УДК 547.995.15:620.3

Peter P. Snetkov[1], Mayya V. Uspenskaya[1],
Vitaliy S. Voronov[1], Roman O. Olekhnovich[1]

ELECTROSPINNING OF NATIVE HYALURONIC ACID NANOFIBERS FROM WATER-ORGANIC SOLUTIONS

[1]ITMO University, Kronverkskiy Pr-t, 49, St. Petersburg, 197101, Russia. e-mail: ppsnetkov@itmo.ru

This paper briefly concerns the principle of obtaining polymer fibers and particles of nano- and microscale level from aqueous-organic solutions of hyaluronic acid via electrospinning. The formulation and method of obtaining spinning solutions are analyzed. The study deals with the primary results of utilizing of hyaluronic acid spinning solutions based on deionized water/dimethyl sulfoxide (DMSO) solvent mixtures without using additional modifying polymers. The influence of solvent ratios and polymer concentration on the diameter of obtained hyaluronic acid nanofibers was investigated. The prospects of using the obtained fiber materials in the field of medical and bioengineering applications are shown.

Keywords: biopolymer, electrospinning, heteropolysaccharide, hyaluronic acid, nanofiber, process conditions.

Снетков Петр П.[1], Успенская Майя Валерьевна[1],
Воронов Виталий Станиславович[1],
Олехнович Роман Олегович[1]

ПОЛУЧЕНИЕ НАНОВОЛОКОН ИЗ ВОДНО-ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРОВ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРМОВАНИЯ

[1]Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики» (Университет ИТМО)
Кронверкский пр-т, 49, Санкт-Петербург, 197101, Россия. e-mail: ppsnetkov@itmo.ru

В работе кратко описан принцип получения полимерных волокон и частиц нано- и микроуровня из водно-органических растворов гиалуроновой кислоты методом электроформования. Проанализированы рецептура и методика получения прядильных растворов. Представлены первичные результаты по использованию прядильных растворов гиалуроновой кислоты на основе смеси растворителей деионизированная вода-диметилсульфоксид без применения дополнительных модифицирующих полимеров. Изучено влияние соотношения растворителей и концентрации полимера на диаметр получаемых нановолокон гиалуроновой кислоты. Показана перспективность использования разработанных волоконных материалов в области медицинских и биоинженерных приложений.

Ключевые слова: биополимер, электроформование, гетерополисахарид, гиалуроновая кислота, нановолокно, технологические параметры

Дата поступления – 4 июня 2019 года

Введение

Полимерные волокна, в частности, биополимерные нановолокна, привлекают всё большее внимание исследователей различных областей знаний, начиная от химиков-технологов, экологов и биохимиков, заканчивая специалистами в области медицины и биоинженерии.

Такой интерес вызван специфическими свойствами волокон: биосовместимостью, пористостью, воздухопроницаемостью, высокой прочностью, эластичностью, возможностью введения различных наполнителей (в том числе лекарственных), фильтрующими и сорбционными свойствами.

Для получения волокон из растворов различных полимеров в настоящее время применяют четыре основных метода: вытягивание, темплатный метод, метод электроформования (электроспиннинг) [1] и магнитоспиннинг [2].

Одним из наиболее эффективных способов получения нановолокон является метод электроформования. Упрощённо суть метода можно описать так: раствор (расплав) полимера с определённой скоростью подается через металлическую фильеру (подающий электрод), подсоединённую к источнику высокого напряжения (10-50 кВ). Под действием одноимённых электростатических зарядов выходящая из фильеры струя разбивается на микроструи, которые осаждаются на коллекторе (осадительном электроде) в виде волокон диаметром до нескольких сотен нанометров [3; 4]. При этом за счёт изменения технологических параметров процесса и рецептуры прядильного раствора можно получать как волокна, так и полимерные частицы [5].

