На правах рукописи

БЕЛОКОНЬ
Мария Александровна

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СШИВАЮЩИХ РЕАГЕНТОВ КОВАЛЕНТНОГО ИЛИ ИОННОГО ТИПА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МАТЕРИАЛОВ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ ГИДРОГЕЛЕЙ ХИТОЗАНА

Специальность 05.17.06 – Технология и переработка
полимеров и композитов

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Москва
2017

Работа выполнена на кафедре химии и технологии полимерных материалов и нанокомпозитов Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный университет имени А.Н.Косыгина (Технологии. Дизайн. Искусство)»

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор, заведующая кафедрой химии и технологии полимерных материалов и нанокомпозитов ФГБОУ ВО «Российский государственный университет имени А.Н.Косыгина (Технологии. Дизайн. Искусство)»
Кильдеева Наталия Рустемовна

Официальные оппоненты: **Штильман Михаил Исаакович**
доктор химических наук, профессор, руководитель учебно-научного центра «Биоматериалы» ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»

Олтаржевская Наталия Дмитриевна
доктор технических наук, профессор, генеральный директор ООО «Колетекс»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова» Российской академии наук

Защита диссертации состоится «18» мая 2017 года в 10^{00} на заседании диссертационного совета Д 212.144.07 при ФГБОУ ВО «Российский государственный университет имени А.Н.Косыгина (Технологии. Дизайн. Искусство)» по адресу: 117997 г. Москва, ул. Садовническая, д. 33, стр. 1, конференц-зал (156 ауд.).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Российский государственный университет имени А.Н.Косыгина (Технологии. Дизайн. Искусство)» и на сайте университета http://www.mgudt.ru.

Автореферат диссертации разослан «___» _____ 2017 года

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 212.144.07
канд. хим. наук, доцент Кузнецов Д.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Гидрогели на основе аминополисахарида хитозана находят широкое применение в различных областях: медицине, фармацевтике, тканевой инженерии, хроматографии, защите окружающей среды. С использованием сшивающих реагентов можно осуществить фазовый переход раствор полимера – гидрогель, который лежит в основе получения различных типов полимерных материалов. Гидрогели могут быть изготовлены в виде насадок, гранул, шариков, мембран, покрытий, капсул, волокон и губок. Необходимость создания той или иной формы полимерного материала на основе модифицированного бифункциональными реагентами хитозана, определяется его назначением.

С целью регулирования свойств биополимерных пленок: растворимости, влагопоглощения и кинетики выделения лекарственных веществ, используют сшивающие реагенты ковалентного или ионного типа. В подавляющем большинстве работ в качестве сшивающего реагента хитозана и других аминосодержащих полимеров используют глутаровый альдегид, однако в ряде публикаций сообщается о токсичности продуктов его взаимодействия с хитозаном, и это является препятствием для их использования в медицине. Поэтому актуальным является поиск новых сшивающих реагентов, а также экспериментальное обоснование применения сшивающих реагентов различной химической природы при разработке на основе хитозана материалов медико-биологического назначения различной структуры.

Работа выполнена в соответствии с основными направлениями исследований кафедры химии и технологии полимерных материалов и нанокомпозитов в рамках базовой части Госзадания Минобрнауки РФ в сфере научной деятельности на 2014-2016 гг. (проект № 2698) и гранта РФФИ № 15-04-07669.

Цель работы заключалась в обосновании выбора сшивающих реагентов для использования в технологии получения на основе гидрогелей хитозана материалов медико-биологического назначения с заданным уровнем функциональных свойств.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **научные задачи:**

- изучить закономерности взаимодействия между хитозаном и ионными сшивающими реагентами (низкомолекулярными полифосфатами) и их влияние на параметры процесса получения пленок и наночастиц хитозана;
- установить особенности механизма взаимодействия хитозана и сшивающего реагента природного происхождения дженипина;
- установить закономерности гелеобразования в растворах хитозана в присутствии дженипина в сравнении с глутаровым альдегидом и их влияние на характеристики получаемых пленок;
- разработать методику получения биополимерных матриксов для тканевой инженерии на основе гидрогелей хитозана, сшитого глутаровым альдегидом или дженипином, с низким содержанием сшивающих реагентов.

