

Обработка хитозансодержащих пленок в разряде постоянного тока: свойства поверхности и биосовместимость

Т.С. Демина, *М.Г. Дроздова, *Д.С. Зайцева-Зотова, М.Ю. Яблоков, А.Б. Гильман,
*Е.А. Марквичева, Т.А. Аكوпова, А.Н. Зеленецкий
Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва,
ул. Профсоюзная, д. 70
* Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
E-mail: detans@gmail.com

Исследовано влияние обработки в разряде постоянного тока пленок из образцов хитозана с различной химической структурой, в т.ч. из его привитых сополимеров с поли(L,L-лактидом), на морфологию, химическую структуру и свойства поверхности методами сканирующей электронной микроскопии, рентгенофотоэлектронной спектроскопии и гониометрическими измерениями. Была исследована способность исходных и модифицированных в плазме пленок поддерживать адгезию, рост и пролиферацию различных животных клеток, включая мезенхимальные стволовые клетки человека.

DC discharge treatment of chitosan-containing films: surface properties and biocompatibility. T.S. Demina, M.G. Drozdova, D.S. Zaytseva-Zotova, M.Yu. Yablokov, A.B. Gilman, E.A. Markvicheva, T.A. Akopova, A.N. Zelenetskii. The effect of DC discharge plasma treatment of films of various chitosan samples on their morphology, surface properties and chemical structure was studied using scanning electron microscopy, X-ray photoelectron spectroscopy and contact angle measurements. An ability of non-treated and plasma-treated films to support adhesion, growth and proliferation of various animal cells including human mesenchymal stem cells was evaluated.

Модифицирование поверхности материалов, предназначенных для использования в медицине и биотехнологии, является перспективным направлением изменения морфологии, химической структуры и свойств поверхности, в т.ч. ее способности обеспечивать адгезию, рост и дифференцировку различных клеточных линий. Перспективность воздействия плазмы определяется рядом факторов. Во-первых, плазмохимическая обработка позволяет модифицировать поверхностный слой, не изменяя объемных свойств материала. Во-вторых, этот метод является экологически чистым и не требует применения дополнительных химических веществ и растворителей, что особенно важно для материалов медицинского назначения. Третьим важным фактором является гибкость плазмохимического модифицирования с точки зрения параметров обработки, которые можно варьировать: тип разряда, природа рабочего газа и его давление, ток, время обработки и т.п. и, соответственно, регулировать структуру и свойства поверхности.

Хитозан – продукт деацетилирования природного полисахарида хитина – является одним из наиболее перспективных полимеров для применения в регенеративной медицине в форме пленок, волокон, гидрогелей, нано-/микрочастиц и т.д. [1]. Получение и модифицирование его структуры и свойств различными методами химии высоких энергий, в т.ч. плазмохимии рассмотрено нами в обзоре [2]. Благодаря природному происхождению хитина и различным условиям его деацетилирования, структура получаемого хитозана и его свойства варьируются в широких пределах и существуют значительные сложности со стандартизацией, которые, однако, не снижают интереса к этому полимеру. В работе [3] было показано, что различия в химической структуре полимера (молекулярная масса, степень деацетилирования и т.д.) влияют на эффект модифицирования в плазме. Изменение химической структуры путем получения производных и привитых сополимеров на основе хитозана позволяет, с одной стороны, существенно варьировать объемные и поверхностные свойства материалов и обеспечить возможность их получения с помощью новых технологий, но, с другой стороны, усложняет возможность предсказать эффект плазмохимической обработки [4, 5].

В данной работе суммированы основные факторы, влияющие на эффект обработки в разряде постоянного тока пониженного давления пленок из образцов хитозана с различной химической структурой, а также привитых сополимеров хитозана с поли(L,L-лактидом) (ПЛ), на морфологию поверхности, ее химическую структуру и свойства, в т.ч. способность обеспечивать адгезию, рост и дифференцировку различных клеточных линий.

