

## РАЗРАБОТКА НОВЫХ МЕТОДОВ ФОРМИРОВАНИЯ ИМПЛАНТАЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИЙ ЭЛЕКТРОСПИННИНГА И БИОПРИНТИРОВАНИЯ

*Василец В.Н.<sup>1</sup>, Казбанов И.В.<sup>1</sup>, Ефимов А.Е.<sup>1</sup>, Севастьянов В.И.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий», г. Москва

<sup>2</sup> ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития, г. Москва

Разработаны новые методы получения матриц для восстановительной и заместительной хирургии из биodeградируемых полимеров полиоксibuтирата и коллагена. Для формирования пористых структур с регулируемой морфологией из биodeградируемых полимеров применяли технологии электроспиннинга и биопринтирования. Полученные структуры исследовали методами оптической микроскопии, электронной сканирующей микроскопии и зондовой микроскопии по технологии ИНТЕГРА Томо, позволяющей восстанавливать трехмерное изображение внутренней структуры матрикса.

*Ключевые слова: пористые полимерные матрицы, электроспиннинг, биопринтирование, атомно-силовая микроскопия*

## NEW METHODS FOR IMPLANT MATRIX FORMATION BASED ON ELECTROSPINNING AND BIOPRINTING TECHNOLOGIES

*Vasilets V.N.<sup>1</sup>, Kazbanov I.V.<sup>1</sup>, Efimov A.E.<sup>1</sup>, Sevastianov V.I.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Research and Technology, Moscow

<sup>2</sup>Academician V.I. Schumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow

New implant materials for regenerative and replacement surgery based on biodegradable polymers like collagens and polyoxybutirates are developed. Porous structures with controllable morphology were formed from biodegradable polymers using electrospinning and bioprinting technologies. The matrixes were studied by visible and electron scanning microscopy as well as INTEGRA Tomo scanning probe platform making possible the restoration of inner 3D structure of polymer matrix.

*Key words: scaffolds, electrospinning, bioprinting, atomic force microscopy*

### ВВЕДЕНИЕ

Разработка и создание новых имплантационных материалов представляется в настоящее время весьма актуальной задачей для восстановительной и заместительной хирургии. Одна из важнейших составных частей имплантата – полимерная матрица, которая является носителем клеточного материала. Матрица должна обеспечивать хорошую адгезию клеток, их пролиферацию и, в случае стволовых клеток, – дифференциацию их в нужном направлении.

В настоящее время для изготовления полимерных матриц применяются в основном различные химические методики, наиболее популярной из которых является «выщелачивание». В этом методе в полимер вводится определенная соль, которая затем вымывается в соответствующем растворителе, в результате чего получается пористая структура. Такие методы обладают целым рядом недостатков, наиболее существенными из которых являются: – невозможность получения заранее заданной структуры;

*Статья поступила в редакцию 9.02.09 г.*

**Контакты:** Севастьянов Виктор Иванович, зав.отделом по исследованию биоматериалов ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития. Тел. (499) 196-88-74, e-mail: viksev@yandex.ru

- ограниченные возможности в регулировании пористости и морфологии матрикса;
- хаотичность и низкая воспроизводимость образующейся пористой структуры.

В связи с этим нами были разработаны новые методы формирования пористых матриксов из полимеров биологического происхождения, основанные на современных физических методах электроспиннинга и биопринтирования. В методе электроспиннинга используется постоянное электрическое поле, в нем образуются полимерные нити, из которых в дальнейшем формируются полимерные пористые структуры [5, 7, 11]. При подаче высокого напряжения на капилляр, из которого вытекает раствор полимера, вследствие электростатического расталкивания происходит расслаивание потока на нити, которые, переплетаясь, формируют пористую структуру на подложке. Посредством изменения таких параметров, как напряженность поля, скорость подачи и концентрация мономера, можно в широких пределах менять размер волокон, размер пор, величину пористости и отношение поверхности к объему [7, 11].

