ИЗВЕСТИЯ ВЫСШИХ УЧЕБНЫХ ЗАВЕДЕНИЙ
Т. 57, № 3 ФИЗИКА 2014

УДК 538.971; 538.975; 539.23; 539.216.1

Е.Н. БОЛЬБАСОВ, И.Н. ЛАПИН**,***, С.И. ТВЕРДОХЛЕБОВ*, В.А. СВЕТЛИЧНЫЙ**,****

АЭРОДИНАМИЧЕСКОЕ ФОРМОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМЫХ МАТРИКСОВ И ИХ ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ НАНОЧАСТИЦАМИ, ПОЛУЧЕННЫМИ МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ АБЛЯЦИИ[1]

Для приложений тканевой инженерии методом аэродинамического формования из раствора полимолочной кислоты получены трехмерные биоразлагаемые полимерные матриксы, поверхность которых функционализирована наночастицами, синтезированными в жидкой фазе методом лазерной абляции объемных металлических мишеней (Ag, Zn), и исследованы их свойства. Показано, что матриксы представляют собой высокопористую волокнистую пространственную структуру, состоящую из полиморфных волокон диаметром от 0.25 до 2.5 мкм. Установлено, что при многократной пропитке матрикса удается сформировать на поверхности структурных элементов матрикса функциональные покрытия, состоящие из агломератов полупроводниковых (ZnO) или металлических (Ag) наночастиц.

Ключевые слова: *аэродинамическое формование, матриксы, тканевая инженерия, полимолочная кислота, лазерная абляция, наночастицы.*

Введение

Современной альтернативой трансплантации пораженных тканей и органов является тканевая инженерия (ТИ), которая базируется на свойствах стволовых клеток (СК), открытых в начале XIX в. русским гистологом А.А. Максимовым, дифференцироваться в любой клеточный фенотип. ТИ любой ткани возможна при наличии, по крайней мере, двух исходных компонентов – стволовых клеток и биосовместимого материала для создания трехмерного каркаса (матрикса), в пределах которого протекают процессы гисто- и морфогенеза [1]. Основной проблемой, решаемой при создании матриксов для приложений ТИ, является придание им свойств трехмерных аутотрансплантатов. В частности, матриксы должны: обладать высокой взаимосвязанной пористостью, обеспечивающей ангиогенез, имитировать структуру восстанавливаемых тканей, быть нетоксичными, не вызывать отрицательных тканевых реакций и аллергии, распадаться в условиях организма в идеале на углекислый газ и воду, обладать антибактериальными свойствами на ранних этапах имплантации [2].

Одним из наиболее распространенных способом создания матриксов является метод электроспиннинга (ЭС), использующий для получения матриксов энергию электрического поля высокой напряженности [3]. Матриксы, полученные при помощи ЭС, имеют узкое распределение волокон по диаметру, хорошие прочностные свойства и высокую биосовместимость [4, 5]. Но ЭС имеет ограничения, связанные с избирательностью метода к относительной диэлектрической проницаемости растворителя, используемого для изготовления прядильного раствора, низкой производительностью метода, сложностью получения композитных и объемных материалов толщиной более 500 мкм, малым размером пор, препятствующим заселению матрикса клеточным материалом [6].

Альтернативный метод изготовления матриксов – аэродинамическое формование волокон, предложенное группой E.S. Medeiros [7]. В этом методе для получения твердых полимерных матриксов из раствора полимера используется энергия сжатого газа. По сравнению с ЭС, метод не требует применения высоковольтного оборудования и позволяет использовать одновременно несколько формующих форсунок, что обеспечивает высокую безопасность и производительность процесса формования матриксов [8].

[1] Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 гг.» (ГК 14.512.11.0012), РФФИ (гранты № 13-08-98052 р_сибирь_а и 12-02-31162_мол_а), госзадания НИР № 0.328.2012 (проект № 7.1084.2011) и Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (программа «СТАРТ 13 Н4», ГК № 11989р/21980).