В работе использовали хитозан, полученный суспензионным (Х-с) или твердофазным (Х-т) методом деацетилирования из хитина, выделенного из панциря крабов. Молекулярная масса (ММ) образцов хитозана составляла 60 и 350 кДа; степень деацетилирования (СД) 0.92 и 0.86 для Х-т и Х-с, соответственно [3]. Привитые сополимеры хитозана Х-т с поли(L,L-лактидом) (ММ 160 кДа), дополнительно модифицированные желатином (ХП-Жел), получали методом твердофазного реакционного смешения, представленного нами в [4]. Пленки получали формованием из растворов полимеров в CH_3COOH (для Х-с и Х-т) или в CH_2Cl_2 (для ХП-Жел или нативного поли(L,L-лактида)). Модифицирование пленок проводили в разряде постоянного тока пониженного давления по методике, описанной нами в [6]. Пленку помещали на аноде или катоде и обрабатывали при токе разряда 50 мА в течение 60 с, в качестве рабочего газа использовали остаточный воздух при давлении 10–20 Па.

Исследование морфологии, химической структуры и свойств поверхности показало, что исходные пленки из образцов хитозана с различными ММ и СД имеют разные параметры поверхности. Прививка на хитозан высокомолекулярного полилактида позволяет формировать пленки из его дисперсий в CH_2Cl_2 , что для нативного хитозана нехарактерно, но приводит к обогащению поверхности сформованных таким образом пленок полилактидными фрагментами. Об этом свидетельствуют данные рентгенофотозлектронной спектроскопии (РФЭС), представленные в Таблице 1. Модифицирование в плазме во всех случаях характеризуется повышением гидрофильности поверхности, которая при обработке на аноде более выражена и приводит к полному растеканию воды.

Исследование химической структуры поверхностного слоя методом РФЭС показало, что обработка пленок из нативного хитозана в плазме приводит к окислению поверхности и увеличению количества азотсодержащих групп. Обработка пленок из привитого сополимера также сопровождалась увеличением содержания азота в поверхностном слое, однако количество кислородсодержащих групп уменьшалось. Такие изменения характерны для модифицирования нативного полилактида и свидетельствуют, что обработка в плазме пленок из сополимеров приводит к проявлению эффектов, характерных для его компонентов. Травление поверхности наблюдалось во всех случаях

Таблица 1. Влияние обработки в плазме на гидрофильность (угол смачивания по воде $\theta_{\text{вода}}$) и химический состав поверхности исследованных образцов (атомные концентрации элементов по данным РФЭС).

Образец		$\theta_{\text{вода}}$, град.	Атомные концентрации, %			
			С	О	N	
Х-с	исходный	89	68	25.9	6.1	
	обработан	на катоде	25	59.1	34.7	6.2
		на аноде	12	62.4	29.5	8.1
Х-т	исходный	68	76.6	19.9	3.5	
	обработан	на катоде	32	56.1	36.7	7.2
		на аноде	24	62.4	27.8	9.8
ХП-Жел	исходный	76	54.1	45.9	–	
	обработан	на катоде	22	60.8	34.4	4.8
		на аноде	10	74.8	21.9	3.3
Полилактид	исходный*	75	52.9	47.1	–	
	обработан	на катоде	11	57	39.1	3.9
		на аноде**	12	–	–	–

* рассчитан исходя из химической структуры; ** нет данных

Исследование влияния модифицирования в плазме на адгезию и рост животных клеток проводили с использованием линии клеток фибробластов мыши (L929) и мезенхимальных стволовых клеток человека (МСК), выделенных из жировой ткани. Из рис. 1 видно, что обработка в плазме пленок влияла на жизнеспособность растущих на таких пленках клеток. Так, обработка пленок из нативного ПЛ, значительно улучшала адгезию и рост клеток L929, тогда как модифицирование пленок из сополимеров приводило к снижению количества жизнеспособных клеток в 3–4 раза [5]. В случае пленок из хитозана, влияние обработки в плазме зависело от типа хитозана [3]. В случае пленок X-с обработка на аноде и катоде приводила к небольшому снижению количества жизнеспособных клеток L929, причем это снижение было больше в случае обработки пленок на катоде. Обработка же пленок X-т на аноде способствовала небольшому увеличению количества клеток, а обработка на катоде не влияла на количество жизнеспособных клеток. Эти результаты можно объяснить сложным характером влияния плазмохимической модификации на биосовместимость обработанной поверхности.