В методе биопринтирования используется технология струйной печати, которая позволяет создавать трехмерные структуры с заранее заданной морфологией [3, 4, 8–10]. В этом методе, как и в обычном струйном принтере, используются «биочернила» – это могут быть белки, полимеры для создания матрикса или живые клетки. В качестве подложки используется «биобумага» – специальная поверхность, которая обеспечивает стабилизацию и существование созданных структур. В случае принтирования белков и клеток это должна быть биосовместимая поверхность. Трехмерные структуры формируются с помощью биопринтера, который использует технологию высокоскоростной струйной печати «биочернил» для формирования заранее запрограммированных конструкций из тех или иных биологических субстанций на «биобумаге». На последней стадии биопринтирования используется инкубатор, в котором при определенных условиях происходит фиксация матрицы или протекают процессы прорастания и пролиферации клеток в случае принтирования клеточных структур.

Широкое применение в восстановительной и заместительной хирургии в последнее время находят такие полимеры, как альгинат, коллаген, желатин, хитозан [2, 5, 7], различные композиции на их основе, а также полиэфиры бактериального происхождения – полиоксибутираты и их сополимеры [1], которые синтезируют прокариотические микроорганизмы в специфических условиях.

Из перечисленных выше биополимеров наиболее распространенным для изготовления матриксов является коллаген, представляющий собой вы-

сокомолекулярный белок соединительной ткани. По массе он составляет 30% от общей массы белков человека. Коллаген придает соединительной ткани механическую прочность и гибкость, участвует в процессах свертывания крови и роста клеток, а также характеризуется низкими антигенными и токсичными свойствами. При введении коллагена в организм он подвергается быстрой резорбции, расщепляется и стимулирует репаративные процессы, в частности образование собственного коллагена организма. В связи с этим коллаген и изделия на основе коллагена широко используются в косметологии и медицине, а коллагеновые губки, гели, пленки и композиты с различными полимерами используют в качестве матриксов для выращивания клеточных культур. Недостатки коллагена связаны с потерей прочности вещества при химической обработке, предшествующей его выделению, а также ограниченным сроком функциональности коллагеновых изделий (порядка одного месяца), что недостаточно для полного восстановления тканей и может приводить к формированию рубцовой ткани.

С конца 80-х годов растет интерес исследователей к полиэфирам бактериологического происхождения: например, полимеру  $\beta$ -оксимасляной кислоты (полиоксибутират, ПОБ), полимеру оксиктановой кислоты и двухкомпонентным сополимерам  $\beta$ -оксибутирата и  $\beta$ -оксивалериата (ПОБ-со-ПОВ) [1]. Эти материалы обладают термопластичностью, оптической активностью, антиоксидантными свойствами, биодegradацией и высокой биосовместимостью. Физико-химические свойства существенно варьируют в зависимости от состава [1]. В настоящее время известно более сотни полиоксиалканоатов. Они накапливаются при определенных условиях в бактериальных клетках в виде гранул, которые хорошо визуализируются при окрашивании. В ряду физико-химических свойств сополимеры ПОБ-со-ПОВ сходны с широко применяемыми и выпускаемыми, не разрушающимися в природной среде синтетическими полимерами, такими как полиэтилен и полипропилен, но недостаточная эластичность и термопластичность гомополимера ПОБ-со-ПОВ существенно ограничивает область его применения [1].

Отдельно следует отметить способность ПОБ-со-ПОВ к биодegradации. В условиях *in vivo* она происходит очень медленно, при постепенном (послойном) выщелачивании материала с поверхности без образования грубых дефектов и потери прочности [1]. Соплимеры ПОБ-со-ПОВ более устойчивы к разрушению в условиях длительной эксплуатации, а их механическая прочность намного превосходит таковую у изделий из гомо- и сополимеров на основе молочной и гликолевой кислот.

К настоящему времени полиоксиалканоаты использовались для изготовления сердечных клапанов и

кровеносных сосудов, костных протезов, нервной ткани, кожных покровов и многих других изделий [1].

