P. 2126–2146.

24. Azimi B., Nourpanah P., Rabiee M., Arbab S. Poly (ε-caprolactone) fiber: An overview // Journal of Engineered Fibers and Fabrics. 2014. № 3 (9). P. 74–90.

25. Barnard J., Millner R. A Review of Topical Hemostatic Agents for Use in Cardiac Surgery // Annals of Thoracic Surgery. 2009. № 4 (88). P. 1377–1383.

26. Barnes C.P., Sell S.A., Boland E.D., Simpson D.G., Bowlin G.L. Nanofiber technology: designing the next generation of tissue engineering // Advanced Drug Delivery Reviews. 2007. (59). P. 1413–1433.

27. Baumgartner P.K. No // J. Coll. Inter. Sci. 1971. (36). P. 71.

28. Bogart J.W.C. Van, Gibson P.E., Cooper S.L. Structure-Property Relationships in Polycaprolactone-Polyure thanes 1983. (21). P. 65–95.

29. Brizzolara D., Cantow H.J., Diederichs K., Keller E., Domb A.J. Mechanism of the stereocomplex formation between enantiomeric poly(lactide)s // Macromolecules. 1996. № 1 (29). P. 191–197.

30. Browning M.B., Dempsey D., Guiza V., Becerra S., Rivera J., Russell B., Höök M., Clubb F., Miller M., Fossum T., Dong J.F., Bergeron A.L., Hahn M., Cosgriff-Hernandez E. Multilayer vascular grafts based on collagen-mimetic proteins // Acta Biomaterialia. 2012. № 3 (8). P. 1010–1021.

31. Chin-San Wu A comparison of the structure, thermal properties, and biodegradability of polycaprolactone/chitosan and acrylic acid grafted polycaprolactone/chitosan // Polymer. 2005. № 1 (46). P. 147–155.

32. Dash T.K., Konkimalla V.B. Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review // Journal of Controlled Release. 2012. № 1 (158). P. 15–33.

33. Deng C., Fengfu L., May G., Marc R., J. S.E. Application of chitosan-based biomaterials for blood vessel regeneration // Macromolecular Symposia. 2010. № 1 (297). P. 138–146.

34. Denis P., Dulnik J., Sajkiewicz P. Electrospinning and structure of

bicomponent polycaprolactone/gelatin nanofibers obtained using alternative solvent system // International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials. 2015. № 7 (64). P. 354–364.

35. Dick, A. S., Basu K. from the SAGE Social Science Collections . All Rights // Hispanic Journal of Behavioral Sciences. 1987. № 2 (9). P. 183–205.

36. Dobrovolskaya I.P., Popryadukhin P. V., Yudin V.E., Ivan'kova E.M., Elokhovskiy V.Y., Weishauptova Z., Balik K. Structure and properties of porous films based on aliphatic copolyamide developed for cellular technologies // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2015. № 1 (26). P. 1–10.

37. Dobrovolskaya I.P., Yudin V.E., Popryadukhin P. V., Ivan'kova E.M., Shabunin A.S., Kasatkin I.A., Morgantie P. Effect of chitin nanofibrils on electrospinning of chitosan-based composite nanofibers // Carbohydrate Polymers. 2018. (194). P. 260–266.

38. El-Hadi A.M. Miscibility of crystalline/amorphous/crystalline biopolymer blends from PLLA/PDLLA/PHB with additives // Polymer - Plastics Technology and Engineering. 2018. № 1 (58). P. 31–39.

39. Eling B., Gogolewski S., Pennings A.J. Biodegradable materials of poly(L-lactic acid): 1.Melt-spun and solution-spun fibers // Polymer. 1982. (23). P. 1587–1593.

40. Gaumer J., Prasad A., Lee D., Lannutti J. Structure-function relationships and source-to-ground distance in electrospun polycaprolactone // Acta Biomaterialia. 2009. № 5 (5). P. 1552–1561.

41. Go A.S. … Turner M.B. Heart disease and stroke statistics-2013 update: A Report from the American Heart Association // Circulation. 2013. № 1 (January 1/). P. 1–214.

42. Guhathakurta S., Galla S., Ramesh B., Venugopal J.R., Ramakrishna S., Cherian K.M. Nanofiber-reinforced biological conduit in cardiac surgery : preliminary report // Asian Cardiovascular & Thoracic Annals. 2011. (19(3/4)). P. 207–212.