Для восстановления кожных покровов методами ТИ требуются матриксы, обладающие антибактериальными свойствами. Основные способы придания матриксам антибактериальных свойств: насыщение антибиотиками и нанесение тонких антисептических покрытий. Известно, что такие неорганические материалы, как серебро и оксид цинка, обладают низкой токсичностью, у большинства патогенных и условно-патогенных микроорганизмов отсутствует резистентность к ним, что позволяет использовать их как антисептики [9]. Основными методами нанесения серебра и оксида цинка на поверхность матрикса являются ионно-плазменные методы осаждения из физического пара, например магнетронное распыление [10], ионно-плазменное ассоциативное осаждение [11], осаждение из дисперсии частиц [12]. Метод лазерной абляции в жидкости позволяет получать дисперсии наночастиц высокой частоты в необходимом растворителе без применения дополнительных химических реагентов, что позволяет использовать его для функционализации матриксов.

Таким образом, целью настоящей работы являлось исследование возможности создания биодеградируемых матриксов на основе полимолочной кислоты методом аэродинамического формования и их функционализации путем осаждения на поверхность частиц, обладающих антибактериальными свойствами, из дисперсий, полученных методом лазерной абляции объемных металлических мишеней в жидкости.

1. Материалы и методы

Формирование матриксов

Трехмерные нетканые матриксы изготавливались методом аэродинамического формования в турбулентном газовом потоке из 4 %-го раствора полимолочной кислоты (PLLA) с молекулярной массой 92 000 г/моль (PURAC) в дихлорэтане (Panreac). Приготовление раствора полимолочной кислоты проводили в герметичном стеклянном реакторе при температуре 50 °C и постоянном перемешивании до получения однородного прозрачного вязкого раствора. Полученный раствор охлаждали до комнатной температуры.

Для получения нетканых матриксов использовалась установка, реализующая метод аэродинмического формования, разработанная в Томском политехническом университете, ее схема изображена на рис. 1.

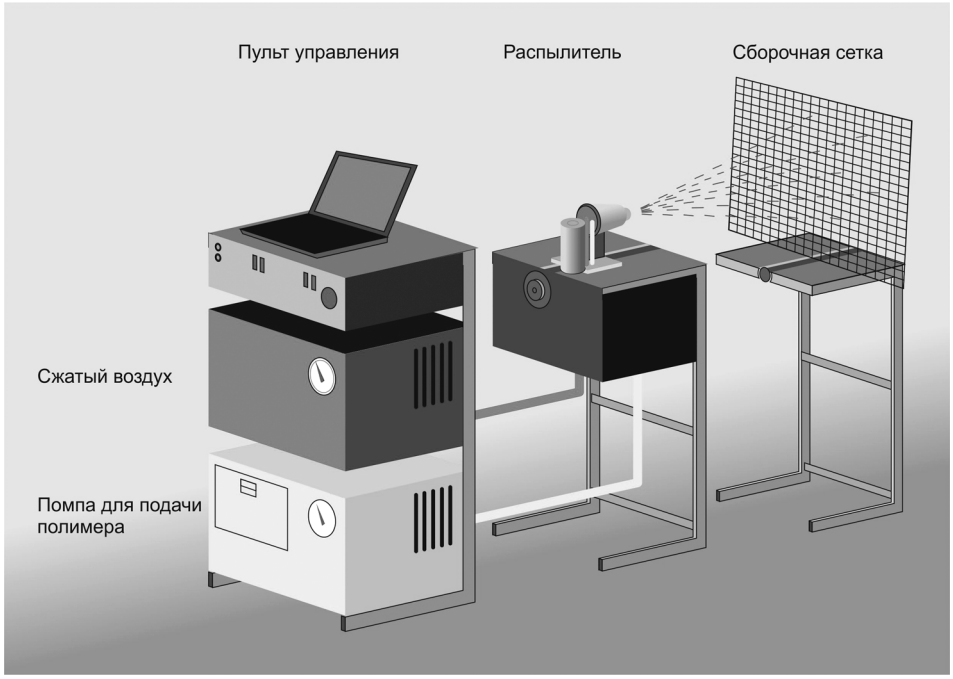

Рис. 1. Схема установки для получения объемных нетканых матриксов методом аэродинамического формования в турбулентном газовом потоке

Основными узлами установки являются: источник сжатого газа с редуктором, необходимым для регулирования давления газа; дозирующие устройство для контроля количества раствора по-

лимера, поступающего в систему; программное устройство и распылительная система для эффективного смешивания раствора полимера и сжатого газа.