Целью данной работы стала разработка новых методов получения биополимерных матриц для восстановительной и заместительной хирургии из биodeградируемых полимеров полиоксибутирата и коллагена с использованием технологий электроспиннинга и биопринтирования.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ УСТАНОВКИ

### А) Установка для электроспиннинга

На рис. 1 представлена установка, созданная для изготовления биополимерных матриц методом электроспиннинга. Экспериментальная установка для электроспиннинга состоит из перфузора (системы подачи полимера) (1), высоковольтного источника питания (2) и неподвижного заземленного коллектора (подложки) (3). Перфузор представляет собой шприц, поршень которого соединен с шаговым двигателем. Скорость движения поршня задавалась в количестве шагов, выполняемых двигателем за секунду.

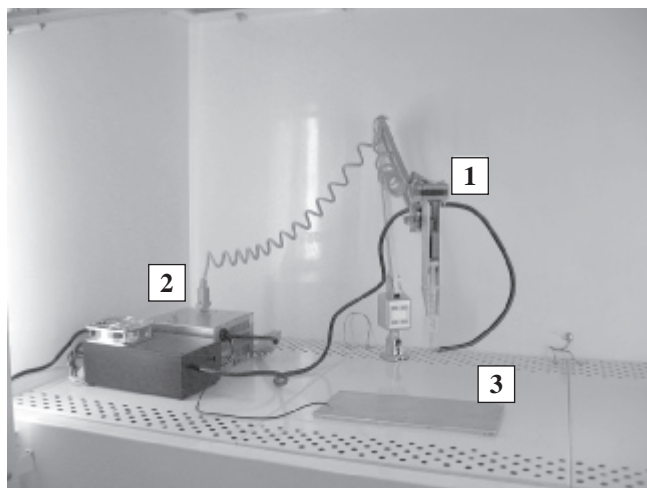


Рис. 1. Установка для электроспиннинга

Предварительные эксперименты показали, что оптимальной является частота вращения шагового двигателя 8–10 Гц, что соответствует скоростям подачи полимера 0,28–0,35 мл/мин. При меньшей скорости полимер застывал на кончике иглы, образуя «пробку», а при большей скорости растворитель не успевал испаряться с поверхности нити при формировании матрицы. Установка для электроспиннинга была помещена в шкаф ламинарного течения, оснащенный вытяжкой и специальным освещением. Все элементы установки для целей электробезопасности были заземлены.

Материалом для формирования матриц служил раствор биологического полимера поли-β-ок-

сибутирата (ПОБ) в метилхлориде. Этот растворитель был выбран вследствие высокой летучести, что приводило к испарению раствора в процессе нанесения волокон на подложку. Перед проведением эксперимента металлическая подложка, на которую наносили образец, тщательно промывалась.

### Б) Установка для биопринтирования

Для целей биопечати нами был модернизирован серийный струйный принтер Epson color 200, представленный на рис. 2. На первом этапе модернизировали подающее устройство принтера. Для использования более толстых, чем бумага, и негибких подложек, таких как лабораторное стекло, из принтера удаляли часть верхних прижимных валиков и вырезали окно в задней части принтера. Так как стекло имеет большую по сравнению с бумагой толщину, печатающую головку и узел ее перемещения поднимали на определенную высоту, чтобы обеспечить беспрепятственное движение печатающей головки над подложкой.



Рис. 2. Струйный принтер Epson color 200

Отметим, что в картридже принтера Epson color 200 возможно применение любых чернил. Вставленный картридж замыкает группу контактов, оповещающая принтер о своем присутствии. Модернизация картриджа заключалась в том, что на этих контактах устанавливали переключатель, который замыкал необходимые контакты в нужный момент времени. При проведении экспериментов головка принтера регулярно промывалась. В принтер была встроена помпа, которая выполняла две функции. Во-первых, она собирала остатки чернил с печатающей головки при ее парковке. Во-вторых, помпа промывала головку в случае ее засорения, прогоняя значительный объем чернил через сопла. После этого чернила через специальную трубку попадали в специальную войлочную

прокладку. Отметим, что при одной промывке печатающей головки расходовалось 20% от всего объема чернил в картридже. Следовательно, после 5 промывок печатающей головки картридж необходимо было заправлять заново. Чтобы избежать этого, система отвода чернил также была модернизирована, и все чернила из помпы собирались в специальную емкость.

