

ИММОБИЛИЗАЦИЯ КОЛЛАГЕНА НА МОДИФИЦИРОВАННЫЕ В ПЛАЗМЕ ПЛЕНКИ ПОЛИЛАКТИДА

IMMOBILIZATION OF COLLAGEN ON PLASMA MODIFIED POLYLACTIDE FILMS

А.В.Бирдибекова¹, Т.С.Демина^{1,2}, (ORCID: 0000-0003-0271-2231), А.Б.Гильман¹,
Е.В.Истранова², П.С.Тимашев² / aisjlu14@mail.ru

A.V.Birdibekova, T.S.Demina, E.V. Istranova, P.S. Timashev

¹Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва

²Институт регенеративной медицины, Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

Исследована эффективность обработки пленок полилактида в плазме пониженного давления для последующей иммобилизации коллагена. Показано, что модифицирование в плазме приводит к травлению, образованию функциональных групп и гидрофилизации поверхности полимерных пленок, и является эффективным подходом к ее активированию перед нанесением биоактивных покрытий из коллагена.

An effect of low-pressure plasma treatment of polylactide films for subsequent immobilization of collagen onto their surface was investigated. It is shown that modification by plasma leads to etching, the formation of functional groups and hydrophilization of the polymer film surface, and it is the effective approach to surface activation prior to the deposition of bioactive collagen coatings.

Ключевые слова: *Иммобилизация покрытия из коллагена, модифицирование в плазме, полилактидная пленка, низкотемпературная плазма пониженного давления.*

Keywords: *immobilization of collagen coating, modification in plasma, polylactide film, low-temperature reduced pressure plasma.*

ВВЕДЕНИЕ

Полилактид является хорошо известным биоразлагаемым синтетическим сложным полиэфиром, который обладает способностью к биодеградации в среде организма, биосовместимостью и хорошими механическими свойствами, что позволяет его применять в медицине в качестве различных материалов для тканевой инженерии и систем доставки лекарств [1–3]. Хотя полилактид и является биосовместимым материалом, но гидрофобности относительная инертность поверхности ограничивают применение материалов на его основе в качестве подложек для адгезии и роста клеток [4]. Следовательно, возникает необходимость в модифицировании или нанесении биоактивных покрытий на поверхность материалов из полилактида. Одним из перспективных подходов к регулированию биосовместимости поверхности материалов из полилактидов является иммобилизация или прививка на них пептидных последовательностей, которые распознаются клеточно-мембранными рецепторами, что приводит к стимуляции прикрепления и пролиферации клеток [5,6].

Для модифицирования поверхности материалов на основе полилактида применяют различные химические или физические методы обработки [7,8]. Использование химических методов воздействия основано на применении химических агентов, которые могут быть цитотоксичны. Среди физических методов модифицирования полимеров одним из наиболее эффективных и экологически чистых является обработка в низкотемпературной плазме. Модифицирование в плазме позволяет не только

целенаправленно регулировать свойства поверхности за счет ее травления, образования функциональных групп, но и активировать ее перед нанесением биопокрытий, на основе белков и полисахаридов, обеспечивая высокую адгезию покрытия к подложке.

В качестве биопокрытий, для повышения биосовместимости материалов из полилактида часто применяют коллаген, который является фибриллярным белком, его молекула содержит три полипептидные цепи, которые образуют уникальную трехспиральную структуру. Преимуществами использования коллагена являются низкий иммуногенный ответ, доступность, изобилие в природе, повышение гемостаза и легкость манипулирования различными формами [9]. Из-за низкой антигенности коллаген используется в качестве структурного компонента многих биополимерных протезов, таких как сердечные клапаны, кровеносные сосуды, препараты для увеличения роста тканей и раневые повязки [10,11].

Целью настоящей работы является исследование влияния обработки в низкотемпературной плазме пленок из полилактида на химическую структуру, морфологию и свойства поверхности, а также оценка возможности нанесения покрытия из коллагена на предварительно активированную в плазме поверхность пленки из полилактида.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пленки из поли(L,L-лактида) (Sigma-Aldrich) получали методом полива на стеклянные чашки Петри его 2% раствора в дихлорметане. Пленки сушили в беспылевом шкафу до полного высыхания. Обработку пленок в низкотемпературной плазме пониженного давления проводили с помощью установки CUTE-1MPR (Корея) в течение 60 сек. при частоте 40 кГц и мощности 50 Вт [12].

Для исследования элементного и химического состава на поверхности материала, применяли рентгеновскую фотоэлектронную спектроскопию (РФЭС). Морфологию поверхности исследовали с помощью сканирующей электронной и атомно-силовой микроскопии. Поверхностные свойства исходных и обработанных пленок полилактида были охарактеризованы измерениями краевого угла (θ) с помощью прибора Acam-MS01 (Apex Instruments, Индия) с использованием двух испытательных жидкостей (бидистиллированная вода или глицерин). Измерения краевых углов проводились, по крайней мере, в трех экземплярах и представлены как среднее значение ($\pm 1^\circ$) для каждой экспериментальной точки. Работу адгезии (W_a), поверхностную энергию (γ), а также ее полярный (γ_p) и дисперсионный (γ_d) компонент рассчитывали по стандартным уравнениям.

