

Выход биологически активных веществ, включенных в полимерные матрицы, сформированные методом селективного лазерного спекания.

С.А.Бочкова¹, Е.Н.Антонов¹, В.Н.Баграташвили¹, Г.Н.Ворожцов³,
В.В.Лихарева², Е.А.Марквичева², В.К.Попов¹, А.В. Попова¹, Л.Д.Румш²

¹Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, ²Институт биоорганической химии им. Академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, ³ФГУП «Государственный научный центр «НИОПИК»

E-mail: biophysicist@inbox.ru

Plantain and calendula extracts were incorporated into the polylactide matrix plasticised with supercritical carbon dioxide (SC-CO₂). Velocities of extract delivery from as received samples and from samples after selective laser sintering were compared. These investigations showed that applied techniques can be effectively used for fabrication of tissue engineering scaffolds and matrixes for drug delivery.

Введение.

Одним из основных элементов современной тканевой инженерии являются пористые трехмерные матричные структуры. Матрицы разрабатываются и используются для различных целей. В простейших случаях это жесткий каркас, который после имплантации интегрируется в окружающие ткани. Более сложные модели предполагают использование биodeградируемых матриц, которые рассасываются синхронно с регенерацией естественной ткани. Для ускорения процесса восстановления ткани, внутрь матрицы вводятся биологически активные вещества: протеины, способствующие адгезии и росту клеток, лекарственные препараты. Для практических применений, в частности, для восстановления костных тканей, необходимо изготавливать имплантаты заданной формы с их окончательной подгонкой во время операции. Это длительный и сложный процесс. Методы быстрого прототипирования, послойного изготовления трехмерных объектов на основе компьютерного моделирования, позволяют ускорить и стандартизировать процесс изготовления имплантатов. В этом случае возможно изготовление точной трехмерной копии костного фрагмента, например, на основе данных компьютерного томографа. Метод поверхностно селективного лазерного спекания (ПСЛС), разрабатываемый в ИПЛИТ РАН наиболее перспективен среди методов быстрого прототипирования для применений в тканевой инженерии. Трехмерные матрицы изготавливаются путем послойного спекания порошковых материалов при их нагреве лазерным излучением. Метод универсален и может применяться для спекания полимерных материалов с различными биоактивными добавками.

В методе ПСЛС по сравнению с классическим методом селективного спекания значительно уменьшены градиенты температур и, соответственно, возможность термодеструкции молекул полимеров и биоактивных агентов. Принципиальная возможность сохранения активности биологически активных веществ (БАВ), инкапсулированных в полилактид и подвергнутых

термическому воздействию в процессе ПСЛС, была продемонстрирована на примере Рибонуклеазы А [1]. Тем не менее, для каждой конкретной композиции материалов и условий спекания необходимо проведение исследований активности веществ, введенных в полимер, и динамики их выхода.

В данной работе нами исследовалась скорость выхода экстракта подорожника и календулы (ЭПИК), включенного с использованием сверхкритической двуокиси углерода внутрь частиц полилактида (ПЛА), которые затем спекались лазерным излучением в твердые структуры.

Материалы и методы.

Для включения БАВ в полимер мы использовали явление пластификации полимеров в сверхкритических флюидах (СКФ) [3]. В качестве БАВ использовались смесь водорастворимых экстрактов подорожника (*Plantago major*) и календулы (*Calendula officinalis*) в соотношении 1:1. Базовым материалом служил порошок ПЛА (Alkermes Inc, USA; Mw 84 kDa), с размером частиц 200 мкм. В ПЛА добавлялись 10 и 20% по весу ЭПИК, размер частиц которого был от 5 до 20 мкм. Включение ЭПИК в ПЛА осуществлялось с использованием сверхкритической двуокиси углерода. Смесь порошков ПЛА и ЭПИК помещалась в камеру высокого давления, (Рис.1), в которую запрессовывался CO_2 . Давление в камере поднималось до 100 Бар, а температура до 40°C . Затем данные параметры поддерживались в течение 1 часа с точностью до 0,02 Бара и $0,1^\circ\text{C}$. Затем двуокись углерода стравливалась в атмосферу. Процесс сброса давления со 100 Бар до нормального атмосферного длился 15 мин. При выходе системы из сверхкритических условий образовывался монолит полимера, с равномерно включенным в него ЭПИК (Рис. 2).