43. Hadasha W., Bezuidenhout D. Poly(lactid acid) as biomaterial for cardiovascular devices and tissue engeneering applications // Springer International Publishing AG 2017. 2017. № 1 (27).

44. Hara S., Watanabe S., Takahashi K., Shimizu S., Ikake H. Preparation of crystallites for oriented poly(Lactic Acid) films using a casting method under a magnetic field // Polymers. 2018. (10). P. 1–9.

45. Hoogsteen W., Postema A.R., Pennings A.J., Brinke G. Ten, Zugenmaier P. Crystal Structure, Conformation, and Morphology of Solution-Spun Poly(L-Lactide) Fibers // Macromolecules. 1990. № 2 (23). P. 634–642.

46. Hutmacher D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage // The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium. 2000. (21). P. 175–189.

47. Iqbal M., Xiaoxue S.Æ. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications // J Mater Sci (2009). 2009. № 44. P. 5713–5724.

48. Izquierdo R., Garcia-Giralt N., Rodriguez M.T., Cáceres E., García S.J., Gómez Ribelles J.L., Monleón M., Monllau J.C., Suay J. Biodegradable PCL scaffolds with an interconnected spherical pore network for tissue engineering // Journal of Biomedical Materials Research - Part A. 2008. № 1 (85). P. 25–35.

49. Jixin X., Bei F., Rui Z., Yang L., Guangdong Z., Wei L., Yilin C., Yanzhong Z., Jie Z.W. Engineering ear-shaped cartilage using electrospun fibrous membranes of gelatin/polycaprolactone // Biomaterials. 2013. № 11 (34). P. 2624–2631.

50. Kołbuk D., Sajkiewicz P., Maniura-Weber K., Fortunato G. Structure and morphology of electrospun polycaprolactone/gelatine nanofibres // European Polymer Journal. 2013. № 8 (49). P. 2052–2061.

51. Konig G., McAllister T.N., Dusserre N., Garrido S.A., Iyican C., Marini A., Fiorillo A., Avila H., Wystrychowski W., Zagalski K., Maruszewski M., Jones A.L., Cierpka L., la Fuente L.M. de, L’Heureux N. Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery // Biomaterials. 2009. № 8 (30). P. 1542–1550.

52. Lamm P., Juchem G., Milz S., Schuffenhauer M., Reichart B. Autologous endothelialized vein allograft: A solution in the search for small-caliber grafts in coronary artery bypass graft operations // Circulation. 2001. № SUPPL. 1 (104). P. 108–114.

53. Leenslag J.W., Pennings A.J. Synthesis of high-molecular-weight poly(clactide) initiated with tin 2-ethylhexanoate // Macromol. Chem. 1987. (1814). P. 1809–1814.

54. Liu C., Xia Z., Czernuszka J.T. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engeneering // Chemical Engineering Research and Design. 2007. (85(A7)). P. 1051–1064.

55. Mohamed R.M., Yusoh K. A review on the recent research of polycaprolactone (PCL) // Advanced Materials Research. 2016. (1134). P. 249–255.

56. Moisenovich M.M., Pustovalova O., Shackelford J., Vasiljeva T. V., Druzhinina T. V., Kamenchuk Y.A., Guzeev V. V., Sokolova O.S., Bogush V.G., Debabov V.G., Kirpichnikov M.P., Agapov I.I. Tissue regeneration in vivo within recombinant spidroin 1 scaffolds // Biomaterials. 2012. № 15 (33). P. 3887–3898.

57. Patrício T., Domingos M., Gloria A., Bártolo P. Characterisation of PCL and PCL / PLA scaffolds for tissue engineering // Procedia - Social and Behavioral Sciences. 2013. (5). P. 110–114.

58. Popryadukhin P. V., Popov G.I., Dobrovolskaya I.P., Yudin V.E., Vavilov V.N., Yukina G.Y., Ivan’kova E.M., Lebedeva I.O. Vascular Prostheses Based on Nanofibers from Aliphatic Copolyamide // Cardiovascular Engineering and Technology. 2016. № 1 (7). P. 78–86.

59. Popryadukhin P. V., Popov G.I., Yukina G.Y., Dobrovolskaya I.P., Ivan’Kova E.M., Vavilov V.N., Yudin V.E. Tissue-Engineered Vascular Graft of Small Diameter Based on Electrospun Polylactide Microfibers // International Journal of Biomaterials. 2017.