Нанесение покрытия из коллагена на пленку полилактида осуществляли путем инкубирования, предварительно обработанной в плазме пленки полилактида, в 0.25 мас.% растворе коллагена в 3% CH_3COOH в течение 2 ч; далее пленку промывали дистиллированной водой и сушили в беспылевом шкафу. Количественный и качественный анализ эффективности иммобилизации коллагена на пленки полилактида проводили с помощью гравиметрического анализа и флуоресцентной микроскопии образцов после иммобилизации селективных по отношению к белку флуоресцентных меток. Исследование изменения массы пленки из полилактида после нанесения на нее коллагена проводили с помощью лабораторных микровесов WXTS3DU (Mettler Toledo, Switzerland) с точностью до 10^{-6} г, предварительно сняв электростатический заряд с образцов с помощью установки AntiStatic Kit. Флуоресцентное окрашивание коллагенового покрытия проводили с помощью красителя изотиоцианат флуоресцеина (FITC) с боратным буфером (pH 8.4), в который добавили раствор FITC (2мг/мл в диметилсульфоксиде). Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 24 часов в темноте. После тщательной промывки дистиллированной водой окрашенного в FITC покрытия коллагена, проводилось наблюдение эмиссии флуоресцентно окрашенных белков с помощью флуоресцентного микроскопа LeicaDFC7000T (LeicaMicrosystems, Wetzlar, Germany).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Гониометрические измерения показали, что краевой угол смачивания по воде исходной пленки составляет $72^{\circ} \pm 1.4$. После обработки в плазме краевой угол по воде уменьшился до $48^{\circ} \pm 0.9$, а последующая иммобилизация коллагена не привела к существенному изменению смачиваемости поверхности (краевой угол смачивания по воде $47^{\circ} \pm 0.9$). Морфологию поверхностного слоя исходной пленки из полилактида и после ее обработки в плазме исследовали с помощью сканирующей электронной и атомно-силовой микроскопии. Согласно данным АСМ, модифицирование в плазме приводит к увеличению среднеквадратичной шероховатости поверхности с 0.26 до 2.37 нм. Согласно данным РФЭС, модифицирование в плазме приводит к увеличению соотношения О/С с 0.49 до 0.50 и образованию азотсодержащих групп (0.6 ат. %), которых на поверхности исходной пленки полилактида не наблюдалось.

Иммобилизацию коллагена на обработанную в плазме поверхность пленки из полилактида подтверждали гравиметрически и с помощью флуоресцентной микроскопии. Гравиметрический анализ обработанных в плазме пленок до и после инкубации в коллагене показал увеличение массы образца на 0.037 ± 0.008 мас.%. Тем не менее, адсорбция коллагена наблюдалась и на исходной пленке полилактида. Хотя увеличение веса образца в этом случае было в два раза ниже, чем после предварительной плазменной обработки субстрата полилактида.

В качестве дополнительного качественного анализа использовали флуоресцентную микроскопию покрытых коллагеном образцов после их инкубирования в селективном по отношению к белкам флуоресцентном красителе. Активная эмиссия излучения при 520 нм указывает на наличие флуоресцентного красителя и, соответственно, коллагена на поверхности пленки из полилактида, обработанной в плазме.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования влияния воздействия плазмы на поверхность пленки полилактида были оценены следующие параметры: морфология, химическая структура и смачиваемость поверхности.

После обработки в плазме поверхность пленок из полилактида стала более гидрофильной. Изменения в гидрофильно-гидрофобном балансе поверхности после обработки в плазме являются суперпозицией эффектов изменения ее морфологии и химического состава. Увеличение шероховатости поверхности после обработки в плазме связано, вероятно, с ее травлением под действием активных компонентов плазмы. Этот процесс компенсируется имплантацией ионов и, соответственно, изменением химического состава поверхности полилактида. Образование полярных кислород и азотсодержащих групп после обработки в плазме хорошо согласуется с увеличением полярного компонента поверхностной энергии и уменьшением краевого угла смачивания по воде.

Гидрофилизация поверхности и образование дополнительных функциональных групп обеспечивает эффективную иммобилизацию коллагена на поверхность обработанной в плазме пленки из полилактида (рис. 1).

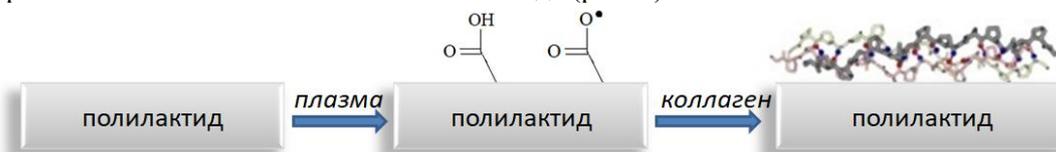


Рис.1. Упрощенная схема нанесения коллагенового покрытия на предварительно обработанную в плазме пленку полилактида.