Для биопечати использовали 0,1%- и 0,15%-ный растворы коллагена в 0,3 М уксусной кислоте. Для контроля однородности раствора и детектирования в нем нерастворенных частиц использовался лазерный дифрактометр Mastersizer Micro.

## МЕТОДЫ АНАЛИЗА МОРФОЛОГИИ И ТОПОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БИОПОЛИМЕРНЫХ МАТРИКСОВ

### *А) Сканирующая электронная микроскопия*

Микроструктуру поверхности биополимерных матриксов исследовали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на электронном микроскопе JSM 6360LA (JEOL, Япония) при ускоряющих напряжениях 5–10 кВ и увеличении от 200 до 10 000. Необходимое для электронно-микроскопических исследований токопроводящее покрытие получали методом ионного напыления в течение 40 с при постоянном токе 30 мА на установке JFC-1600 Auto Fine Coater (JEOL, Япония). В качестве напыляемого материала применяли платину.

### *Б) Атомно-силовая микроскопия*

Внутреннюю микро- и наноструктуру образцов анализировали методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) высокого разрешения, используя сканирующий зондовый микроскоп (СЗМ) модели Р47-PRO. Это универсальный прибор для комплексных исследований топографии различных объектов с высоким разрешением (~ 10 нм) на воздухе, в жидкостях и контролируемой газовой атмосфере, при температуре до 150 °С.

Измерения проводили также на зондовом микроскопе ИНТЕГРА Томо (NT-MDT, Москва), совмещенном с ультрамикротомом Leica UC6NT. Данный комплекс приборов позволяет по послойным атомно-силовым изображениям сверхтонких срезов (<100 нм) восстанавливать трехмерное изображение внутренней структуры образца. Для получения сверхтонких срезов образцы биополимеров предварительно заливали эпоксидной смолой. Изображения регистрировали с помощью неконтактных кремниевых зондовых датчиков серии NSG10S (NT-MDT) с резонансной частотой 200–300 кГц и жесткостью около 10 Н/м, типичный радиус кри-

визны острия которых был менее 10 нм. Измерения проводили полуконтактным методом, с начальной амплитудой колебаний зонда 10–20 нм. Величину рабочей амплитуды колебаний зонда подбирали экспериментально. Сканирование проводили с частотой строк 1,5 Гц с разрешением 256 × 256 точек.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *А) Электроспиннинг*

Было проделано несколько серий экспериментов по получению матриксов при различных значениях параметров процесса, таких как напряжение между иглой и подложкой, расстояние между ними и концентрация полимера в растворе. Было показано, что оптимальными параметрами являются расстояния в диапазоне от 7 до 20 см, напряжения от 15 до 25 кВ, концентрации полимера в растворе от 5 до 10%.