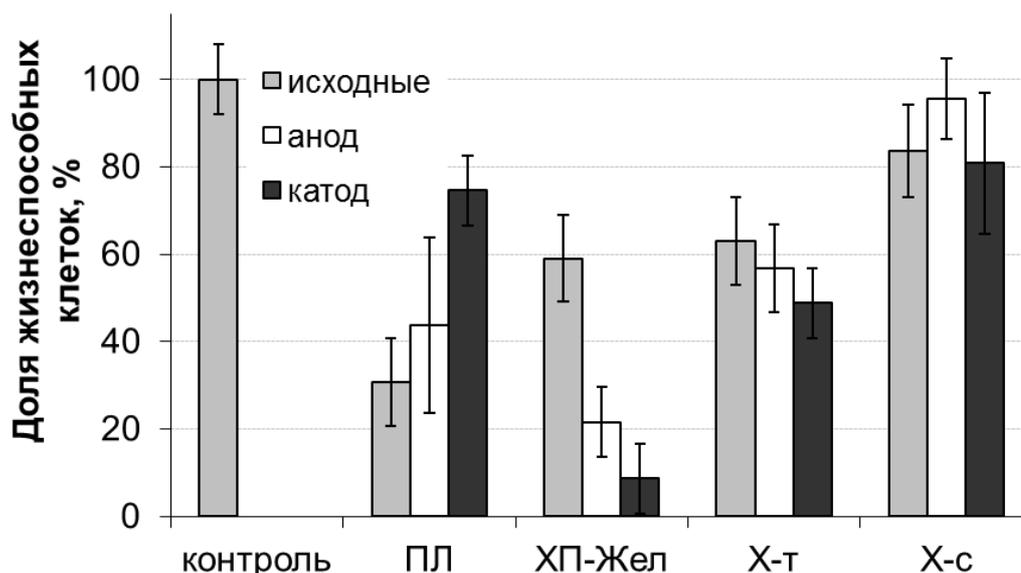


Рис. 1. Относительная жизнеспособность L929 фибробластов мыши, культивируемых на ПЛ, ХПЛ-Жел и хитозановых пленках в течение 1 недели. Результаты МТТ-теста выражены как среднее \pm стандартное отклонение для трех повторов. Жизнеспособность клеток, культивируемых на полистирольных планшетах, использовали в качестве контроля (100%).

Также изучали влияние модифицирования в плазме пленок из хитозана на адгезию, рост и пролиферацию МСК. В [7] было показано, что исходные характеристики макромолекул хитозана влияют на адгезию, пролиферацию и дифференцировку стволовых клеток в процессе их культивирования на пленках хитозана. С другой стороны, модифицирование в плазме пленок из ароматических полиэфиркетонов стимулирует остеогенную дифференцировку стволовых клеток [8]. Однако, литературных данных по влиянию обработки в плазме пленок хитозана на их способность поддерживать адгезию, рост и пролиферацию стволовых клеток найдено не было. Наши исследования показали, что на нативных X-с пленках МСК не распластаются и образуют клеточные агрегаты (рис.2). Модифицирование пленок на аноде способствовало распластыванию клеток и стимулировало их рост и пролиферацию.

