

УДК 54.126:577.11:57.085.23:616-089.819.843

ОПТИМИЗАЦИЯ СРОКОВ ДЕГРАДАЦИИ И ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРОТИВОСПАЕЧНЫХ МЕМБРАН НА ОСНОВЕ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ ПОЛИМЕРОВ

М. В. Насонова, Ю. И. Ходыревская, А. Л. Немойкина, М. Ю. Михайленко, Ю. А. Кудрявцева

OPTIMIZATION OF PHYSICAL, MECHANICAL AND DEGRADATION PROPERTIES FOR BIODEGRADABLE ANTI-ADHESIVE MEMBRANES

M. V. Nasonova, Yu. I. Hodyrevskaya, A. L. Nemoikina, M. Yu. Mikhaylenko, Yu. A. Kudryavtseva

Для мембран, предназначенных для профилактики образования спаек после полостных операций, важны такие показатели, как срок биодеградации и упруго-прочностные характеристики. Цель настоящего исследования – оценить сроки биодеградации *in vitro* и физико-механические свойства мембран, изготовленных на основе композиций биодеградируемых полимеров: полигидроксибутирата/оксивалерата (PGBV), полилактида (PLA) и полилактида-ко-гликолида (PLGA). Показано, что полученные сополимеры PLGA в соотношении полилактид/гликолид – 70/30 и 60/40 обладают наиболее быстрыми сроками биодеградации и в композиции с PGBV позволяют увеличить скорость биорезорбции последнего в 1,2 – 1,3 раза. При этом результаты физико-механических испытаний образцов свидетельствуют, что добавление PLGA к PGBV позволяет улучшить свойства исследуемых образцов – при добавлении в полимерную композицию PLGA 60/40 прочность образцов увеличивается на 27,5 %, а упруго-эластические свойства увеличиваются на 70 % по сравнению с PGBV. Полученные результаты свидетельствуют, что регулируя состав биорезорбируемых полимерных мембран, можно влиять на скорость биодеградации и физико-механические свойства.

Biodegradation rate and tensile strength are essential for membranes, applied to prevent post-surgical adhesion formation. The study is aimed at evaluating biodegradation rate, physical and mechanical properties of the membranes made from biodegradable polymer composites *in vitro*, namely polyhydroxybutyrate / oxovalerate (PGBV), polylactide (PLA), and polylactide-co-glycolide (PLGA). PLGA copolymers, having a polylactide: glycolide ratio in the proportion of 70:30 and 60:40, reported the highest biodegradation rate, moreover, the addition of PGBV to this polymer composite may increase the bioresorption rate of the latter by 1.2 – 1.3 times. Thus, the physical and mechanical testing findings have shown that the addition of PLGA to PGBV results in improved properties of the studied samples – PLGA added to the polymer composite in the proportion 60:40 increased its strength by 27.5 %, and its elastic properties by 70 % compared to PGBV. The obtained results demonstrated that the adjustment of the bioresorbable polymer formulation for anti-adhesive membranes may regulate biodegradation rate, physical and mechanical properties.

Ключевые слова: противоспаечные мембраны, биодеградируемые полимеры, полигидроксибутират, полилактид-ко-гликолид, биодеградация, прочность, эластичность.

Keywords: anti-adhesive membrane, biodegradable polymers, polyhydroxybutyrate, polylactide-co-glycolide, biodegradability, strength, elasticity.

Актуальность

Материалы, предназначенные для предупреждения образования послеоперационных спаек, должны отвечать многочисленным требованиям, в том числе обладать оптимальным сроком биодеградации, соответствующим фазам адгезиогенеза [1; 6]. Использование небиодеградируемых материалов при создании противоспаечных мембран не целесообразно, т. к. их длительное нахождение в организме пациента может приводить к реакции на инородное тело и, как следствие, вызывать нежелательные послеоперационные осложнения [5]. В связи с этим, разработка противоспаечных мембран на основе биодеградируемых полимеров является перспективным направлением [9; 16]. Материал для производства противоспаечных мембран должен представлять собой биосовместимый, нетоксичный полимер либо композицию на основе нескольких полимеров. Поиск оптимальных биорезорбируемых полимеров для использования в качестве противоспаечных мембран является актуальной задачей. Перспективными биодеградируемыми полимерами являются полилактид, сополимер полилактид-ко-гликолид и полигидроксибутират/оксивалерат, поскольку они уже нашли широкое применение в клинике и продемон-

стрировали обнадеживающие результаты в эксперименте [2; 4; 10; 14]. Каждый из вышеперечисленных полимеров имеет свои достоинства и недостатки, различные сроки деградации и физико-химические и прочностные свойства. Комбинацией полимеров можно добиться требуемых для каждого конкретного случая сроков деградации и физико-механических свойств.