Несмотря на очевидные преимущества, электроспиннинг имеет некоторые ограничения, касающиеся, в частности, приготовления прядильного полимерного раствора. Прежде всего, предпочтительно использовать растворы полимеров на основе летучих органических растворителей, что позволит стабилизировать процесс электропрядения волокон, а также исключить вероятность возникновения электрического пробоя между фильерой и осадительным электродом, приводящего к остановке прибора и невозможности проведения дальнейшего процесса электроформова-

ния. В случае же использования водосодержащих прядильных растворов необходимо контролировать их электропроводность и поверхностное натяжение.

Одним из наиболее «проблемных», для электроформования, полимеров является гиалуроновая кислота (ГК) – водорастворимый, высокомолекулярный, анионный, линейный гетерополисахарид, состоящий из чередующихся остатков D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина [6]. Молекулярная масса гиалуроновой кислоты животного происхождения (например, из стекловидного тела глаза или гребней кур) может достигать 8,0 МДа [7], бактериального (Streptococcus equi) – 2,4 МДа [8].

Структурная формула гиалуроновой кислоты приведена на рис. 1.

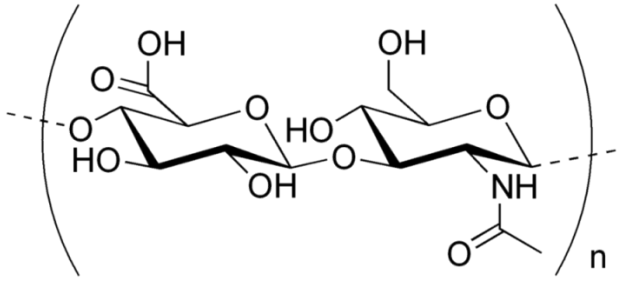


Рис. 1. Структурная формула гиалуроновой кислоты

Водные растворы гиалуроновой кислоты даже малых концентраций обладают значительной вязкостью. Это связано с тем, что в водном растворе полимерные цепи гиалуроновой кислоты принимают форму спирали, причём эти цепочки могут «перекрываться» между собой при низких концентрациях [9]. Однако высоковязкие растворы гиалуроновой кислоты легко поддаются перемещению посредством приложенного давления [10]. Таким образом, эти растворы могут транспортироваться через тонкие системы трубопроводов и фильер в процессе электроспиннинга.

За счёт присутствия функциональных групп водные растворы гиалуроновой кислоты обладают низким значением электрического сопротивления, что вместе с высоким поверхностным натяжением раствора и низкой скоростью испарения воды значительно ухудшает прядомость раствора.

Отсутствие растворимости гиалуроновой кислоты в летучих органических растворителях приводит к необходимости использовать сложные системы растворителей, а также модифицирующие полимеры («полимеры-носители»), например, поливиниловый спирт (ПВС) и полиэтиленоксид (ПЭО).

Так, в работе [11] используется бинарная система: диметилформамид (ДМФА) и вода в объёмных соотношениях 2.0, 1.5, 1.0 и 0.5. Несмотря на наличие стабильного процесса электропрядения, применять полученные волокнистые материалы в медицине не допускается в связи с запретом использования ДМФА в сфере медицины и биоинженерии.

В исследовании [12] доказана возможность использования растворов гиалуроновой кислоты в 50 %-ной уксусной кислоте. Однако использование в составе прядильного раствора кислот приводит к быстрой деполимеризации гиалуроновой кислоты: даже небольшая добавка органической или минеральной кислоты к раствору запускает механизм разрушения [13].

Ещё одним интересным направлением исследований является химическая модификация гиалуроновой кислоты. Так, в работе [14] для формирования волокон была использована тиолированная гиалуроновая кислота, растворённая в питательной среде Игла в модификации Дальбекко (DMEM). Помимо этого, прядильный раствор содержит полимер-носитель – ПЭО, что приводит к значительному уменьшению антимикробных, противовоспалительных и регенеративных свойств полученных волокон по сравнению, например, с плёнками из нативной гиалуроновой кислоты.