Матрикс формировали при следующих условиях:

- давление сжатого воздуха – 1.5 бар,
- расход раствора полимера – 15 мкл/мин,
- расстояние от сопла до сборочного коллектора – 30 см.

Сформированные на алюминиевом коллекторе матриксы размером 15×10 см и толщиной (250±10) мкм помещались для удаления остатков растворителей в вакуумную камеру с остаточным давлением 10^{-4} Па при температуре 100 °С на 24 ч.

Получение дисперсий и пропитка матриксов

Коллоидный раствор наночастиц получали методом лазерной абляции объемных металлических мишеней Ag, Zn в этаноле на двухканальной установке, разработанной в Сибирском физико-техническом институте Томского государственного университета [13]. Использовали мишени из металлов с чистотой не менее 99.9. Абляцию проводили в стеклянных цилиндрических стаканах, наполненных этанолом, при облучении мишеней излучением основной гармоники Nd:YAG-лазера (1064 нм, 7 нс, 15 Гц, до 150 мДж). Максимальная плотность мощности излучения на поверхности мишени составляла 1.5 ГВт/см^2. Массовую концентрацию частиц в дисперсии определяли весовым методом по потере массы мишени, которая составляла 0.06 г/л для Ag и 0.5 г/л для Zn.

Полученные дисперсии частиц исследовали методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) (CM12, Philips). Для ПЭМ-исследований полученные дисперсии частиц наносили на медные сетки с аморфным углеродным покрытием и высушивали. Размер частиц определяли путем обработки пяти светлопольных изображений (микрофотографий) по выборке не менее 500 частиц с использованием программного обеспечения Image J 1.38 (National Institutes of Health, USA) .

Исследование характеристик матриксов

Исследования морфологии поверхности матриксов до и после осаждения наночастиц проводили методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на приборе Quanta 400 FEG без нанесения проводящих покрытий в режиме низкого вакуума в атмосфере паров воды (остаточное давление в камере 60 Па, ускоряющее напряжение до 20 кВ, ток пучка 5 мкА). Морфологические характеристики матриксов (диаметр волокон, размер включений) измеряли по пяти изображениям (×2500), полученным с разных участков матрикса, с использованием программного обеспечения Image J 1.38.

Предварительное исследование химического состава матриксов выполняли методом энергодисперсионного анализа (EDX-анализа) с помощью анализатора Genesis 4000, оснащенного S-UTW-Si(Li) детектором.

Исследование фазового состава полученных матриксов проводили методом рентгеноструктурного анализа при помощи дифрактометра Shimadzu XRD 6000. Образцы облучали монохроматическим CuK_α-излучением с длиной волны 1.54056 Å при следующих параметрах съемки: ускоряющее напряжение 40 кВ, ток пучка 30 мА, диапазон углов сканирования 10–70°, шаг сканирования 0.03°, время набора сигнала 1 с. Идентификацию состава фаз проводили с использованием базы данных PDF4. Расчет распределения процентного содержания по фазам в образце производили при помощи программного комплекса PowderCell 2.4. Средние размеры кристаллитов (l_c) исследуемых образцов рассчитывали с помощью формулы Дебая – Шеррера

$$l_c = \frac{k\lambda}{\cos\theta\sqrt{\beta^2 - \beta_r^2}}, \quad (1)$$

где λ – длина волны падающего излучения; β – ширина рефлекса на половине высоты; β_r – аппаратурное уширение рефлекса; θ – угол дифракции; $k = 0.9$.