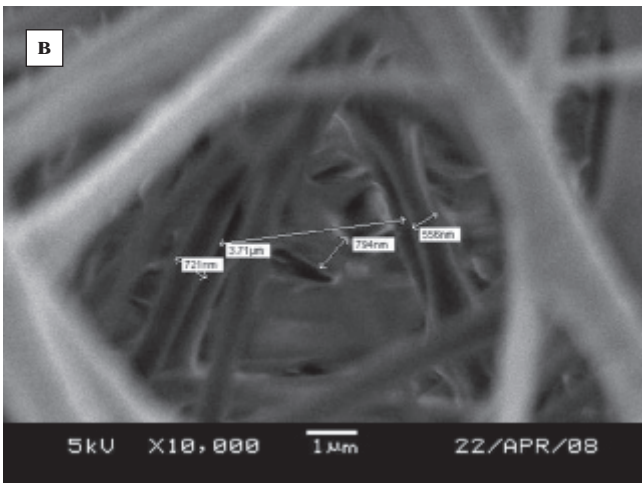
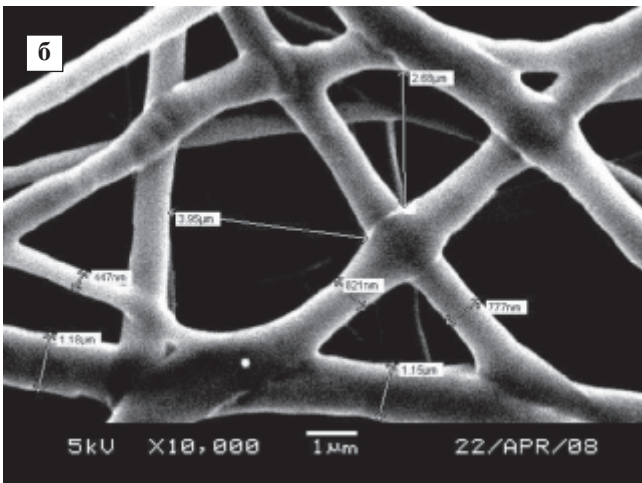
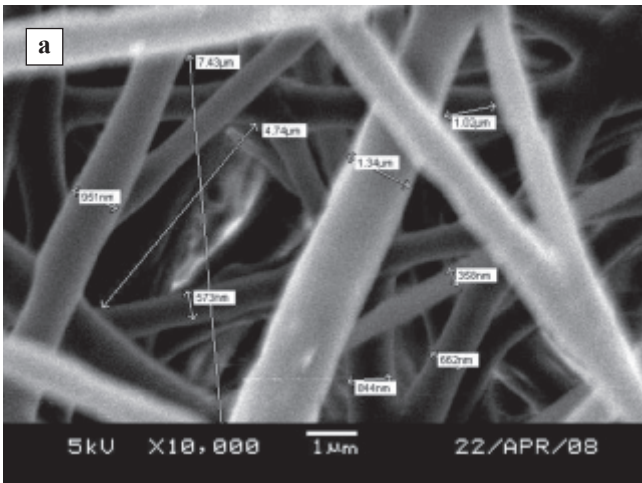
При напряжениях, больших 25 кВ и больших расстояниях (>10 см) в шприце происходил пробой. На маленьких расстояниях (<10 см) пробой происходил между иглой и подложкой. При расстояниях <7 см растворитель не успевал полностью испариться, поэтому во время эксперимента наблюдали в основном не нити, необходимые для формирования матрицы, а разлетающиеся капли. Тот же эффект наблюдали при концентрациях полимера меньше 5%. При увеличении концентрации полимера выше 10% было обнаружено появление коллоидных частиц полимера в растворе и на подложке.

Было проведено несколько серий экспериментов, в которых концентрация полимера в растворе варьировалась в пределах 5–10% весовых, расстояние от иглы до подложки  $h$  изменялось от 10 до 20 см, а скорость подачи раствора составляла 0,2–0,4 мл/мин. Типичные электронно-микроскопические фотографии образцов, полученных в этих экспериментах, представлены на рис. 3.

В результате обработки полученных данных был представлен график зависимости среднего диаметра волокон от расстояния  $h$ , показанный на рис. 4. Из данного графика видно, что диаметр волокон  $d$  увеличивается с увеличением расстояния между иглой и подложкой  $h$ , что находится в соответствии с теоретической оценкой, представленной следующей зависимостью:

$$d \sim E^{-0.5} = \left( \frac{h}{U} \right)^{0.5}.$$

Трехмерная морфология полученных матриксов была исследована с помощью технологии ИНТЕГРА Томо. Трехмерные структуры, полученные в результате восстановления срезов послойных изображений, представлены на рис. 5. В результате обработки полученных трехмерных изображений было установлено, что размер ячеек матрицы в зависимости от ус-