Научная новизна. В работе впервые:

1. Научно обоснованы параметры взаимодействия ионных сшивающих реагентов триполифосфата натрия (ТПФ) и пирофосфата калия (ПФ) с функциональными группами хитозана; показано, что наиболее эффективно ионная сшивка протекает при pH 6,0, когда степень протонирования хитозана составила 0,62, а количество ионизованных фосфатных групп в молекулах ТПФ и ПФ больше двух.

2. Разработан новый способ получения нерастворимых, но высоконабухающих в воде (до 6000%) лекарственно-наполненных пленок на основе хитозана, сшитого ионным сшивающим реагентом, путем добавления его в раствор хитозана при температуре выше 50^0C и установлено, что мольное соотношение сшивающий реагент - аминогруппа хитозана определяет растворимость, фармакокинетические и осмотические свойства пленок, при увеличении соотношения ПФ/NH_2 от 0,029 до 0,173 моль/моль степень набухания уменьшается в 6 раз.

3. Установлены закономерности и детализирован механизм реакции сшивки хитозана природным сшивающим реагентом дженипином, лежащей в основе получения биосовместимых гидрогелевых материалов: во вторичную реакцию его олигомеризации вступают молекулы дженипина с внедренным в гетероцикл в результате реакции с хитозаном атомом азота. Это приводит к увеличению длины сшивок в процессе гелеобразования в растворе хитозана.

4. Впервые в широком диапазоне pH установлено влияние параметров процесса гелеобразования в растворах хитозана в присутствии дженипина (молекулярной массы хитозана, pH, температуры и концентрации раствора полимера, количества сшивающего реагента) на время потери системой текучести и свойства полученных гидрогелей, пленок и биополимерных матриксов. Показано, что при увеличении pH от 3,8 до 6,4 скорость гелеобразования увеличивается в 7 раз, снижается степень набухания пленок и матриксов и возрастает интенсивность синей окраски.

5. Выявленные особенности механизма и кинетики взаимодействия хитозана с Gp впервые для системы хитозан - сшивающий реагент позволили реализовать равновесные условия формирования структуры полимерного материала в процессе испарения растворителя, что привело к резкому увеличению прочности хитозановых пленок, сшитых дженипином.

6. Установлено, что цитотоксичность биополимерных матриксов с низким содержанием глутарового альдегида по отношению к клеткам фибробластов не превышает цитотоксичность хитозановых матриксов, полученных с использованием эквимольного количества природного сшивающего реагента.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Разработана концепция модификации хитозана путем ковалентной или ионной сшивки макромолекулярных цепей: сшивающие реагенты ионного типа следует применять преимущественно для поверхностной модификации материалов на основе хитозана (пленок, гранул, микрокапсул), а сшивающие реагенты ковалентного типа - для получения высоконабухающих гидрогелевых материалов путем введения в состав формовочной композиции. Определены пути воздействия на функциональные свойства полимерных материалов на основе гидрогелей хитозана, модифицированного сшивающими реагентами с разным строением функци-

ональных групп. Разработаны принципы получения не растворимых в воде высоконабухающих пленок с повышенной прочностью и не цитотоксичных матриксов из хитозана с низким содержанием дженипина или ГА.

Получен патент РФ на способ получения пленок из хитозана с использованием полифосфатов путем введения их на стадии получения формовочного раствора и акт о внедрении раневых покрытий на основе хитозана (модифицированного триполифосфатом натрия), содержащих антимикробные препараты, в практику Клинико-диагностического центра Московского государственного медико-стоматологического университета. Показана эффективность использования дженипина при получении биополимерных матриксов для выращивания клеток.