Целью настоящего исследования явилось оценить сроки биодеградации *in vitro* и упруго-прочностные свойства мембран, изготовленных на основе композиций различных биодеградируемых полимеров.

Материалы и методы исследования

Для изготовления биорезорбируемых мембран использовали полимер природного происхождения полигидроксибутират/оксивалерат (PGBV) с молекулярной массой 228 КДа (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина СО РАН, г. Пущино). Синтетические биополимеры синтезированы в лаборатории биополимеров и биотехнологии Химического факультета Томского государственного университета с молекулярными массами: поли-D,L-лактид (PLA) - 69 КДа, сополимеры поли-D,L-лактид-ко-гликолид (PLGA) в соотношениях 90/10 – 40 кДа,

80/20 – 65кДа, 70/30 – 44 кДа, 60/40 – 40 кДа. Растворы полимеров с концентрацией 3 г/100 мл выливали в стеклянные чашки Петри и выдерживали при комнатной температуре до испарения растворителя. В качестве растворителя использовали трихлорметан производства ЗАО «Мосреактив» (х. ч.). Дegradацию образцов проводили *in vitro* путем помещения образцов мембран размером 10x10мм в 0,2 М фосфатный буфер pH 7,4 (по 10 образцов каждой группы). Образцы инкубировали в термостате при 37⁰С. Измерение массы образцов проводили каждые 7 суток на аналитических весах «GIR-200» (AnD 220, Япония).

Измерение предела прочности, относительного удлинения и модуля Юнга при растяжении полученных полимерных мембран проводили по ГОСТ 11262-80 на универсальной испытательной машине Zwick/Roell Z 2.5 (Германия).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 6,0. Рассчитывали медиану и квартили (Me (25 %; 75 %)). Для проверки гипотезы о равенстве законов распределений использовали критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$. Графически результаты эксперимента представлены в виде диаграмм со значениями Me (25 % – 75 %).

Результаты и обсуждение

Сроки биодеградации резорбируемых мембран зависят от природы полимера, от его молекулярной массы, технологии переработки [3; 13]. Полилактиды являются полимерами 2-гидроксипропионовой (молочной) кислоты и, подобно другим высокомолекулярным соединениям на основе α -гидроксикислот и их производных, обладают способностью к биодеградации и биосовместимостью [12; 15]. Сочетание этих свойств обеспечивает возможность использования получаемых из них полимерных материалов в качестве полимеров медицинского назначения. Перспективными являются полимерные соединения, молекулы которых содержат несколько типов мономерных звеньев или так называемые сополимеры [4; 7; 8; 17]. Полилактид-ко-гликолид является наиболее удобным сополимером, который используется для контролируемого высвобождения различных лекарственных веществ [3; 10]. Физико-химические свойства полилактида-ко-гликолида определяются молярным соотношением и последовательным расположением молочной и гликолевых кислот. Чем больше соотношение лактида к гликолиду, тем гидрофобнее будет вещество и тем хуже растворимость у него [3]. Время биодеструкции поли-D,L-лактида составляет 12 – 16 месяцев. Повышение скорости биодеструкции полилактида достигают путем сополимеризации с гликолидом. Сополимеризация гликолида с D,L-лактидом, взятых в различных соотношениях, приводит к образованию продуктов с различной способностью к биодеградации. Скорость гидролиза зависит от таких факторов, как размер и гидрофиль-

ность полимерного имплантата, мономерность состава, степень кристалличности полимера, pH и температура окружающей среды. Сроки разложения меньше для полимеров с более низкой молекулярной массой, большей гидрофильностью и большим содержанием аморфной части, а также при более высоком содержании гликолида в сополимерах. Сополимеры гликолида и лактида разлагаются путем простого гидролиза до гликолевой и молочной кислот, которые в случае медицинского применения перерабатываются через обычные метаболические пути.