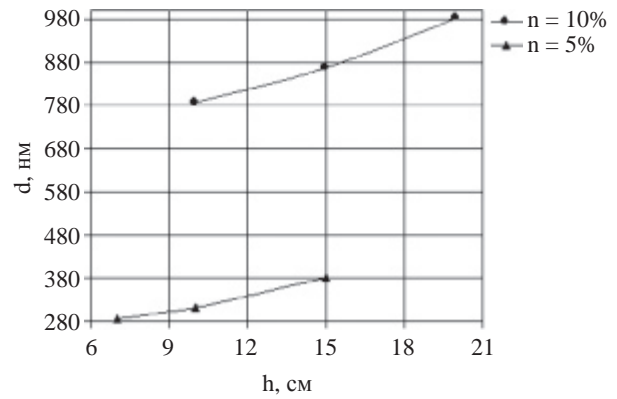


**Рис. 3.** Электронно-микроскопические снимки матриц, полученных методом электроспиннинга при различных расстояниях до подложки – 10 (а), 15 (б) и 20 (в) см

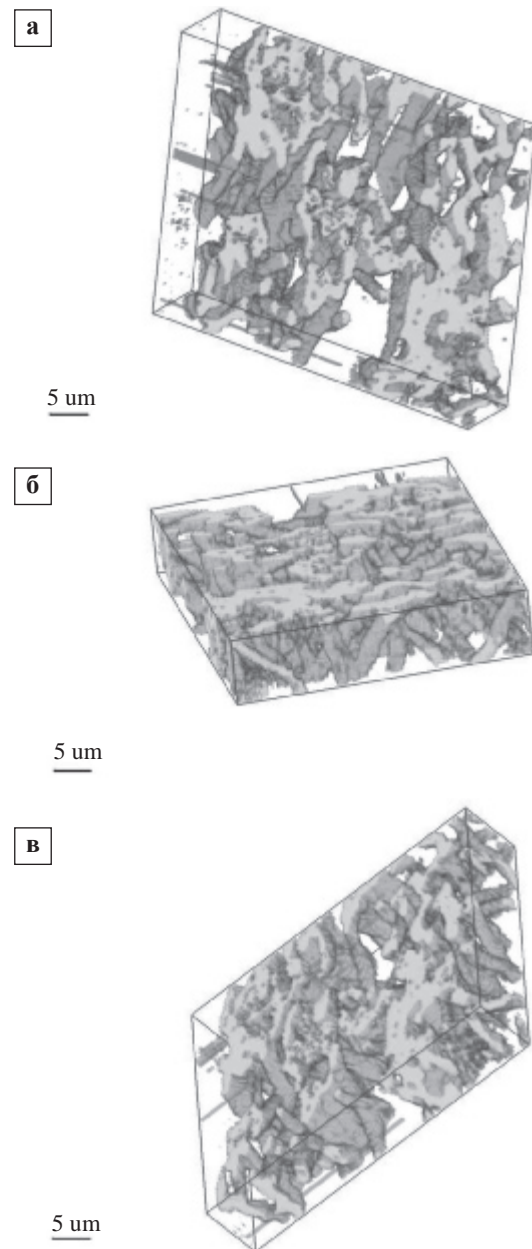
ловий ее формирования меняется в пределах от 2 до 7 микрон, диаметр волокна составляет 500–2000 нм, а пористость структуры варьируется от 75 до 95%.

*Б) Биопринтирование*

Для осуществления процесса биопечати печатающую головку принтера соединяли с резервуаром, содержащим раствор коллагена. С помощью встроенной



**Рис. 4.** Зависимость среднего диаметра волокон d от расстояния между подложкой и иглой h



**Рис. 5.** Матрикс из ПОБ в различных проекциях, полученный методом электроспиннинга: а – 90°; б – 0°; в – 180°. Изображения получены с помощью сканирующей зондовой микроскопии по технологии ИНТЕГРА Томо

в принтер помпы внутренние полости печатающей головки заправляли раствором коллагена. На основании принтера устанавливали подложку, на которую предполагалось наносить заранее заданный рисунок. С помощью управляющего компьютера через драйвер принтера на печать отправляли нужный символ или изображение. После визуального контроля и испарения воды с поверхности подложки печать повторяли. После завершения многослойной печати подложку снимали с принтера для дальнейшего ее анализа. После печати картридж промывали дистиллированной водой и сушили при комнатной температуре.

Эксперименты были проведены с использованием модернизированного принтера Epson color 200 с печатающей головкой, использующей режим черно-белой печати в стандарте «черновик». Были получены образцы на стекле и на полимерной пленке. Каждое изображение пропечатывалось 5 раз. Микрофотографии полученных структур представлены на рис. 6, 7.