Личный вклад автора состоял в поиске и анализе литературных источников по теме диссертации, постановке целей и задач, выполнении экспериментальных исследований и их обсуждении с научным руководителем, написании публикаций. Основные результаты диссертации получены автором лично.

Автор благодарит сотрудников институтов РАН, под руководством или при участии которых выполнен ряд исследований изучаемых объектов: в.н.с. лаборатории полимеров для биологии д.х.н. Е.А. Марквичеву и н.с. М.Г. Дроздову за проведение цитологических исследований, в.н.с. лаборатории термостойких термопластов ИСПМ им. Н.С.Ениколопова РАН Сурина Н.Н. и н.с. Свидченко Е.А. за получение электронных спектров поглощения, в.н.с. ИФХиЭ им. А.Н. Фрумкина Буданцеву Н.А. за получение ИК-спектров, зав. лабораторией структурно-морфологических исследований ИФХиЭ им. А.Н. Фрумкина проф. Чалых А.Е. и с.н.с. к.х.н. Петрову Т.Ф. за проведение сорбционных исследований и расчет парного параметра взаимодействия, с.н.с. лаборатории твердофазных химических реакций ИСПМ им. Н.С.Ениколопова РАН Демину Т.С. за структурные исследования методом СЭМ.

Достоверность результатов проведённых исследований определяется использованием современных взаимодополняющих химических и физико-химических методов исследования (реологические исследования, атомно-силовая и конфокальная лазерная микроскопия, ИК- и УФ-спектроскопия, физико-механические исследования, изучение цитотоксичности, изучение распределения и морфологии клеток) и результатами испытаний разработанных гидрогелей и пленок, проведенных сторонними организациями.

Апробация результатов. Основные результаты работы были представлены и обсуждены на российских и международных конференциях, в частности на: XII Международной конференции «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» (Пермь, 2014), VIII Международной конференции молодых ученых и специалистов «Фундаментальные и прикладные исследования по безопасности и качеству пищевых продуктов» (Видное, 2014), Всероссийской научной Интернет-конференции с международным участием «Фармакологическая наука – от теории к практике» (Казань, 2014), V Международной конференции «BIONANOTOX» (Ираклион,2014), XV Международной научно-технической конференции «Наукоемкие химические технологии-2014» (Звенигород, 2014), Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2015» и «Ломоносов-2016» (Москва, 2015, 2016), X Всероссийской школе-

конференции молодых ученых «Крестовские чтения-2015» (Иваново, 2015), Международной научно-технической конференции «Инновации-2015» (Москва, 2015), III Международной конференции “Bio-Based Polymers and Composites” (Сегед, 2016), Международной конференции «Композит-2016» (Энгельс, 2016).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 19 работ, в том числе 6 в научных журналах из перечня ВАК, 1 статья в сборнике научных статей, получен патент РФ.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 152 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, методической части, обсуждения результатов, выводов, списка цитируемой литературы из 147 ссылок. Работа содержит 10 таблиц, 64 рисунка и приложения на 4 страницах.