Стоит отметить, что гиалуроновая кислота, помимо чувствительности к pH-среды, легко теряет молекулярную массу при любой химической модификации, что ухудшает как сам процесс электроформования, так и качество получаемых волокон.

Таким образом, перед исследователями стоит важная и сложная задача в разработке прядильного раствора гиалуроновой кислоты, по возможности, без использования синтетических полимеров-носителей, без применения токсичных растворителей, а также без добавления органических и минеральных кислот.

Материалы

В работе были использованы следующие материалы: высокомолекулярный гиалуронат натрия марки HA-T производства BLOOMAGE FREDA BIOPHARM CO., LTD (Китай), диметилсульфоксид химически чистый (ХЧ) ТУ 2635-114-44493179-08 (Россия), дистиллированная вода ГОСТ 6709-72.

Методы исследования

Для первичной оценки получаемых волокон был использован оптический микроскоп Микромед-1, который позволяет оперативно произвести оценку вида и структуры полимерных волокнистых материалов непосредственно после процесса электроформования. Для более детального исследования структуры получаемых волокон применялся измерительный микроскоп Olympus STM6.

Для обработки и анализа микрофотографий, а также определения размеров получаемых наноструктур была использована программа ImageJ, National Institutes of Health [15].

Гистограммы распределения размеров полимерных нановолокон на основе гиалуроновой кислоты были получены с применением программного пакета OriginPro, OriginLab Corporation.

Получение образцов нановолокон методом электроформования

Растворы гиалуроновой кислоты для формирования волокон были приготовлены со скоростью перемешивания 350 об/мин на магнитной мешалке при температуре 50 °C. Время перемешивания составляло от 2 до 24 ч в зависимости от соотношения бинарной смеси растворителей.

Формирование волокон проводили на приборе NANON-01A, MECC CO., LTD., путём контролируемого электроспиннинга водных и водно-органических растворов гиалуроновой кислоты на плоский металлический коллектор размерами 150×200 мм. На коллектор устанавливали предварительно очищенные и высушенные предметные стёкла размерами 75×25×1 мм. Рабочее напряжение составляло от 15 до 30 кВ. Пода-

ча раствора в фильеру осуществлялась со скоростью от 0,1 до 2,0 мл/ч. Расстояние между фильерой и коллектором составляло 150 мм.

Нанесение волокон на предметные стёкла осуществлялось в течение 2-3 мин, после чего образцы сушили в рабочей камере в течение 10 мин.

Полученные биополимерные структуры микро- и наноразмерного уровня характеризовались высокой степенью прозрачности, что затрудняло их наблюдение и оценку с использованием простой оптической микроскопии в проходящем свете, поэтому был использован метод контрастирования.

Результаты и их обсуждение

Учитывая недостатки разработанных ранее прядильных растворов, в качестве сорастворителя нами впервые был использован апротонный растворитель, применяемый в медицинской практике в качестве самостоятельного противовоспалительного и местного анестезирующего средства – диметилсульфоксид (ДМСО) для приготовления прядильных растворов гиалуроновой кислоты.

Проведённые эксперименты показали зависимость характера процесса электроспиннинга от соотношения смеси растворителей: вода – диметилсульфоксид. Так, использование водных растворов гиалуроновой кислоты (соотношение воды и ДМСО : 100:0) с концентрацией полимера до 1,0 мас.% приводило к образованию тонкого равномерного спрея, из которого, соответственно, на осадительном электроде формировались полимерные частички с размерами от 70 до 860 нм (рис. 2). Гистограмма распределения диаметров полученных частиц из гиалуроновой кислоты приведена на рис. 3. Из гистограммы видно, что максимальная частотность наблюдается у частиц с размерами от 400 до 500 нм.