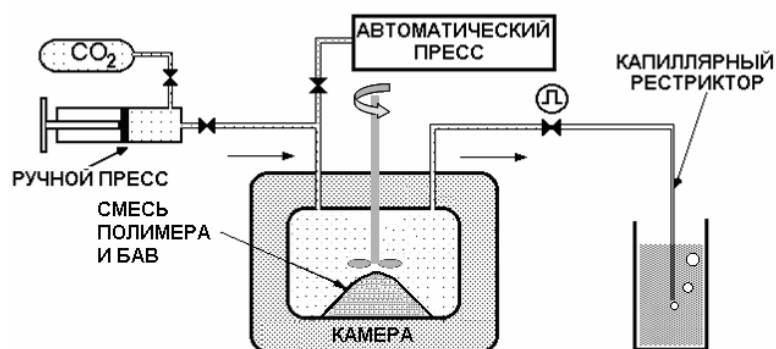


Рис.1. Схема установки для обработки материалов в СКФ.

Сформированный в сверхкритических условиях композит размалывался ротационной мельницей, и полученный порошок просеивался через сита с ячейками 200 мкм. Из полученных порошков методом поверхностно селективного лазерного спекания формировались структуры в виде стержней, диаметром ~ 1 мм и длиной в несколько миллиметров. (Рис. 3). Спекание осуществлялось на системе СЛС-100, разработанной и изготовленной в ИПЛИТ РАН. Источником излучения являлся одномодовый волоконный лазер

с длиной волны излучения $\lambda=1,06$ мкм, мощностью до 12 Вт (НТО “ИРЭ-Полус”, Фрязино, РФ).

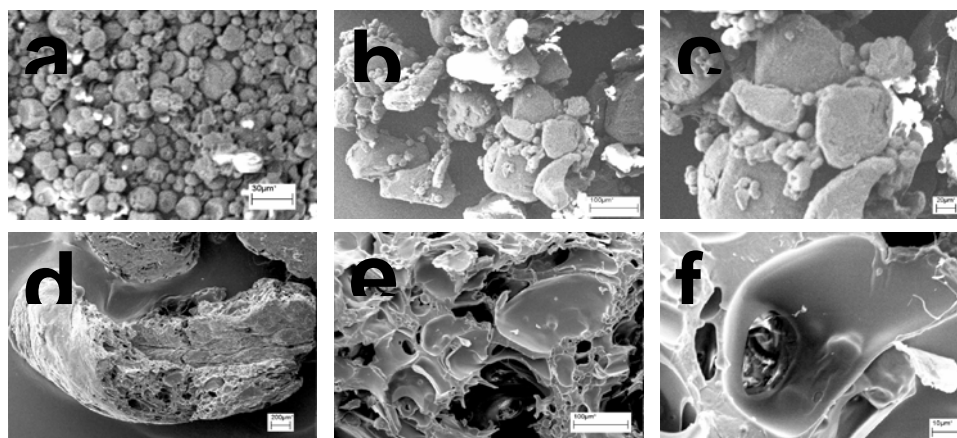


Рис. 2. Микрофотограммы исходных частиц (а-экстракт подорожника и календулы; б, с – смесь экстракта и частиц ПЛА) и композита после СКФ обработки и дробления – d, e, f.

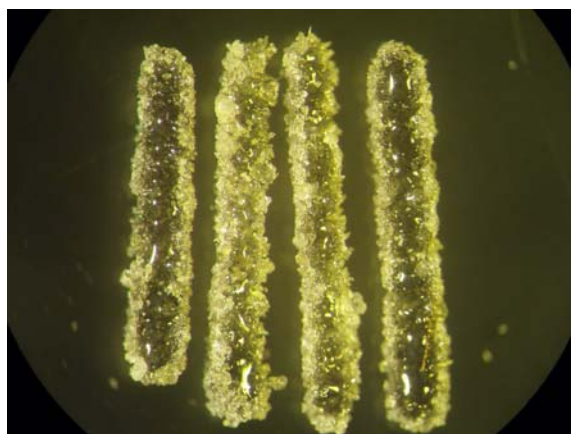


Рис. 3. Вид образцов после лазерного спекания порошков.