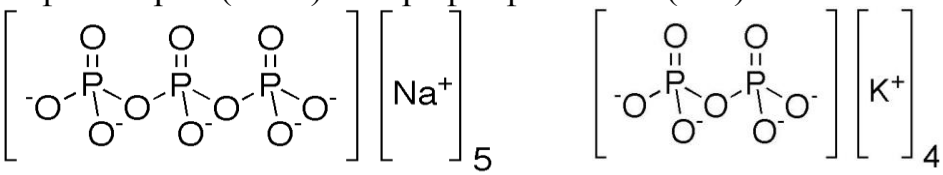
ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность работы, определены цели и задачи, сформулированы научная новизна и практическая значимость. В **литературном обзоре** проанализированы преимущества и недостатки методов получения гидрогелей на основе биополимеров с использованием сшивающих реагентов ковалентного и ионного типа и возможности использования сшивающих реагентов для создания материалов медицинского и биотехнологического назначения. В **методическом разделе** охарактеризованы использованные коммерческие образцы хитозана с различной молекулярной массой и степенью деацетилирования, использованных реагентов и биологически активных соединений, методики приготовления растворов хитозана, гидрогелей, пленок и биополимерных матриц, а также методы их исследования, в частности вискозиметрия, ионометрия, кондуктометрия, ИК- и УФ-спектроскопия, электронная, атомно-силовая микроскопия, сорбция и др. Для обработки полученных результатов использовали стандартные компьютерные программы MathCad, Microsoft Excel, Origin 6.1. В **экспериментальном разделе** исследованы процессы поверхностной и объемной модификации хитозана низкомолекулярными полифосфатами и получения не растворимых в воде биополимерных пленок с регулируемым влагопоглощением и кинетикой выделения биологически активных соединений; изучены закономерности гелеобразования в растворах хитозана в присутствии ковалентных сшивающих реагентов и условия получения биополимерных пленок и широкопористых биополимерных матриц для тканевой инженерии на основе хитозана, сшитого дженипином или глутаровым альдегидом, охарактеризованы их физико-химические, физико-механические свойства и биологическая активность.

1. Получение материалов на основе хитозана с использованием сшивающих реагентов ионного типа

Аминогруппы хитозана в водных растворах кислот протонируются, приобретая положительный заряд и способность связываться с низкомолекулярными полианионами за счет взаимодействия с отрицательно заряженными ионизующимися группами. Рассмотрены два основных способа получения ионно-сшитых гидрогелей хитозана: путем простого погружения хитозановой пленки в раствор

сшивающего реагента или путем смешивания растворов хитозана и сшивающего реагента при определенных соотношениях. Последний метод приводит к получению наноразмерных частиц. С целью исследования влияния строения полифосфата и условий его взаимодействия с аминогруппами хитозана в процессе получения нерастворимых пленочных материалов в настоящей работе были использованы ионные сшивающие реагенты, содержащие различное число фосфатных групп: триполифосфат натрия (ТПФ) и пирофосфат калия (ПФ):



ТПФ ПФ

Параметры процесса сшивки определяют важнейшие свойства сшитых полимерных материалов, таких как растворимость, механическая прочность, степень набухания и диффузионные характеристики. Поэтому с целью определения путей регулирования свойств полимерных пленок на основе хитозана были изучены условия взаимодействия функциональных групп полимера и полифосфатов с использованием методов потенциометрического, кондуктометрического и нефелометрического титрования (рис.1,2).

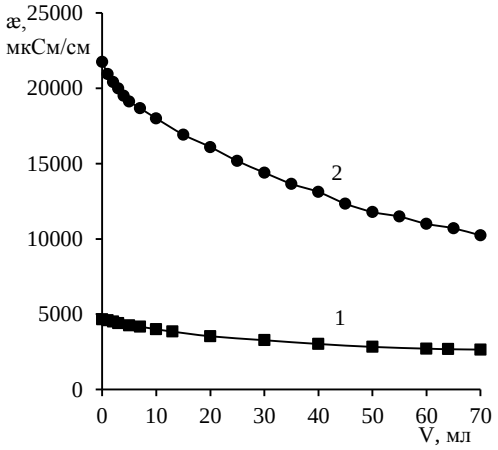


Рис. 1 – Изменение электропроводности 0,3% растворов хитозана в 2% уксусной кислоте в процессе титрования 0,1% раствором ТПФ при pH=4 (1) и pH=6 (2)