Полигидроксиалканоаты – линейные полимеры, получаемые микробиологическим путем при бактериальной ферментации сахаров или липидов [13; 15]. В силу особенностей биосинтеза материалов этой группы существует возможность получения широкого спектра значений скорости дegradации и механических параметров, что позволяет применять полиоксиалканоаты в различных областях медицинской науки и практики [2; 8; 14]. Известны успешные примеры использования полигидроксибутирата в кардиохирургии в качестве противовоспалочного барьера, необходимого при операциях на открытом сердце [2]. В то же время, известно, что обладая высокой биосовместимостью, полигидроксибутират характеризуется достаточной хрупкостью и невысокой прочностью. Сополимеры полиоксиалканоатов, в частности, полигидроксибутират/оксиалканоат обладают лучшими физико-механическими свойствами [11; 13]. Сроки биодеградации сополимера также широко варьируют в зависимости от молекулярной массы полимера и его состава.

При изучении динамики дegradации мембран на основе исследуемых полимеров было подтверждено, что увеличение доли гликолида в сополимере с лактидом ускоряет сроки деструкции образца. Так, наличие в сополимере 10 % гликолида значительно ускоряет срок дegradации образцов – масса образцов к 12 неделям инкубации в 1,6 раза меньше, по сравнению с «чистым» PLA (рис. 1). Увеличение доли гликолида до 20 % приводит к более интенсивным срокам дegradации образцов – к 8 неделям инкубации масса образцов в 1,6 раза меньше, чем у PLA, а к 10 недель инкубации мы наблюдали полное разрушение образцов PLGA 80/20. Наибольшие темпы дegradации отмечены у образцов PLGA 70/30 и PLGA 60/40. Через 2 недели масса образцов PLGA 70/30 уменьшилась на 17 % и к 21 суткам наблюдения они полностью разрушились, а образцы PLGA 60/40 через 7 суток наблюдения потеряли в массе почти 20 % и к 10 суткам полностью дegradировали. Таким образом, для создания биодеградируемых противовоспалочных мембран наиболее перспективными являются сополимеры PLGA 70/30 и PLGA 60/40, обладающие наименьшими сроками дegradации. Снижение срока дegradации обусловлено тем, что при образовании внутрислойных спаек наиболее критичны первые 28 суток. Дальнейшее нахождение мембран в зоне операции нежелательно в виду возможной реакции организма на инородное тело.

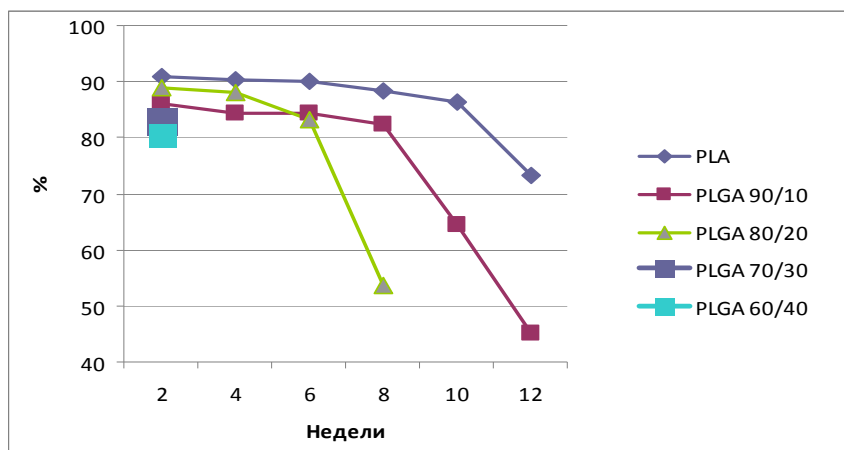


Рис. 1. Динамика деградации в фосфатном буфере образцов мембрана основе поли-D,L-лактида (PLA) и сополимеров D,L-лактида и гликолида (PLGA)