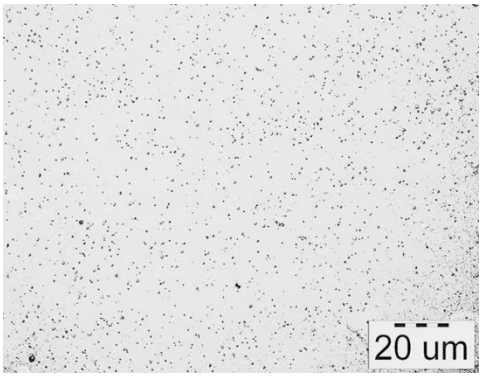


Рис. 2. Микрофотография частиц гиалуроновой кислоты

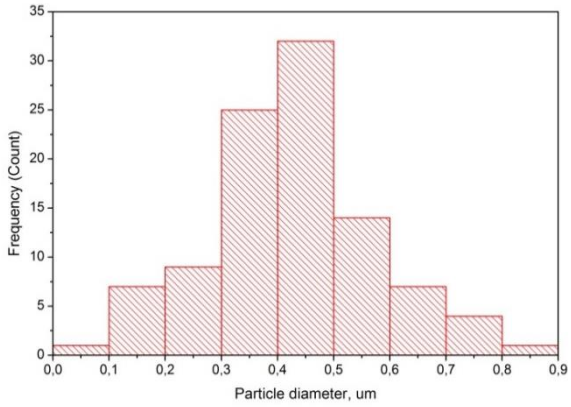


Рис. 3. Гистограмма распределения диаметров частиц гиалуроновой кислоты

При увеличении содержания ДМСО в смеси растворителей и при увеличении концентрации биополимера, процесс смещался от электрогидродинамического распыления в сторону электроспиннинга. Наиболее стабильный процесс наблюдался при соотношении воды и ДМСО 50 : 50. Дальнейшее повышение содержания ДМСО приводило к увеличению времени приготовления раствора, однако, при этом, значимых изменений в морфологии и качестве волокон не наблюдалось.

На рис. 4 представлена микрофотография волокон, полученных из 1,9 % раствора гиалуроновой кислоты при соотношении ДМСО и воды 50 : 50 (по объему). Диаметр волокон составляет от 70 до 470 нм. На рис. 5 представлена гистограмма распределения диаметров волокон из гиалуроновой кислоты: максимальная частотность наблюдается для волокон диаметром от 200 до 250 нм.

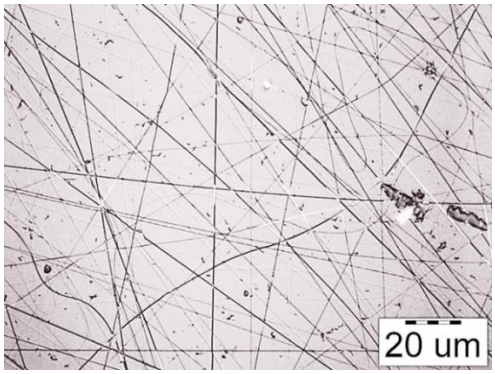


Рис. 4. Микрофотография волокон гиалуроновой кислоты

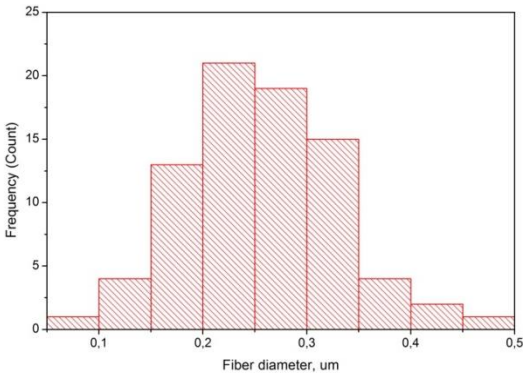


Рис. 5. Гистограмма распределения диаметров волокон гиалуроновой кислоты

Таким образом, использование в качестве бинарной системы растворителей ДМСО и воды позволило получить волокна на основе гиалуроновой кислоты без применения токсичного диметилформамида, без использования полимеров-модификаторов (ПВС и ПЭО), а также без использования органических кислот, разрушающих гиалуроновую кислоту, что позволит создать биоматериалы для медицины и биоинженерии с улучшенным комплексом эксплуатационных свойств.