Исследование иммобилизации покрытия с помощью гравиметрического анализа показало, что увеличение веса образца после иммобилизации коллагена на поверхности пленки из полилактида без предварительной обработки в два раза ниже, чем после

предварительной плазменной обработки. Этот результат подтвердил возможность адсорбции белков на поверхности гидрофобных и инертных материалов, по-видимому, за счет взаимодействий Ван-дер-Ваальса. Исследование поверхности, выполненное, с помощью флуоресцентного микроскопа показало, что все предварительно обработанные в плазме и покрытые коллагеном пленки полилактида демонстрировали эмиссию, исходящую от флуоресцентного красителя, связанного с коллагеном.

ВЫВОДЫ

Исследование влияния низкотемпературной плазмы на пленки из полилактида, показало увеличение шероховатости поверхности, ее гидрофильности, а также образование азотсодержащих групп и увеличение количества кислородсодержащих. На активированную таким образом поверхность пленки полилактида появляется возможность эффективно нанести покрытие из коллагена, что затруднительно в случае немодифицированного полилактида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bergström J.S., Hayman D. An Overview of Mechanical Properties and Material Modeling of Polylactide (PLA) for Medical Applications // *Ann. Biomed. Eng.* - 2016. - Vol. 44 - № 2. - P. 330–340.
2. Vacaras S., Baciut M., Lucaciu O., Dinu C., Baciut G., Crisan L., Hedesiu M., Crisan B., Onisor F., Armencea G., Mitre I., Barbur I., Kretschmer W., Bran S. Understanding the basis of medical use of poly-lactide-based resorbable polymers and composites—a review of the clinical and metabolic impact // *Drug Metab. Rev. Taylor & Francis*, - 2019. - Vol. 51 - № 4. - P. 570–588.
3. Poh P.S.P., Chhaya M.P., Wunner F.M., De-Juan-Pardo E.M., Schilling A.F., Schantz J.T., van Griensven M., Huttmacher D.W. Polylactides in additive biomanufacturing // *Adv. Drug Deliv. Rev. Elsevier B.V.*, - 2016. - Vol. 107. - P. 228–246.
4. 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 // *Surf. Coatings Technol.* - 2012. - Vol. 207. - P. 508–516.
5. Onak G., Şen M., Horzum N., Ercan U.K., Yaralı Z.B., Garipcan B., Karaman O. Aspartic and Glutamic Acid Templated Peptides Conjugation on Plasma Modified Nanofibers for Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells: A Comparative Study // *Sci. Rep.* - 2018. - Vol. 8 - № 1. - P. 1–15.
6. Shved Y.A., Kukhareva L.B., Zorin I.M., Blinova M.I., Bilibin A.Y., Pinaev G.P. Interaction of cultured skin cells with the polylactide matrix covered with different collagen structural isoforms // *Cell tissue biol.* - 2007. - Vol. 1 - № 1. - P. 89–95.
7. Moraczewski K., Rytlewski P., Malinowski R., Zenkiewicz M. Comparison of some effects of modification of a polylactide surface layer by chemical, plasma, and laser methods // *Appl. Surf. Sci.* - 2015. - Vol. 346. - P. 11–17.
8. Demina T.S., Gilman A.B., Zelenetskii A.N. Application of high-energy chemistry methods to the modification of the structure and properties of polylactide (a review) // *High Energy Chem.* - 2017. - Vol. 51 - № 4. - P. 302–314.
9. Bellini D., Cencetti C., Sacchetta A.C., Battista A.M., Martinelli A., Mazzucco L., Scotto D'Abusco A., Matricardi P. PLA-grafting of collagen chains leading to a biomaterial with mechanical performances useful in tendon regeneration // *J. Mech. Behav. Biomed. Mater. Elsevier*, - 2016. - Vol. 64. - P. 151–160.
10. Liu Y., Lu T., Zhang Y., Qiao Y., Xi J., Wang Q. Collagen-conjugated tracheal prosthesis tested in dogs without omental wrapping and silicone stenting // *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* - 2016. - Vol. 23 - № 5. - P. 710–715.
11. Lin Z., Wu T., Wang W., Li B., Wang M., Chen L., Xia H., Zhang T. Biofunctions of

antimicrobial peptide-conjugated alginate/hyaluronic acid/collagen wound dressings promote wound healing of a mixed-bacteria-infected wound // Int. J. Biol. Macromol. Elsevier B.V., - 2019. - Vol. 140. - P. 330–342.

12. Demina T.S., Piskarev M.S., Shpichka A.I., Gilman A.B., Timashev P.S. Wettability and aging of polylactide films as a function of AC-discharge plasma treatment conditions // J. Phys. Conf. Ser. - 2020. - Vol. 1492 - № 1. - P. 012001.