Скорость сканирования пучка излучения составляла 5,7 мм/сек. Диаметр пучка излучения на поверхности порошка равнялся 100 мкм. Для выбора параметров спекания, первоначально определялась пороговая мощность излучения, при котором начиналось плавление частиц. Образцы были изготовлены при следующих значениях превышения пороговой мощности спекания: 1,5; 3; 5,75.

Были проведены измерения выхода ЭПИК в физиологический раствор из образцов, как на конечной, так и на промежуточных стадиях их формирования. Инкубацию проводили при комнатной температуре, при постоянном помешивании (100 rpm). После инкубации пробы центрифугировали 15 мин, 4500 rpm. Отбирали супернатант и пропускали его через бумажный фильтр. Полученный раствор переносили в 1-см кварцевые кюветы для измерения оптической плотности. Измерение проводили на длине волны 330 нм (УФ-лампа) при комнатной температуре, объем раствора в кювете 1,5 мл. Измерения выхода ЭПИК проведено на следующих образцах (PLA + ЭПИК 20%):

а) после инкапсулирования в сверхкритическом CO_2 , (100 атм., 1 ч, 40⁰С) и размола в мельнице

б) спеченных из порошков при следующих превышениях мощности порога плавления: 1,5; 3; 5,75.

Результаты и выводы.

При высоких давлениях молекулы CO_2 проникают внутрь полимера и пластифицируют его. Увеличивается свободный объем полимера и подвижность его молекул. Эти условия способствуют объединению частиц самого полимера и включению частиц ЭПИК внутрь полимера. На рис. 2е, 2f видно, что при СКФ процессе частицы экстракта обволакиваются полимером и располагаются внутри его объема. После лазерного спекания частицы ЭПИК, находившиеся в приповерхностном слое полимера, оказываются замурованными внутри его объема. Это должно уменьшать скорость выхода БАВ в раствор. Исследование динамики выхода ЭПИК это подтверждает. Данные по выходу ЭПИК для различных образцов приведены в Таблице 1.

Таблица 1.

Время инкубации	Выход ЭПИК в % для различных образцов			
	После CO_2 и размола	Превышение порога спекания 1,5	Превышение порога спекания 3	Превышение порога спекания 5,75
1 час		39	21	16,5
2 часа	66			
18 часов	78	40,5	28	25

Скорость выхода ЭПИК была очень высокая для промежуточного образца после инкапсулирования в сверхкритическом CO_2 и размола и значительно снижалась для спеченных образцов, уменьшаясь с увеличением вложенной энергии лазерного излучения.

Проведенные исследования показали, что изменением режимов спекания можно управлять скоростью выхода БАВ из полимера. Таким образом, структуры с включенными БАВ, сформированные методом ПСЛС, при имплантации в организм могут обеспечить пролонгированное действие препаратов на окружающие ткани с заданными скоростями.

1. E. N. Antonov, V. N. Bagratashvili, et al., Three-Dimensional Bioactive and Biodegradable Scaffolds Fabricated by Surface-Selective Laser Sintering, *Advanced Materials*, 2005, V. 17, p 327-330
2. В.К.Попов, А.П.Краснов, А.И.Воложин, С.М.Хоудл, Новые биоактивные композиты для регенерации костных тканей, *Перспективные Материалы*, 2004, № 4, сс.49-57.

Данная работа выполнялась при финансовой поддержке РФФИ и Научно-технической программы правительства Москвы «Разработка и практическое освоение в здравоохранении новых методов и средств профилактики, диагностики и лечения онкологических, инфекционных и других опасных заболеваний» на 2007-2009г.