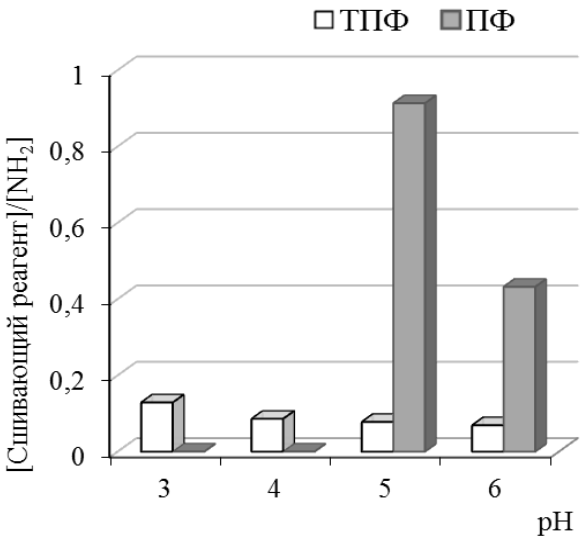


Рис. 2 – Изменение количества сшивающего реагента (ТПФ или ПФ) в точке помутнения 0,3% раствора хитозана при различных значениях pH.

Уменьшение электропроводности раствора хитозана в процессе титрования полифосфатами свидетельствует об образовании ионных связей между протонированными аминогруппами полимера и отрицательно заряженными группами фосфата, что подтверждается результатами ИК-спектроскопии (рис. 3). В ИК спектрах пленок из хитозана, выдержанных в растворе ТПФ, появляются полосы при 1217-1214 см$^{-1}$, соответствующие колебаниям ν(P=O). Кроме того происходит увеличение интенсивности и сдвиг в область низких частот полосы деформаци-

онных колебаний $\delta(NH_2)$, что указывает на вовлечение этих групп в связывание с $P_3O_{10}^{5-}$-анионами.

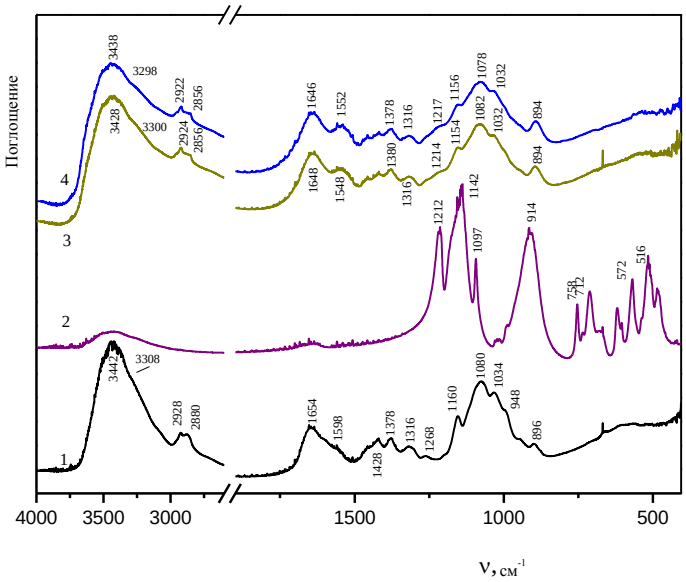


Рис. 3 – Фурье ИК спектры хитозана (1); ТПФ (2); пленки из хитозана, выдержанной в растворе ТПФ 15 минут (3) и 30 минут (4).

Результаты нефелометрических измерений показали, что при pH 6,0 помутнение раствора вследствие ионной межмолекулярной сшивки хитозана ТПФ происходит при соотношении [ТПФ]/[NH_2] в 6 раз меньше, чем в случае использования ПФ (рис. 2), что обусловлено большим содержанием ионизованных функциональных групп в молекуле ТПФ. Для образования нерастворимых продуктов взаимодействия полифосфатов и хитозана при снижении степени ионизации с уменьшением pH происходит при большем содержании сшивающего реагента (рис. 2).

Опалесценция в точке помутнения 0,3%-ного раствора хитозана в процессе его титрования ТПФ свидетельствует о появлении наноразмерных образований. Методом динамического рассеяния света была определена кинетика формирования наночастиц. Процесс формирования наночастиц размером 160-220 *нм* происходит довольно быстро, но в дальнейшем, наблюдалось укрупнение наночастиц, которое может происходить вследствие прикрепления к их поверхности новых макромолекул или более мелких наночастиц.