60. Postema A.R., Luiten A.H., Pennings A.J. High-strength poly(L-lactide) fibers by a dry-spinning/hot-drawing process. I. Influence of the ambient temperature

on the dry-spinning process // Journal of Applied Polymer Science. 1990. № 6 (39). P. 1265–1274.

61. Remya K.R., Joseph J., Mani S., John A., Varma H.K., Ramesh P. Nanohydroxyapatite incorporated electrospun polycaprolactone/ polycaprolactone-polyethyleneglycol-polycaprolactone blend scaffold for bone tissue engineering applications // Journal of Biomedical Nanotechnology. 2013. № 9 (9). P. 1483–1494.

62. Ren J., Adachi K. Dielectric relaxation in blends of amorphous poly(DL-lactic acid) and semicrystalline poly(L-lactic acid) // Macromolecules. 2003. № 14 (36). P. 5180–5186.

63. Rohner D., Hutmacher D.W., Cheng T.K., Oberholzer M., Hammer B. In vivo efficacy of bone-marrow-coated polycaprolactone scaffolds for the reconstruction of orbital defects in the pig // Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials. 2003. № 2 (66). P. 574–580.

64. Sankaran K.K., Krishnan U.M., Sethuraman S. Axially aligned 3D nanofibrous grafts of PLA – PCL for small diameter cardiovascular applications // Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. 2014. № 16 (25). P. 37–41.

65. Schiffman J.D., Schauer C.L. A review: Electrospinning of biopolymer nanofibers and their applications // Polymer Reviews. 2008. № 2 (48). P. 317–352.

66. Schnell E., Klinkhammer K., Balzer S., Brook G., Klee D., Dalton P., Mey J. Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly-ε-caprolactone and a collagen/poly-ε-caprolactone blend // Biomaterials. 2007. № 19 (28). P. 3012–3025.

67. Search H., Journals C., Contact A., Iopscience M., Address I.P. Fabrication of modified and functionalized polycaprolactone nanofibre (2138).

68. Singh S., Ray S.S. Polylactide based nanostructured biomaterials and their applications // Journal of Nanoscience and Nanotechnology. 2007. № 8 (7). P. 2596–2615.

69. Sridhar R., Venugopal J.R., Sundarrajan S., Ravichandran R., Ramalingam B., Ramakrishna S. Electrospun nanofibers for pharmaceutical and medical

applications // Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2011. № 6 (21). P. 451–468.

70. Wee D., Toong Y., Toh H.W., Chen J., Ng K., En P., Wong H., Huang Y. Bioresorbable polymeric scaffold in cardiovascular applications // Int. J. Mol. Sci. 2020. № 21, 3444. P. 1–35.

71. Woodward S.C., Brewer P.S., Moatamed F., Schindler A., Pitt C.G. The intracellular degradation of poly(ε-caprolactone) // Journal of Biomedical Materials Research. 1985. № 4 (19). P. 437–444.

72. Zavrazhnykh N.A., Dobrovolskaya I.P., Yudin V.E. Proporties of tubes based on nanofibers from poly(L-lactide) // 15th International Saint Petersburg Coference of Young Scientists «Modern problems of polymer science».

73. Zdrahala R.J. Small caliber vascular grafts. Part I: State of the art // Journal of Biomaterials Applications. 1996. № 4 (10). P. 309–328.

74. Zhang J., Duan Y., Sato H., Tsuji H., Noda I., Yan S., Ozaki Y. Crystal modifications and thermal behavior of poly(L-lactic acid) revealed by infrared spectroscopy // Macromolecules. 2005. № 19 (38). P. 8012–8021.

75. Zhou H., Green T.B., Lak Y. The thermal effects on electrospinning of polylactic acid melts // Polymer. 2006. (47). P. 7497–7505.

76. Zhuravleva I.Y., Zhuravleva A.S., Zhulkov M.O., Aleshkovich N.P., Karaskov A.M. Biological analogs of infrainguinal arteries: Evolution and development prospects (review) // CTM. 2017. № 4 (9). P. 217–226.

77. World Health Organization [Электронный ресурс]. URL: https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-d.

78. Centers for Disease Control and Prevention // Heart Disease Facts [Электронный ресурс]. URL: https://www.cdc.gov/heartdisease/facts.htm.