2. Результаты и их обсуждение

Изображения исходной поверхности матрикса, сформированного методом аэродинамического формования в турбулентном газовом потоке, представлены на рис. 2. В отличие от нетканых матриксов, полученных методом ЭС, для которых характерны высокая однородность и узкое рас-

пределение волокон по размерам [14], матриксы, полученные методом аэродинамического формования в турбулентном газовом потоке, имеют сложную пространственную организацию, в которой можно условно выделить два размерных уровня: микронный и субмикронный. Наиболее крупные микроструктуры представляют собой низкоплотные жгуты средним диаметром (12±3) мкм, а также включения, образованные каплями раствора полимера преимущественно шарообразной формы средним диаметром (7±3) мкм (рис. 2, *а*). Жгуты сформированы из пучков субмикронных волокон средним диаметром до (0.6±0.1) мкм. Доминирующей структурной единицей матрикса (около 73 % всех волокон) являются волокна субмикронного размера диаметром от 0.25 до 1 мкм (рис. 2, *б*). Количество волокон диаметром более 1 мкм составляет более 25 %. При большом увеличении (вставка на рис. 2, *а*) удается установить, что поверхность субмикронных волокон имеет собственный развитый рельеф.

Типичный EDX-спектр сформированного матрикса представлен на рис. 2, *б*. В спектре определяются рефлексы, соответствующие углероду и кислороду, являющимся основными элементами полимерной цепи полимолочной кислоты. Отсутствие рефлекса, соответствующего хлору, в первом приближении позволяет сделать вывод о полном удалении дихлорметана из структуры матрикса в процессе его формирования.

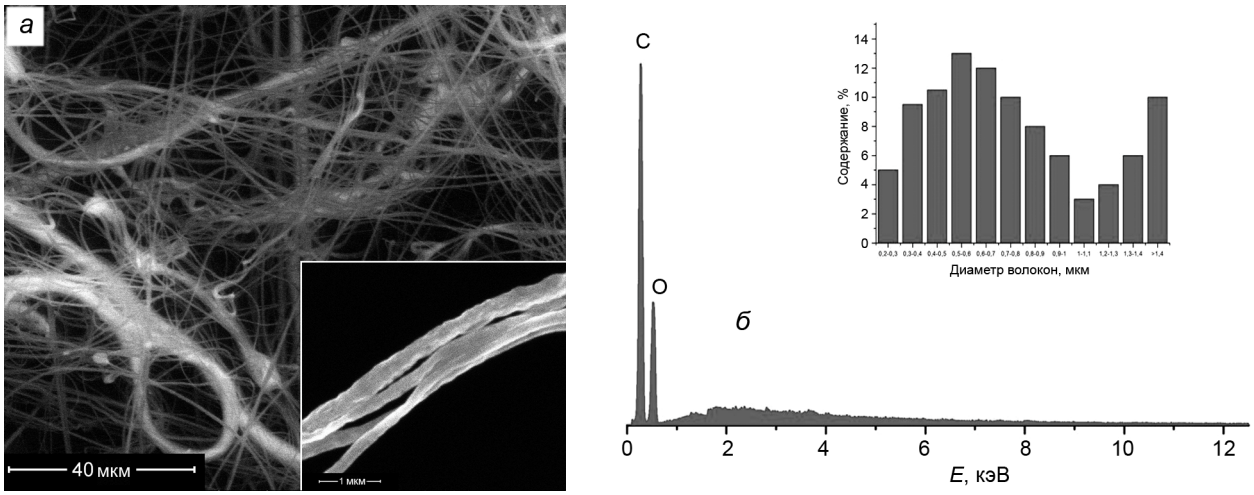

Рис. 2. СЭМ-изображения (*а*), EDX-спектры (*б*) и гистограммы распределения (на вставке) волокон по размерам исходных матриксов

ПЭМ-фотографии наночастиц, синтезированных методом лазерной абляции, приведены на рис. 3. Частицы, полученные при абляции мишени серебра, имеют преимущественно сферическую форму, средний диаметр частиц составил 15 нм. Частицы находятся в металлическом состоянии с незначительным количеством оксида на поверхности частиц [15]. Наночастицы, полученные при