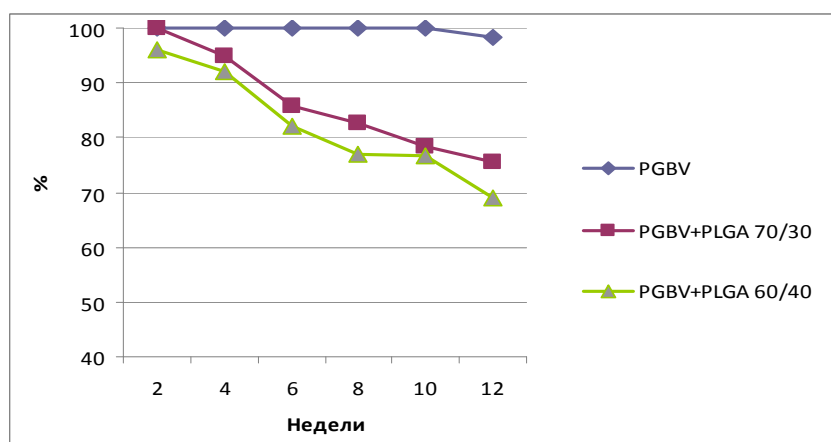


Рис. 2. Динамика деградации в фосфатном буфере образцов мембрана основе полигидроксибутирата/оксивалерата (PGBV) и поли-D,L-лактида-ко-гликолида (PLGA)

Полиоксианоаты, обладая высокой биосовместимостью, характеризуются долгим сроком деградации. К 12 неделям инкубации данные образцы потеряли лишь 5 % от исходной массы (рис. 2). Добавление к PGBV 30 % по массе сополимеров PLGA позволяет существенно ускорить сроки деградации в 1,2 – 1,3 раза. Причем, добавление PLGA 60/40 позволяет максимально ускорить процесс деструкции образцов.

Помимо оптимальной скорости деградации, противоспаечные мембраны должны обладать достаточной прочностью и эластичностью, т. к. при имплантации в грудную полость данные мембраны могут замещать часть перикарда и должны иметь близкие показатели физико-механических свойств – не менее 6 МПа. Оценивая результаты физико-механических испытаний первой группы образцов – полимерных матриц состава PLA и PLGA, можно отметить, что при уменьшении содержания D,L-лактида в композициях на 10 % их прочность уменьшается на 34 %

($p = 0,045$) (рис. 3). При дальнейшем снижении количества D,L-лактида в составе сополимера физико-механические свойства мембран также снижаются, и при соотношении PGA 60/40 составляют 26 % ($p = 0,011$) от контрольного образца PLA. В тоже время, при увеличении доли гликолида в сополимере эластичность образцов значительно увеличивается, максимальный показатель относительного удлинения отмечен у образцов PLGA 60/40. Достоверные различия по эластичности отмечены для групп образцов PLGA 70/30 и PLGA 60/40, $p = 0,048$ и $p = 0,019$, соответственно. С увеличением содержания лактидных фрагментов в макромолекуле его сополимера с гликолидом повышается гидрофобность, но уменьшается кристалличность. Изменяя количество и время введения мономера, можно целенаправленно изменять тонкую структуру материала и его свойства, например время полной деструкции полимера.

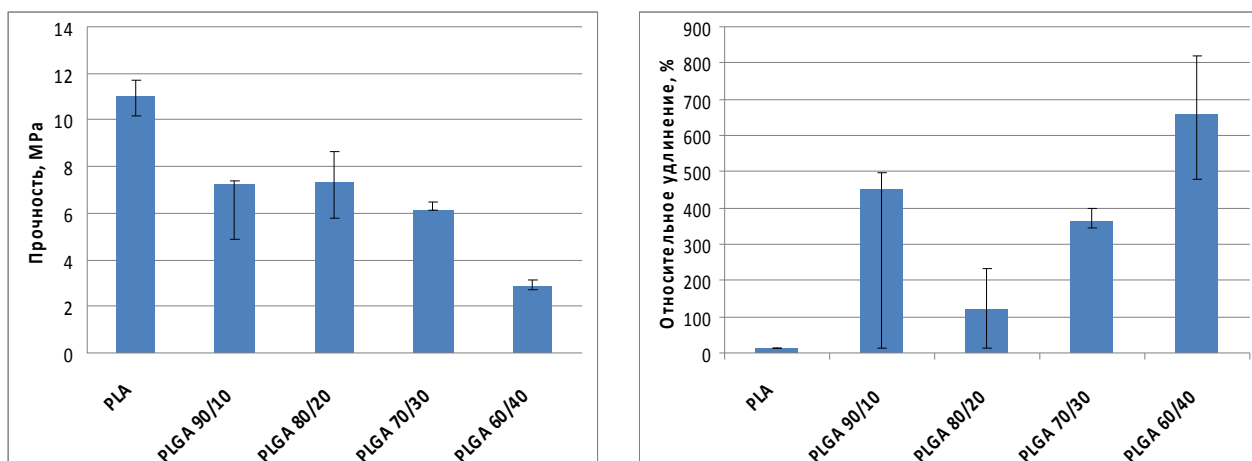


Рис. 3. Показатели прочности и эластичности мембран на основе поли-D,L-лактида и гликолида (PLA и PLGA)