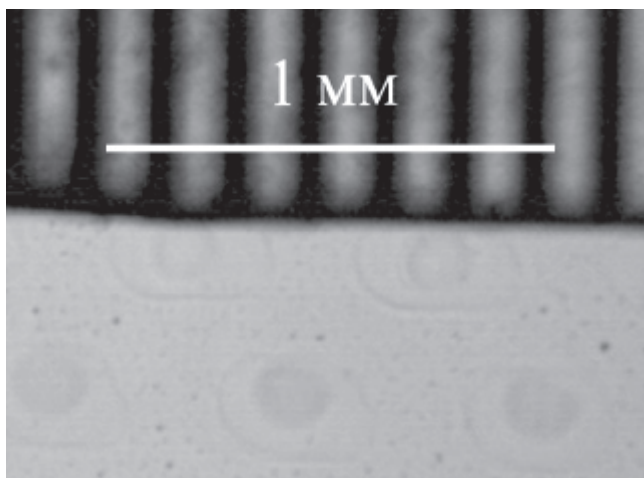


Рис. 6. Микрофотография коллагенового матрикса, полученного методом биопринтирования (оптический микроскоп)

На микрофотографиях видно, что капли имеют вытянутую форму в направлении движения печатающей головки. В некоторых режимах наблюдается слияние отдельных капель в один объект. Характерный размер капель составляет от 250 до 500 мкм. На микрофотографиях, полученных с помощью электронного микроскопа, видна центральная выпуклость круглой формы размером 150 мкм. По-видимому, такая структура образуется в процессе высыхания капли под действием сил поверхностного натяжения.

## ВЫВОДЫ

Установлено, что посредством изменения параметров процесса электроспиннинга можно варьировать толщину биополимерных нитей в пределах от сотен нанометров до нескольких микрон. Разработанная методика позволяет также регулировать морфологические характеристики матрикса, формируемого из полиоксибутирата, такие как пористость и отношение поверхности к объему.

С использованием метода биопринтирования возможно формирование из коллагена структур заранее заданной формы. С использованием модернизированного принтера Epson color 200 с печатающей головкой, использующей режим черно-белой печати, были получены коллагеновые структуры с разрешением 150–200 микрон.

Работа выполнена частично при поддержке Федерального агентства по науке и инновациям, госконтракт 02.512.11.2236.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волова Т.Г., Севастьянов В.И., Шишацкая Е.И. Полиоксисилканоаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины / Под ред. В.И. Шумакова. Новосибирск: Изд. СО РАН, 2003. 330 с.

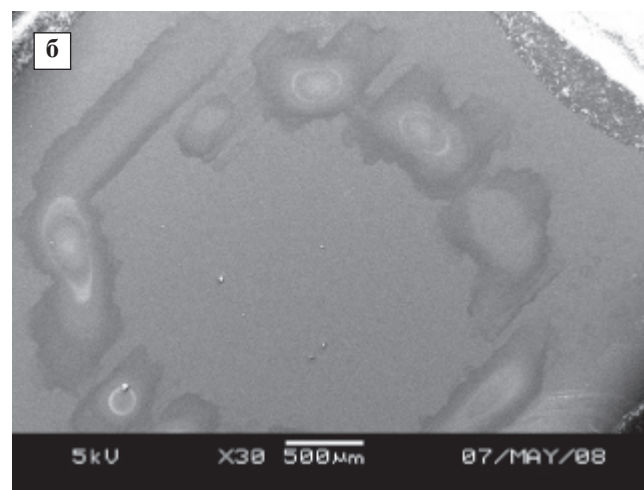
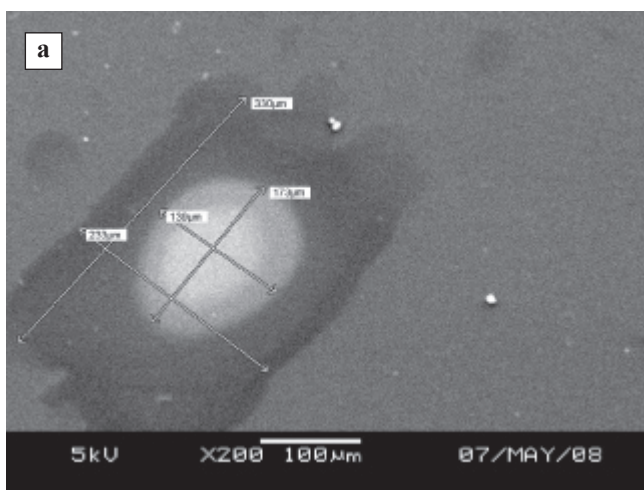


