УДК 541.64

ГИДРОГЕЛИ И ГУБЧАТЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ТРОЙНЫХ БЛОК-СОПОЛИМЕРОВ ЛАКТИДА И ЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ

Ю. Д. Загоскин^{1,*}, Т. Е. Григорьев¹, С. В. Крашенинников¹, Е. В. Куввада²,
Е. А. Губарева², А. В. Бакиров^{1,3}, С. Н. Чвалун^{1,3}

Представлено академиком РАН А.М. Музафаровым 22.02.2019 г.

Поступило 22.02.2019 г.

Разработаны новые методики получения губчатых материалов и гидрогелей на основе тройных блок-сополимеров лактида и этиленгликоля с различным молекулярным строением. Исследовано влияние состава исходных сополимеров и надмолекулярной структуры на их механические характеристики и биосовместимость. Цитологические исследования показали, что все материалы имеют высокий уровень клеточной жизнеспособности (ЖСП). Показана возможность получения гидрогелей с модулями упругости до 4460 кПа, рекордными для подобных систем.

Ключевые слова: гидрогели, губчатые материалы, полилактид, полиэтиленгликоль, рентгеновское рассеяние, биосовместимость.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524864433-436>

ВВЕДЕНИЕ

Гидрогели и губчатые материалы на основе биосовместимых и биоразлагаемых полимеров — перспективные матрицы для регенеративной медицины и тканевой инженерии [1, 2]. Основой этих тканевых каркасов могут служить как природные — коллаген [3], хитозан [4], так и синтетические полимеры — полиэтиленгликоль [5], сополимеры лактида [6] и др. [7–9]. Важными параметрами таких систем, кроме их биосовместимости, являются физико-механические характеристики, которые должны соответствовать свойствам прилегающих к месту имплантации тканей, что оказывает влияние как на адгезию и миграцию клеток, так и на их дифференцировку.

Тройные блок-сополимеры на основе лактида и этиленгликоля в водной среде способны образовывать физическую сетку с гидрофобными полилактидными узлами [10]. Физико-механические характеристики этих систем можно “настраивать”

изменением общей молекулярной массы сополимера и соотношением длин блоков [11]. Кроме того, условия микрофазного разделения существенно влияют на структуру физической сетки. Ранее этому вопросу не было уделено должного внимания. Целью данной работы является исследование гидрогелей и губчатых материалов на основе сополимеров лактида и этиленгликоля, полученных методами температурно-индуцированного микрофазного расслоения растворов и лиофилизации. Полученные гидрогели продемонстрировали значительно более высокие модули упругости по сравнению с описанными ранее системами [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Тройные блок-сополимеры на основе L-лактида (Corbion) и полиэтиленгликоля (Sigma Aldrich $M_n = 6000$ Да) с центральным гидрофильным блоком синтезировали реакцией с раскрытием цикла. В качестве катализатора использовали 2-этилгексаноат олова(II). Полимеры были охарактеризованы методами ¹H ЯМР и ГПХ (табл. 1).

Гидрогели были получены температурно-индуцированным расслоением 20 мас.% растворов сополимеров в смесевом растворителе 1,4-диоксан/вода. Истинный раствор при 80 °С охлаждали со скоростью 2 °/мин вплоть до 24 °С. Далее получен-

¹Национальный исследовательский центр
“Курчатовский институт”, Москва

²Кубанский государственный медицинский университет,
Краснодар

³Институт синтетических полимерных материалов
им. Н.С. Ениколопова Российской Академии наук,
Москва

*E-mail: zagos@inbox.ru

Таблица 1. Основные характеристики синтезированных сополимеров

Название образца	Dp_{PEG}	Dp_{PLLA}^1	M_n^1 , кДа	M_w^2 , кДа	PDI^2
$L_{38}P_{136}L_{38}$	136	76	11,5	15,5	1,22
$L_{65}P_{136}L_{65}$	136	130	15,3	20,4	1,27
$L_{95}P_{136}L_{95}$	136	190	19,7	27,4	1,29
$L_{169}P_{136}L_{169}$	136	338	30,3	52,0	1,16
$L_{361}P_{136}L_{361}$	136	722	61,6	59,5	1,34

Примечание. ¹ Определено методом ¹H ЯМР. ² Определено методом ГПХ.

ный образец промывали дистиллированной водой при температуре 4 °С, что ниже температуры плавления 1,4-диоксана. Таким образом, органический растворитель постепенно вымывался, в то время как пористая структура материала, полученная при кристаллизации, сохранялась.

Губчатые материалы получали методом сублимационной сушки замороженных 20 мас.% растворов сополимеров в смесевом растворителе 1,4-диоксан/вода.