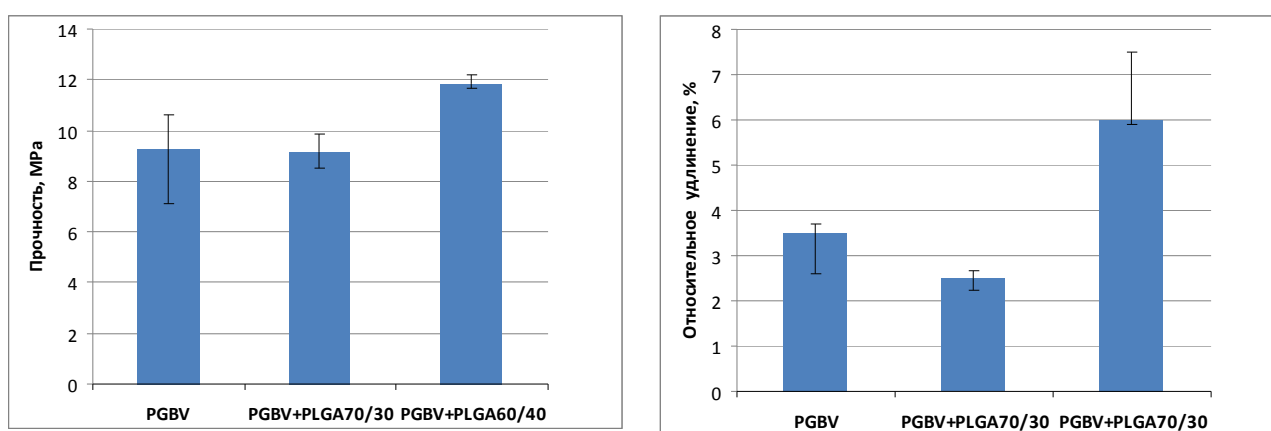


Рис. 4. Показатели прочности и эластичности мембран на основе полигидроксибутирата/оксидвалерата (PGBV) и поли-D,L-лактида-ко-гликолида (PLGA)

Анализ физико-механических свойств во второй группе показывает, что добавление PLA и PLGA к PGBV позволяет улучшить свойства конечного изделия (рис. 4). При добавлении в полимерную композицию PLGA70/30 прочность и эластичность мембран практически не изменяется, а при добавлении PLGA 60/40 прочность образцов увеличилась на 27,5 % ($p = 0,009$), а упруго-эластические свойства увеличиваются на 70 % по сравнению с к PGBV ($p = 0,047$).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что регулируя состав биорезорбируемых

полимерных матриц, применяемых в медицине, можно управлять скоростью биодеградации и физико-механическими свойствами конечных изделий. Такие полимеры, как полимолочная кислота и полигидроксибутират/оксидвалерат, помимо нетоксичности и биосовместимости, обладают высокими физико-механическими свойствами. Совместное их использование позволяет получать изделия, имеющие оптимальные упругие, прочностные и деформационные характеристики, а также необходимые сроки биодеградации.

Литература

1. Липатов В. А. Спаечный процесс брюшной полости как типичная биологическая реакция // Сборник научных трудов, «Актуальные проблемы медицинской биологии» / под ред. Н. Н. Ильинских. Томск, 2002. С. 119 – 121.
2. Dai Z. W., Zou X. H., Chen G. Q. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) as an inject able implant system for prevention of post-surgical tissue adhesion. *Biomaterials*. 2009 Jun; 30(17):3075-83.
3. Domb A. J., Kumar N., Ezra A. *Biodegradable Polymers in Clinical Use and Clinical Development Hardcover*. 2011. P. 734.
4. Gentile P., Chiono V., Carmagnola I, Hatton P. V. An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering // *Int J Mol Sci*. 2014 Feb 28; 15(3):3640-59.
5. Haney A. F. Removal of surgical barriers of expanded polytetrafluoroethylene at second-look laparoscopy was not associated with adhesion formation // *fertile.Steril*. 1997. 68:721-723.
6. Harris E. S., Morgan R. F., Rodeheaver G. T. Analysis of the kinetics of peritoneal adhesion formation in the rat and evaluation of potential antiadhesive agents // *Surgery*. 1995. Jun; 117(6):663-669.