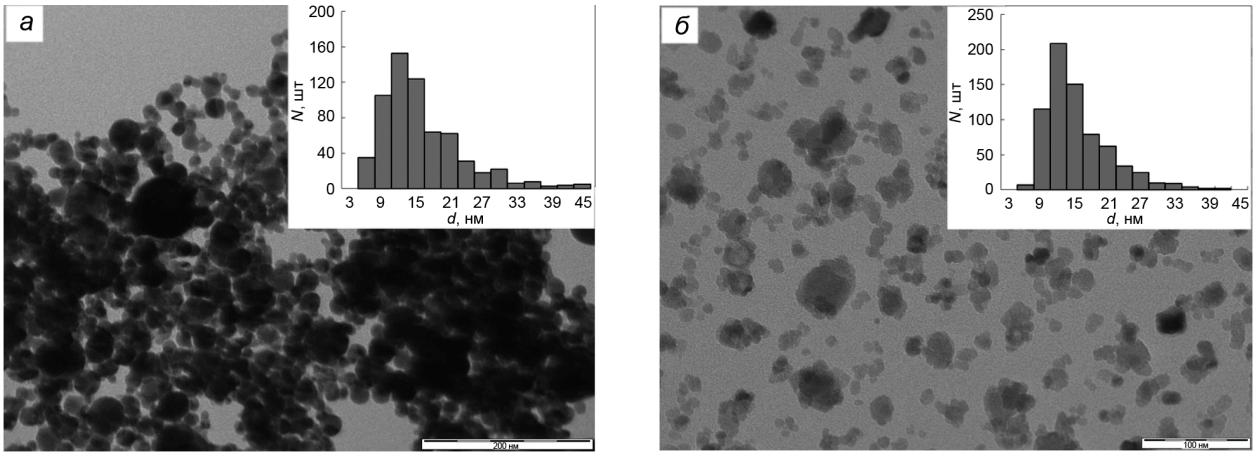

Рис. 3. ПЭМ-изображения наночастиц, полученных методом лазерной абляции металлических мишеней серебра (*а*) и цинка (*б*) в этаноле

абляции цинка, имеют выраженные грани, средний размер частиц составил 14 нм. Проведенные ранее исследования показали, что при абляции металлического цинка в этаноле формируются наночастицы оксида цинка, у самых крупных частиц, количество которых незначительно, металлическое ядро остается не окисленным [13].

Изображения поверхности матриксов, пропитанных дисперсией наночастиц серебра и цинка, приведены на рис. 4 и 5 соответственно.

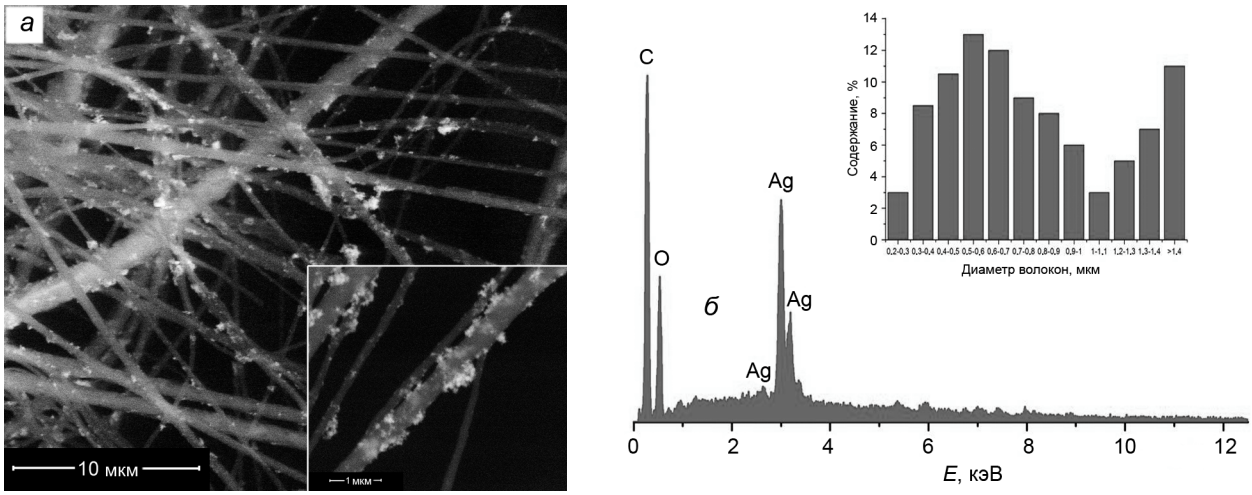

Рис. 4. СЭМ-изображения (*а*), EDX-спектры (*б*) и гистограммы распределения (на вставке) волокон по размерам нетканых матриксов, пропитанных дисперсией наночастиц серебра