Заключение

В данной работе были получены методом электроформования перспективные биополимерные структуры нано- и микроразмерного уровня на основе высокомолекулярной гиалуроновой кислоты. Показано влияние концентрации гиалуроновой кислоты на морфологию получаемых структур. При низкой концентра-

ции биополимера (до 1,0 мас.%) образуются частицы диаметром от 70 до 860 нм, которые могут успешно использоваться для создания новых лекарственных препаратов с адресным и пролонгированным действием (drug delivery system). При увеличении концентрации биополимера образуются волокна диаметром от 70 до 470 нм, которые могут быть применены как при создании раневых покрытий, так и в качестве биоинженерных каркасов для выращивания искусственных органов и тканей. Помимо этого, такие волоконные материалы также могут применяться в качестве носителей лекарственных препаратов направленного действия.

Литература

1. *Матвеев А.Т., Афанасов И.М*. Получение нановолокон методом электроформования: учеб. пособие для студентов по специальности «Композиционные наноматериалы» / под ред. *В.В. Авдеева, А.Ю. Алентьева, Б.И. Лазоряк, О.Н. Шорниковой.* М.: МГУ, 2010. 83 с.
2. *Tokarev, A. et* al. Magnetospinning of nano- and microfibers // Advanced Materials. 2015. Vol. 27. Iss. 23. P. 3560-3565.
3. *Добровольская, И.П. и др.* Электроформование композиционных нановолокон на основе хитозана, полиэтиленоксида и нанофибрилл хитина // Высокомолекулярные соединения. Сер. А. 2016. Т. 58. № 2. С. 1-9.
4. *Zafarulla, K. et al*. Morphology, mechanical properties and surface characteristics of electrospun polyacrylonitrile (PAN) nanofiber mats // International Journal of Advanced Engineering and Nano Technology. 2015. Vol. 2. Iss. 3. P. 15–22.
5. *Филатов Ю.Н*. Электроформование волокнистых материалов (ЭФВ-процесс): автореф. дис. ... д-ра хим. наук: 02.00.04 / Научно-исслед. физико-хим. ин-т. Москва, 1998. 55 с.
6. *Тюкавкина, Н.А., Бауков, Ю.И*. Биоорганическая химия: учеб. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 1991. 528 с
7. Сигаева, Н.Н. и др. Химическая модификация гиалуроновой кислоты и её применение в медицине // Вестник Башкирского университета. 2012. Т. 17. № 3. С. 1220-1241.
8. URL: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?interface=CAS+No.&term=9067-32-7 (дата обращения 14.04.2019).
9. *Швайчак Э.* Зависимость вязкости водного раствора гиалуроновой кислоты от ее микроструктуры. Часть I // Российский журнал биомеханики. 2003. Том 7. № 3. С. 87–98.
10. *Necas J., Bartosikova L., Brauner P., Kolar J.* Hyaluronic acid (hyaluronan): a review // Veterinarni Medicina. 2008. Vol. 53. Iss. 8. P. 397–411.
11. Li. J. et al. Electrospinning of hyaluronic acid (HA) and HA/gelatin blends // Macromolecular Rapid Communications. 2006. Vol. 27. Iss. 2. P. 114–120.
12. Ahire, J. et al. Polyethylene oxide (PEO)-hyaluronic acid (HA) nanofibers with kanamycin inhibits the growth of Listeria monocytogenes // Biomedicine & Pharmacotherapy. 2017. Vol. 86. P. 143-148.
13. *Selyanin M.A., Khabarov V.N., Boykov P.Y.* Hyaluronic acid: production, properties, application in biology and medicine / Ed. by *F. Polyak*. UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. 216 p.
14. Ji. Y. et al. . Electrospun three-dimensional hyaluronic acid nanofibrous scaffolds // Biomaterials. 2006. Vol. 27– Iss. 20– P. 3782-3792.
15. *Collins T.* ImageJ for microscopy // Biotechniques. 2007. Vol. 43. Iss. 1S. P. 25-30.