Материалы были исследованы на сжатие на универсальной испытательной машине Instron 5965, скорость деформирования составляла 50%/мин. На деформационных кривых для всех гидрогелей присутствует прямолинейный участок упругой деформации (рис. 1). Модуль упругости гидрогеля с низкой молекулярной массой (15,5 кДа) сополимера составил 90 кПа. С увеличением длины гидрофобных блоков происходит формирование непрерывной сетки протяжённых кристаллических узлов и наблюдается увеличение модуля упругости вплоть до 4460 кПа ($L_{361}P_{136}L_{361}$).

Деформационные кривые губчатых материалов имеют начальный линейный участок упругой деформации, при дальнейшем сжатии происходит пластическая деформация (рис. 2). Модули Юнга лежат в диапазоне 5–23 МПа. Предельные деформации для этих систем существенно ниже по сравнению с гидрогелями и не превышают 1%. Такое поведение обусловлено кристаллическим агрегатным состоянием полиэтиленгликоля в стенке пористого материала.

Структура физической сетки гидрогеля была исследована методом рентгеновского рассеяния с использованием источника синхротронного излучения. На кривых рассеяния в малых углах видны пики, которые свидетельствуют об образовании периодической структуры (рис. 3). При увеличении длины гидрофобного блока наблюдается рост межплоскостного расстояния вплоть до 34 нм.

В больших углах присутствуют рефлексы, соответствующие α -модификации кристаллического полилактида. Для образца $L_{38}P_{136}L_{38}$ интенсивность пиков невысокая, так как небольшая длина гидро-

Рис. 1. Зависимость напряжения при сжатии от деформации для гидрогелей: $L_{38}P_{136}L_{38}$ (1); $L_{65}P_{136}L_{65}$ (2); $L_{95}P_{136}L_{95}$ (3); $L_{169}P_{136}L_{169}$ (4); $L_{361}P_{136}L_{361}$ (5).

Рис. 2. Зависимость напряжения при сжатии от деформации для губчатых материалов: $L_{65}P_{136}L_{65}$ (1); $L_{95}P_{136}L_{95}$ (2); $L_{169}P_{136}L_{169}$ (3); $L_{361}P_{136}L_{361}$ (4).

Рис. 3. Зависимость интенсивности рассеяния рентгеновского излучения от волнового вектора для гидрогелей: $L_{38}P_{136}L_{38}$ (1); $L_{95}P_{136}L_{95}$ (2); $L_{169}P_{136}L_{169}$ (3); $L_{361}P_{136}L_{361}$ (4).

фобного блока не позволяет образовывать протяжённые кристаллиты. Совершенствование ламелей в остальных гидрогелях подтверждается высокой интенсивностью пиков.

Цитотоксические свойства полученных материалов были исследованы при проведении колориметрического ХТТ-теста после статической рецеллюляризации. В качестве клеточных ресурсов были выбраны мезенхимные стромальные стволовые клетки крысы костномозгового происхождения (МСК-КМ) и клетки, выделенные из стромально-васкулярной фракции жировой ткани (МСК-ЖТ), а в качестве контроля выступали гидроксиапатит и деминерализованная кость. Метаболическую активность клеток регистрировали после выполнения ХТТ-теста через 48 ч культивирования. Расчёт показателей ЖСП-клеток и цитотоксического индекса (ЦИ) проводился в процентах [13].

ЖСП клеток на всех исследуемых образцах превышала или соответствовала контрольным данным при низких показателях ЦИ (рис. 4). В качестве исключения можно выделить образец L_{38}/P_{136} , где как ЖСП, так и ЦИ превышали контрольные показатели. Данное явление можно объяснить более подходящими физико-механическими характеристиками матрикса для адгезии, роста и пролиферации клеточных культур. В то же время из-за затруднённой кристаллизации полилактидного блока для данного образца процессы биodeградации протекают значительно быстрее и, как следствие, выделяется значительное количество молочной кислоты, которая может способствовать гибели клеток.