Было установлено, что наиболее эффективно ионная сшивка протекает при pH 6,0, когда степень протонирования хитозана составила 0,62, а количество ионизованных фосфатных групп в молекулах ТПФ и ПФ больше двух. Эти условия были выбраны для модификации биологически активных пленок на основе хитозана.

Получение биологически активных пленок, поверхностно-модифицированных полифосфатами.

Введение в хитозановые пленки анестетика местного действия лидокаина позволит придать материалу обезболивающее действие за счет подавлении возбудимости чувствительных нервных окончаний и торможении распространения сигнала по нервным волокнам, а использование антимикробых веществ мирамистина, фурагина или хлоргексидина биглюконата – обеспечит способность

подавлять развитие инфекции. Биологически активные хитозановые пленки, были получены методом полива с последующим испарением растворителя из 4% раствора хитозана в 4% уксусной кислоте, содержащего лекарственные вещества.

Свежесформованные пленки были обработаны 0,5%-ным раствором триполифосфата натрия или 1,0% раствором пирофосфата калия с pH 6 в течение 5 и 30 минут. Выбор концентрации сшивающих реагентов для модификации свежесформованных хитозановых пленок сделан с учетом технологии, предусматривающей небольшое время контакта пленки с раствором сшивающего реагента, а также необходимости предотвращения ее растворения в процессе поверхностной модификации.

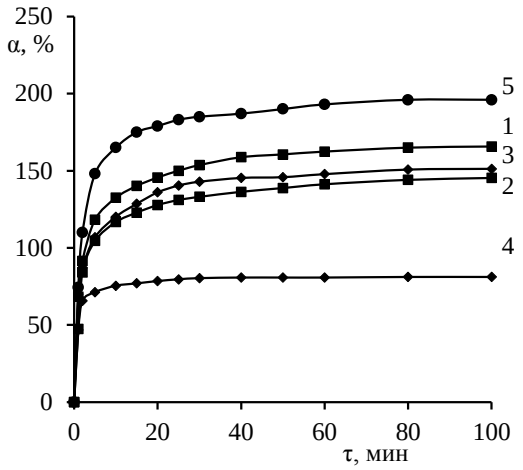


Рис. 4 –Кинетика набухания хитозановых пленок при различных сшивающих реагентах и времени обработки (1 – ПФ 1,0% , 15 минут; 2 – ПФ 1,0%, 30 минут; 3 – ТПФ 1,0%, 15 минут; 4 – ТПФ 1,0%, 30 минут; 5 – ТПФ 0,5%, 30 минут).

При погружении хитозановых пленок в растворы ТПФ (0,5% и 1,0%) и ПФ (1,0%) с последующей промывкой водой были получены нерастворимые материалы. При изменении времени выдерживания пленки в растворе ТПФ или ПФ от 15 до 30 минут равновесная степень набухания хитозановых пленок, уменьшалась от 196 до 80% для ТПФ и от 165 до 148% для ПФ (рис. 4). Низкая степень набухания модифицированных пленок может быть связана с высокой скоростью диффузии сшивающего реагента внутрь пленок и высокой степенью превращения аминогрупп хитозана в объеме пленки.

На рис. 5 и 6 приведены кинетические кривые высвобождения лекарственных соединений из биологически активных поверхностно-модифицированных пленок. Выделение лидокаина из пленки, обработанной ТПФ в течение 30 минут, происходит медленнее, чем в случае пленки, обработанной 5 минут. Это может быть связано с увеличением во времени толщины модифицированного слоя. При этом количество выделившегося лидокаина первом случае составило всего 20% от введенного изначально, а во втором – 43,6% (рис. 5). Методом ИК-спектроскопии показано, что аминогруппы гидрохлорида лидокаина в процессе сшивки полимера могут образовывать ионные связи с ионизованными фосфатными группами триполифосфата натрия. Поэтому, часть лидокаина может оставаться в пленке, причем тем большая его часть, чем дольше проводится обработка ионным сшивающим реагентом.