References

1. *Matveev, A.T., Afanasov, I.M*. Poluchenie nanovolokon metodom elektroformovaniya: Uchebnoe posobie dlya studentov po spetsialnosti «Kompozitsionnye nanomaterialy» [Obtaining nanofibers by electroforming: a textbook for students on the specialty "Composite nanomaterials"]. Moscow: Moscow State University. 2010. 83 p.
2. *Tokarev, A. et al.* Magnetospinning of nano- and microfibers. *Advanced Materials*. 2015. vol. 27. iss. 23. pp. 3560–3565.
3. *Dobrovolskaya, I.P. et al*. Electrospinning of composite nanofibers based on chitosan, poly(ethylene oxide), and chitin nanofibrils. *Polymer Science Series A*. 2016. Vol. 58. no 2. P. 1–9.
4. *Zafarulla, K. et al*. Morphology, mechanical properties and surface characteristics of electrospun polyacrylonitrile (PAN) nanofiber mats. *International Journal of Advanced Engineering and Nano Technology (IJAENT)*. 2015. Vol. 2. iss. 3. P. 15–22.
5. *Filatov, Yu.N.* Elektroformovanie voloknistykh materialov [Electroforming of fibrous materials]. Abstract of Doctor's degree dissertation. Moscow. 1998. 55 p.
6. *Tyukavkina, N.A., Baukov, Yu.I.* Bioorganicheskaya khimiya [Bioorganic chemistry]. 2nd ed. Moscow. Meditsina. 1991. 528 p.
7. *Sigaeva, N.N. et al.* Khimicheskaya modifikatsiya gialuronovoi kisloty i ee primenenie v meditsine [Chemical modification of hyaluronic acid and its use in medicine]. *Vestnik Bashkirskogo universiteta.* 2012. Vol. 17. No 3. P. 1220–1241.
8. URL: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?interface=CAS+No.&term=9067-32-7 (accessed 14.04.2019).
9. *Shvaichak E*. Zavisimost' vyazkosti vodnogo rastvora gialuronovoi kisloty ot ee mikrostruktury. Chast' 1 [The dependence of the viscosity of an aqueous solution of hyaluronic acid on its microstructure. Part 1]. *Russian Journal of Biomechanics*. 2003. Vol. 7. No 3. P. 87–98.
10. *Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., Kolar, J*. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. Veterinarni Medicina. 2008. Vol. 53. Iss. 8. P. 397–411.
11. *Li. J. et al.* Electrospinning of hyaluronic acid (HA) and HA/gelatin blends. Macromolecular Rapid Communications. 2006. Vol. 27. Iss. 2. P. 114–120.
12. *Ahire, J. et al*. Polyethylene oxide (PEO)-hyaluronic acid (HA) nanofibers with kanamycin inhibits the growth of Listeria monocytogenes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017. Vol. 86. P. 143–148.
13. *Selyanin, M.A., Khabarov, V.N., Boykov, P.Y.* Hyaluronic acid: production, properties, application in biology and medicine. UK. *John Wiley & Sons, Ltd*. 2015. 215 p.
14. Ji. Y. et al. Electrospun three-dimensional hyaluronic acid nanofibrous scaffolds. *Biomaterials*. 2006. vol. 27. iss. 20. pp. 3782–3792.
15. Collins, T. ImageJ for microscopy. *Biotechniques*. 2007. Vol. 43. Iss. 1S. pp. 25–30.