Рис. 4. Результаты расчётов ЖСП и ЦИ при проведении ХТТ-тестов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в работе показана возможность получения гидрогелей на основе тройных блок-сополимеров лактида и этиленгликоля температурно-индуцированным расслоением. Новые гидрогели демонстрируют высокие (до 4460 кПа) модули упругости, ранее недостижимые для подобных систем. Разработанная методика позволяет получать гидрогели из сополимеров с высокой молекулярной массой, а также большими гидрофобными блоками, что позволяет управлять как прочностными характеристиками гидрогелей и губчатых материалов, так и их биосовместимостью. Исследованные материалы не обладают цитотоксичностью и могут быть использованы в качестве матриксов для создания тканеинженерных конструкций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nair L.S., Laurencin C.T. Biodegradable Polymers as Biomaterials // Prog. Polym. Sci. 2007. V. 32. № 8–9. P. 762–798.
2. Kamath K.R., Park K. Biodegradable hydrogels in drug delivery // Adv. Drug Deliv. Rev., 1993. V. 11. № 1–2. P. 59–84.
3. Sumita Y., Honda M.J., Ohara T. et al. Performance of collagen sponge as a 3-D scaffold for tooth-tissue engineering // Biomaterials. 2006. V. 27. P. 3238–3248.
4. Романова О.А., Григорьев Т.Е., Гончаров М.Е. и др. Хитозан как модифицирующий компонент искусственного матрикса в тканевой инженерии кожи человека // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2015. № 2. С. 103–113.
5. Mahoney M.J., Anseth K.S. Three-dimensional Growth and Function of Neural Tissue in Degradable

- polyethylene Glycol Hydrogels // *Biomaterials*. 2006. V. 27. № 10. P. 2265–2274.
6. Grigoriev T.E., Bukharova T.B., Vasilyev A.V., et al. Effect of Molecular Characteristics and Morphology on Mechanical Performance and Biocompatibility of PLA-based Spongy Scaffolds // *BioNanoScience*, 2018. V. 8. № 4. P. 977–983.
 7. Zhuravleva M., Gilazieva Z., Grigoriev T.E., et al. In Vitro Assessment of Electrospun Polyamide-6 Scaffolds for Esophageal Tissue Engineering // *J. Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2018. V. 107. № 2. P. 253–268.
 8. Vatankhah-Varnosfaderani M., Keith A.N., Cong Y.D., et al. Chameleon-like Elastomers with Molecularly Encoded Strain-Adaptive Stiffening and Coloration // *Sci*. 2018. V. 359. № 6383. P. 1509–1513.
 9. Vatankhah-Varnosfaderani M., Daniel W.F.M., Everhart M.H. et al. Mimicking Biological Stress-Strain Behaviour with Synthetic Elastomers // *Nature*. V. 549. № 7673. P. 497–501.
 11. Saffer E.M., Tew G.N., Bhatia S.R. Poly(lactic acid)-poly(ethyleneoxide) Block Copolymers: New Directions in Self-Assembly and Biomedical Applications // *Current Medicinal Chemistry*. 2011. V. 18. № 36. P. 5676–5686.
 12. Agrawal S.K., Sanabria-DeLong N., Tew G.N., Bhatia S.R. Rheological Characterization of Biocompatible Associative Polymer Hydrogels with Crystalline and Amorphous Endblocks // *J. Mater. Res*. 2006. V. 21. № 8. P. 2118–2125.
 13. Aamer K.A., Sardinha H., Bhatia S.R., Tew G.N. Rheological Studies of PLLA–PEO–PLLA Triblock Copolymer Hydrogels // *Biomaterials*. 2004. V. 25. P. 1087–1093.
 14. Almubarak S., Nethercott H., Freeberg M., et al. Tissue Engineering Strategies for Promoting Vascularized Bone Regeneration // *Bone*. 2016. V. 83. P. 197–209.

HYDROGELS AND SPONGE MATERIALS BASED ON TRIBLOCK COPOLYMERS OF LACTIDE AND ETHYLENE GLYCOL

Y. D. Zagoskin¹, T. E. Grigoriev¹, S. V. Krashennnikov¹, E. V. Cueva²,
E. A. Gubareva², A. V. Bakirov^{1,3}, S. N. Chvalun^{1,3}

¹National Research Centre “Kurchatov Institute”, Moscow, Russian Federation

²Private Educational Institution of Higher Education Kuban Medical Institution, Ministry Education et science of Russian Federation, Krasnodar, Russian Federation

³Enikolopov Institute of Synthetic Polymeric Materials of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Presented by Academician of the RAS A.M. Muzafarov February 22, 2019

Received February 22, 2019

New techniques have been developed for the preparation of spongy materials and hydrogels based on triblock copolymers of lactide and ethylene glycol with various molecular structures. The influence of the composition of the initial copolymers and supramolecular structure on their mechanical characteristics and biocompatibility was studied. Cytological studies have shown that all materials have a high level of cell viability (GSP). The possibility of obtaining hydrogels with elastic moduli up to 4460 kPa, a record for such systems, was shown.

Keywords: hydrogels, spongy materials, polylactide, polyethylene glycol, X-ray scattering, biocompatibility.