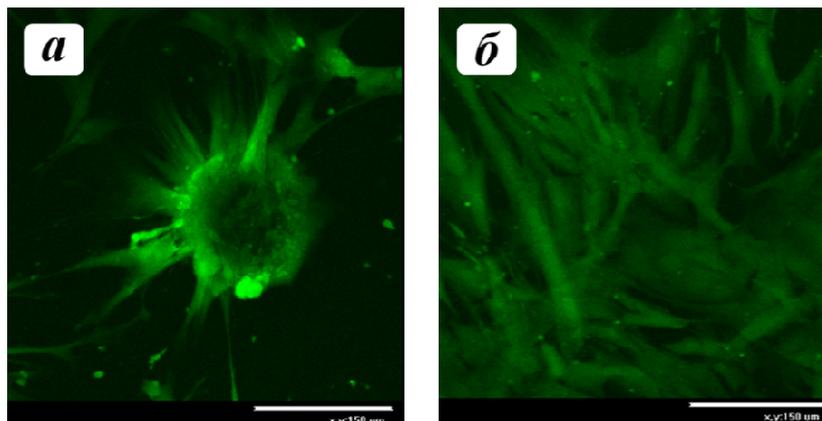


Рис.2. Микрофотографии мезенхимальных стволовых клеток человека через 72 часа культивирования на пленках без обработки (а) и обработанных на аноде (б).

Таким образом, несмотря на то, что обработка в плазме существенно влияет на биосовместимость материалов, важным параметром, от которого зависит эффект этой обработки, являются исходные характеристики полимера, в т.ч. его химическая структура. Разница в структуре и свойствах поверхности исходных пленок приводит к различной интенсивности процессов, протекающих при обработке в плазме, и, соответственно, влияет на эффект плазмохимического модифицирования, в т.ч. с точки зрения биосовместимости поверхности.

Литература

1. Croisier F., Jerome Ch. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering //European Polymer Journal. 2013.V. 49.P. 780–792.
2. Демина Т.С., Гильман А.Б., Акопова Т.А., Зеленецкий А.Н. Модифицирование структуры и свойств хитозана с использованием методов химии высоких энергий // Химия высоких энергий. 2014. Т. 48. №5.С. 339–349.
3. Demina T.S., Drozdova M.G., Yablokov M.Yu., Gaidar A.I., Gilman A.B., Zaytseva-Zotova D.S., Markvicheva E.A., Akopova T.A., Zelenetskii A. N. DC discharge plasma modification of chitosan films: an effect of chitosan chemical structure // Plasma Processing and Polymers. 2015. V. 12. № 8. P. 710–718.
4. Akopova T.A., Demina T.S., Shchegolikhin A.N., Kurkin T.S., Grandfils Ch., Perov N.S., Kechekyan A.S., Zelenetskii A.N. A novel approach to design chitosan-polyester materials for biomedical applications // International Journal of Polymer Science. 2012. doi:10.1155/2012/827967.
5. Demina T., Zaytseva-Zotova D., Yablokov M., Gilman A., Akopova T., Markvicheva E., Zelenetskii A. DC discharge plasma modification of chitosan/gelatin/PLLA films: surface properties, chemical structure and cell affinity // Surface & Coatings Technology. 2012. V. 207. P. 508–516.
6. Демина Т.С., Яблоков М.Ю., Гильман А.Б., Акопова Т.А., Зеленецкий А.Н. Влияние обработки в разряде постоянного тока на свойства поверхности композитных пленок хитозан/поли (L,L-лактид)/желатина // Химия высоких энергий.2012.Т. 46. №1.С. 64–69.
7. Ratanavaraporn J., Kanokpanont S., Tabata Y., Damrongsakkul S. Growth and osteogenic differentiation of a dipose-derived and bone marrow-derived stem cells on chitosan and chitooligosaccharide films // Carbohydrate Polymers. 2009. V. 78. P. 873–878.
8. Wasser-Althaus J., Salamon A., Waser M., Padeste C., Kreutzer M., Piele M., Muller B., Peters K. Differentiation of human mesenchymal stem cells on plasma-treated polyetheretherketone// Journal of Materials Science: Materials in Medicine.2014. V. 25. P. 515–525.