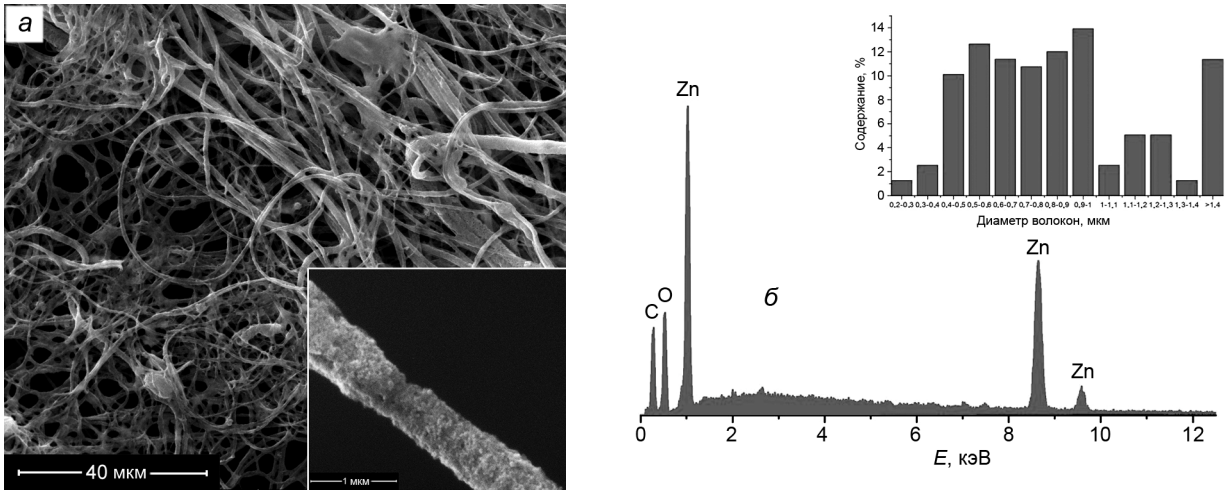

Рис. 5. СЭМ-изображения (*а*), EDX-спектры (*б*) и гистограммы распределения (на вставке) волокон по размерам нетканых матриксов, пропитанных дисперсией наночастиц оксида цинка

Анализ приведенных СЭМ-изображений свидетельствует, что пропитка матрикса дисперсией наночастиц позволяет сохранить сложную пространственную организацию матрикса. Наночастицы серебра располагаются на поверхности матрикса в виде отдельных объемных агломератов размером до нескольких сотен нанометров (вставка на рис. 4, *а*). Морфологические характеристики матриксов, пропитанные дисперсией наночастиц серебра, практически не меняются.

Наночастицы оксида цинка равномерно распределяются по поверхности волокон, формирующих матрикс, образуя сплошное покрытие (вставка на рис 5, *а*), о чем свидетельствует уменьшение доли волокон в диапазоне диаметров 0.2–0.4 мкм с 14 % для исходного матрикса и до 4 % для матриксов, пропитанных дисперсией наночастиц оксида цинка. При этом происходит увеличение доли волокон в диапазоне 0.4 до 1 мкм с 58 % для исходных матриксов и до 72 % для матриксов, пропитанных дисперсией наночастиц оксида цинка. Также наблюдается увеличение доли микроволокон диаметром более 1.4 мкм. Различия в механизмах сорбции частиц серебра и оксида