7. Huang W., Shi X., Ren L., Du C., Wang Y. PHBV microspheres-PLGA matrix composite scaffold for bone tissue engineering // *Biomaterials*. 2010. May; 31(15):4278-85.
8. Kuppan P., Vasanthan K. S., Sundaramurthi D., Krishnan U. M., Sethuraman S. Development of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) fibers for skin tissue engineering: effects of topography, mechanical and chemical stimuli // *Biomacromolecules*. 2011. Sep. 12; 12(9):3156-65.
9. Lodge A., Wells W., Backer C. et al. A novel bioresorbable film reduces postoperative adhesions after infant cardiac surgery // *The Annals Thorac. Surgery*. 2008. 86(2):614– 621.
10. Pan Z., Ding J. Poly(lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine // *Interface Focus*. 2012. Jun 6; 2(3):366-77.
11. Qu X-H., Wu Q., Chen G.-Q. In vivo study on hemocompatibility and cytocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) // *J. Biomater Sci. Polymer Edm*. 2006. 17 (10):1107-1121.
12. Rasa R. M., Janorkar A. V., Hirt D. E. Poly(lactic acid) modifications // *Progress in Polymer Science*. 2010. 35(3):338–356.
13. Sudesh K., Abe H., Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog Polym Sci*. 2000. 25(10):1503–1555.
14. Wang Y., Bian Y.Z., Wu Q., Chen G.Q. Evaluation of three-dimensional scaffolds prepared from poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for growth of allogeneic chondrocytes for cartilage repair in rabbits. *Biomaterials*. 2008. 29:2858 – 2868.
15. Webb A. R., Yang J., Ameer G. A. Biodegradable polyester elastomers in tissue engineering // *Expert Opin Biol Ther*. 2004. Jun; 4(6):801-12.
16. Worldwide market for surgical sealants, glues, wound closure and anti-adhesion, 2012 – 2017 // *A Worldwide Business Report from MedMarket Diligence*. 2012.
17. Zhang Z, Cui H. Biodegradability and biocompatibility study of poly(chitosan-g-lactic acid) scaffolds // *Molecules*. 2012. Mar 14; 17(3):3243-58.

Информация об авторах:

Насонова Марина Владимировна – научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН (НИИ КПССЗ), г. Кемерово, 8-903-984-28-60, mv-nas@mail.ru.

Marina V. Nasonova – Research Associate at the Laboratory of New Biomaterials, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Disease of the Siberian Branch the RAMS, Kemerovo.

Ходыревская Юлия Ивановна – младший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН (НИИ КПССЗ), г. Кемерово, 8-923-606-97-18, aiger2350@yandex.ru.

Yulia I. Khodyrevskaya – Junior Research Associate at the Laboratory of New Biomaterials, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Disease of the Siberian Branch the RAMS, Kemerovo.

Немойкина Анна Леонидовна – кандидат биологических наук, заведующая лабораторией биополимеров и биотехнологии Томского государственного университета, 8-903-950-80-61, nemoykina@rambler.ru.

Anna L. Nemoykina – Candidate of Biology, Head of the Laboratory of Biopolymers and Biotechnology, Tomsk State University.

Михайленко Михаил Юрьевич – инженер лаборатории биополимеров и биотехнологии Томского государственного университета, 8-952-805-14-19, mendelev_tip@mail.ru.

Mikhail Yu. Mikhaylenko – engineer at the Laboratory of Biopolymers and Biotechnology, Tomsk State University.

Кудрявцева Юлия Александровна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией новых биоматериалов Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН (НИИ КПССЗ), г. Кемерово, 8-905-902-61-84, kudrua@cardio.kem.ru.

Yuliya A. Kudryavtseva – Doctor of Biology, Head of the Laboratory of New Biomaterials, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Disease of the Siberian Branch the RAMS, Kemerovo.

Статья поступила в редколлегию 16.12.2014 г.