Приложение 1. Фотографии материалов из полилактида и поли(ε-капролактона) при имплантации внутримышечно и субфасциально

А

Б

Рис. 1. Фотография имплантированной микроволоконной пленки из поликапролактона внутримышечно (А) и субфасциально (Б) через 14 дней

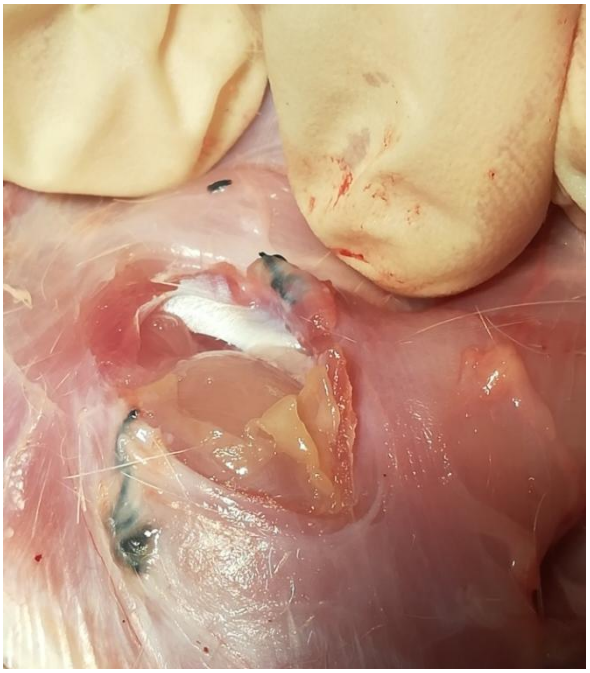
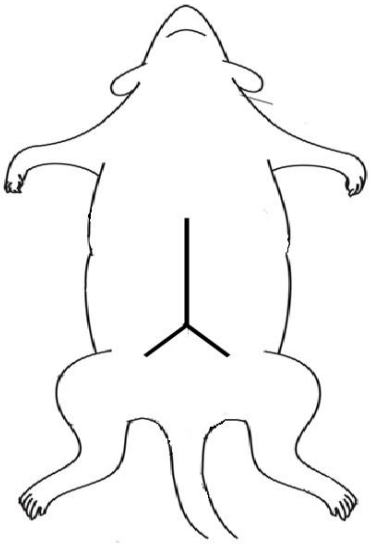


Рис. 2. Фотография имплантированной микроволоконной пленки из полилактида внутримышечно через 14 дней

Приложение 2. Проведение операции по имплантации материала в сосудистое русло

А



Б

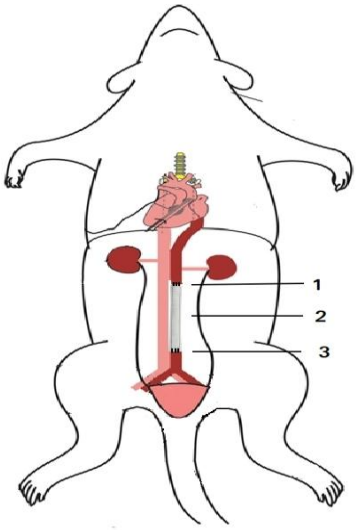


Рис. 1. Схема проведения имплантации: А — схема оперативного доступа Y-образный лапрактомии, Б— протезирование брюшной аорты. 1, 3 — проксимальный и дистальный анастомозы, 2 — имплантат

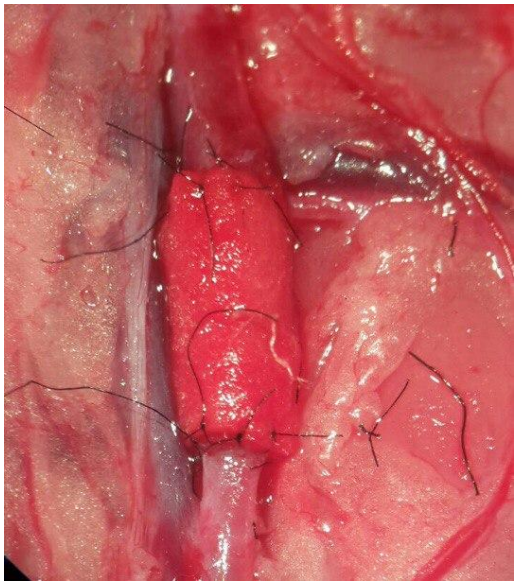


Рис. 2. Фотография материала из полилактида через 30 минут после имплантации