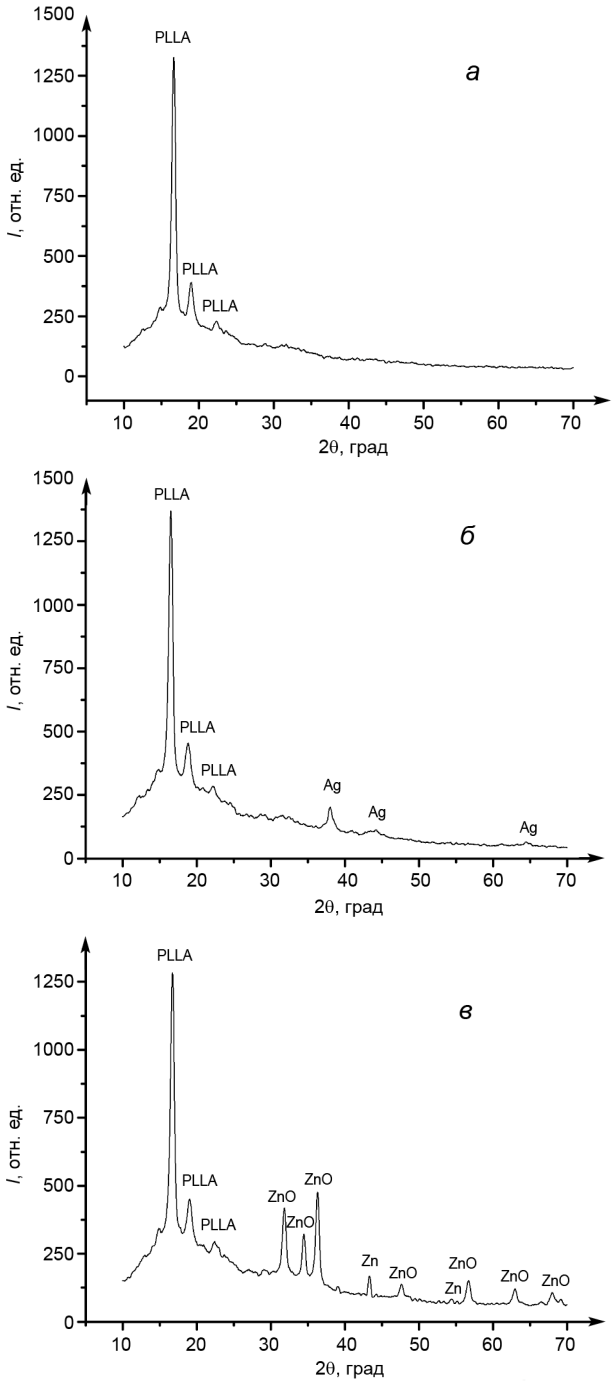

Рис. 6. Рентгенограммы матриксов: *а* – исходный матрикс; *б* – функционализированный дисперсиями серебра; *в* – оксида цинка

цинка обусловлены природой и свойствами наночастиц, что подтверждают результаты и рентгеноструктурных исследований.

На дифрактограмме исходного матрикса (рис. 6, *а*) присутствуют интенсивные рефлексы при углах 2Θ – 16.8, 18.9 и 22.3°, соответствующие отражению от кристаллографических плоскостей (110, 200), (203) и (015) полимолочной кислоты [16]. После нанесения наночастиц серебра из этанольной дисперсии помимо рефлексов полимолочной кислоты наблюдаются рефлексы при углах 37.9, 44.1 и 64.5° (рис. 6, *б*), характерные для металлического серебра (PDF Card № 04-002-1347, пространственной группой *Fm*-3*m* (225)).

У матриксов, функционализированных наночастицами оксида цинка, наблюдается серия рефлексов при углах 31.8, 34.4, 36.2, 47.6, 56.6, 62.9 и 68.0° (рис. 6, *в*), характерных для ZnO – вюрцит (PDF Card № 04-015-4060, пространственная группа *P*63*mc* (186)). Помимо этого, на дифрактограмме при углах 43.3 и 54.4° присутствуют слабые рефлексы металлического цинка (PDF Card № 01-078-7027, пространственная группа *P*63/*mmc* (194)). Расчеты, выполненные с применением программного комплекса PowderCell 2.4, показывают, что количество металлического цинка не превышает 5 %.

В таблице для обнаруженных фаз приведены средние размеры кристаллитов (l_c), рассчитанные по формуле (1). Различия значений средних размеров частиц, определенных из дифрактограмм и ПЭМ-изображений, объясняются тем, что расчет по формуле (1) проводится исходя из их объемного содержания частиц и не является прямым измерением.