Рис. 7. Микрофотографии коллагенового матрикса, полученного методом биопринтирования (сканирующий электронный микроскоп)

2. Хилькин А.М., Шехтер А.Б., Истранов Л.П., Лемнев В.Л. Коллаген и его применение в медицине. М.: Медицина, 1976. 210 с.
3. Boland T., Mironov V., Gutowska A., Roth E.A., Markwald R.R. Cell and Organ Printing 2: Fusion of Cell Aggregates in Three-Dimensional Gels // The Anatomical record Part A. 2003. V. 272A. P. 497–502.
4. Jakab K., Norotte C., Damon B., Marga F. et al. Tissue Engineering by Self-Assembly of Cells Printed into Topologically Defined Structures // Tissue Engineering Part A. 2008. V. 14. № 3. P. 413–421.
5. Ho M.-H., Kuo P.-Y., Hsieh H.-J., Hsieh T.-Y. et al. Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-zeleation methods // Biomaterials. 2004. V. 25. P. 129–138.
6. Hohman M.M., Shin M., Rutledge G., Brenner M.P. Electrospinning and electrically forced jets. I. Stability theory // Physics of Fluids. 2001. V. 13. № 8. P. 231–238.
7. Li M., Guo Y., Wei Y., MacDiarmid A.G., Lelkes P.I. Electrospinning polyaniline-contained gelatin nanofibers for tissue engineering applications // Biomaterials. 2006. V. 27. P. 2705–2715.
8. Ponticiello M.S., Schinagl R.M., Kadiyala S., Barry P. Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy // J. Biomed. Mater. Res. 2000. V. 52 (2). P. 246–255.
9. Mironov V., Prestwich G., Forgacs G. Bioprinting living structures // J. Mater. Chem. 2007. V. 17. P. 2054–2060.
10. Sumerel J., Lewis J., Doraiswamy A., Deravi L.F. et al. Piezoelectric ink jet processing of materials for medical and biological applications // Biotechnol. J. 2006. V. 1. P. 976–987.
11. Wilson W.C., Boland T. Cell and Organ Printing 1: Protein and Cell Printers // The anatomical record Part A. 2003. V. 272A. P. 491–496.
12. Zonga X., Bienc H., Chungc Y.C. et al. Electrospun fine-textured scaffolds for heart tissue constructs // Biomaterials. 2005. V. 26. P. 5330–5338.

## КАЛЕНДАРЬ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИХ МЕРОПРИЯТИЙ НА 2009 ГОД

Дата	Мероприятие	Место проведения; организация, ответственная за проведение
<b>19–20 мая</b>	II Всероссийская конференция «Донорство органов – ключевая проблема трансплантологии»	г. Москва ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова», 123182, ул. Щукинская, 1 Тел.: (499)190-38-77 (499)190-53-41 e-mail: transplant2009@mail.ru
<b>2 октября</b>	Всероссийская конференция «Трансплантология, XXI век» (к 40-летию ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова»)	г. Москва ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова», 123182, ул. Щукинская, 1 Тел.: (499)190-38-77 (499)190-53-41 e-mail: transplant2009@mail.ru
<b>3–4 декабря</b>	Всероссийская конференция «Инфекции в трансплантологии»	г. Москва ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова», 123182, ул. Щукинская, 1 Тел.: (499)190-38-77 (499)190-53-41 e-mail: transplant2009@mail.ru