Средние размеры кристаллитов обнаруженных фаз в исследуемых матриксах

Образец	Размер кристаллитов, нм					
	$l_{110,200}$	l_{203}	l_{015}	Ag (225)	Zn (194)	ZnO (186)
Исходный матрикс	15.6	2.3	-	-	-	-
Матрикс, функционализированный наночастицами Ag	15.1	2.1	-	21.5	-	-
Матрикс, функционализированный наночастицами ZnO	15.3	2.1	-	-	36.2	37.1

Заключение

Методом аэродинамического формования из раствора полимолочной кислоты в дихлорметане получены биоразлагаемые нетканые матриксы. Функциализация матриксов проведена путем их пропитки дисперсиями наночастиц серебра и оксида цинка, полученными методом лазерной абляции в этиловом спирте. Исследована кристаллическая структура и морфология полученных матриксов. Показано, что в результате пропитки металлические наночастицы серебра собираются на поверхности структурных элементов матрикса в отдельные конгломераты, а наночастицы оксида цинка формируют покрытия. Методом рентгеноструктурного анализа показано, что в результате пропитки кристаллическая структура матриксов не изменяется.

Авторы выражают признательность за оказанную помощь в проведении исследований и обсуждение результатов сотрудникам Томского материаловедческого центра коллективного пользования ТГУ к.ф-м.н. Ю.П. Пинжину и к.х.н. А.В. Шабалиной.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вахрушев И.В., Ярыггин Н.В., Ярыггин К.Н. // Хирург. – 2011. – № 1. – С. 48–52
2. Tian H., Tang Z., Zhuang X., et al. // Prog. Polymer Sci. – 2012. – V. 37 – P. 237–280.
3. Dzenis Y. // Science. – 2004. – V. 304. – P. 1917–1919.
4. Agarwal S., Wendorff J.H., and Greiner A. // Polymer. – 2008. – V. 49. – P. 5603–5621.
5. Антонова Л.В., Насонова М.В., Кудрявцева Ю.А., Головкин А.С. // Бюл. сибирской медицины. – 2012. – Т. 11. – № 1. – С. 128–134.
6. Ramakrishna S., Fujihara K., Teo W., et al. An introduction to Electrospinning and Nanofibers. – Singapore: World Scientific Publishing, 2005. – 382 c.
7. Medeiros E.S., Glenn G.M., Klamczynski A.P., et al. // J. Appl. Polymer Sci. – 2009. – V. 113. – P. 2322–2330.
8. Oliveira J.E., Moraes E.A., Costa R.G.F., et al. // J. Appl. Polymer Sci. – 2011. – V. 122. – P. 3396–3405.
9. Андреев В.А., Попов В.А., Хрипунов А.К. и др. // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2012. – Т. 3(39). – С. 173–177.
10. Song D.-H., Uhma S.-H., Lee S.-B., et al. // Thin Solid Films. – 2011. – V. 519. – P. 7079–7085.
11. Богданов Е.А., Гойхман А.Ю., Шушарина Н.Н. и др. // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2011. – Т. 4. – № 3. – С. 561–564.
12. Бабкина О.В., Светличный В.А., Лапин И.Н. и др. // Изв. вузов. Физика. – 2013. – Т. 56. – № 4. – С. 41–46.
13. Светличный В.А., Лапин И.Н. // Изв. вузов. Физика. – 2013. – Т. 56. – № 5. – С. 86–91.
14. Tutak W., Sarkar S., Lin-Gibson S., et al. // Biomaterials. – 2013. – V. 34. – P. 2389–2398.
15. Kibis L.S., Stonkus O.A., Martynova D.O., et al. // Reac. Kinet. Mech. Cat. – 2013. (In Print) DOI 10.1007/s11144-013-0617-7.
16. Delabarde C., Plummer C.J.G., Bourban P.-E., and Månson J.-A.E. // Composit. Sci. Technol. – 2010. – V. 70. – P. 1813–1819.

*Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск, Россия
**Сибирский физико-технический институт им. В.Д. Кузнецова Томского государственного университета, г. Томск, Россия
***ООО «Поласвет», г. Томск, Россия
E-mail: v_svetlichnyi@bk.ru

Поступила в редакцию 02.10.2013.

Больбасов Евгений Николаевич, аспирант;
Лапин Иван Николаевич, науч. сотр.;
Твердохлебов Сергей Иванович к.ф.-м.н., доцент;
Светличный Валерий Анатольевич, к.ф.-м.н., доцент, ст. науч. сотр.