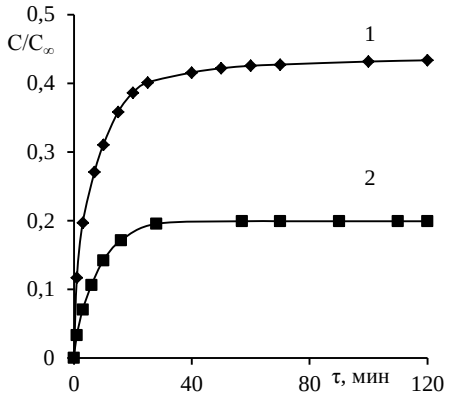


Рис. 5 – Кинетика выделения лидокаина из пленки на основе хитозана, обработанной триполифосфатом натрия (0,5%) в течение 5 (1) и 30 минут (2) в 0,9% раствор NaCl.

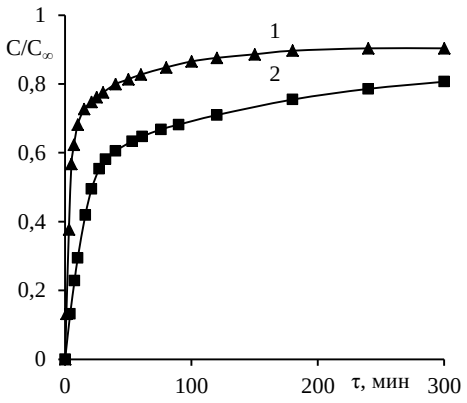


Рис. 6 – Кинетика выделения мирамистина из пленки на основе хитозана, обработанной 1,0%-ным раствором ПФ в течение 5 (1) и 30 минут (2)

Количество выделившегося мирамистина для исследованных образцов составило примерно 80-90% от введенного в пленку (рис. 6). Увеличение времени обработки пленок триполифосфатом натрия от 5 до 30 минут позволяет увеличивать время высвобождения лекарственного вещества от 2,5 до 6 часов и почти до 8 часов при использовании вместо ТПФ пирофосфата калия.

Таким образом, обоснование условий модификации хитозановых пленок полифосфатами позволило получить не растворимые в воде биополимерные пленки с низким влагопоглощением и регулируемой кинетикой выделения биологически активных соединений.

Необходимость использования поверхностной модификации пленок полифосфатами связана с высокой скоростью образования ионных связей с аминогруппами хитозана (фактическим отсутствием кинетических стадий, предшествующих фазовому разделению в системе). Это создает необходимость применения специальных приемов при проведении сшивки, если речь идет о получении гидрогеля или одностадийном способе модификации пленок.

Разработка метода получения хитозановых пленок из формовочных композиций, содержащих полифосфаты.

При введении сшивающих реагентов в 4%-ный раствор хитозана вследствие высокой вязкости среды ионные сшивающие реагенты не успевают распределиться в объеме фазы, поэтому сшивка вызывает быструю коагуляцию в месте прибавления растворов сшивающих реагентов. Нами предложен прием, позволяющий за счет увеличения энергии теплового движения макромолекул хитозана и их сегментов и снижения вязкости системы путем повышения температуры, предотвратить сшивку хитозана в месте прибавления раствора полифосфата. Повышение температуры позволило ввести ПФ в раствор хитозана (4%) при соотношении, необходимом для сшивки полимера, при этом путем варьирования соотношения [ПФ]/[NH_2] можно в необходимых пределах изменять степень набухания и растворимость пленки.

В процессе испарения растворителя концентрация формовочного раствора увеличивается, что обеспечивает изменение условий для реализации электростатических взаимодействий между противоположно-заряженными функциональными группами, принадлежащими разным макромолекулам модифицированного хитозана. Об этом свидетельствует помутнение пленки в процессе испарения растворителя, а также изменение морфологии модифицированной пленки по сравнению с пленкой, полученной в отсутствии сшивающего реагента (рис. 7).

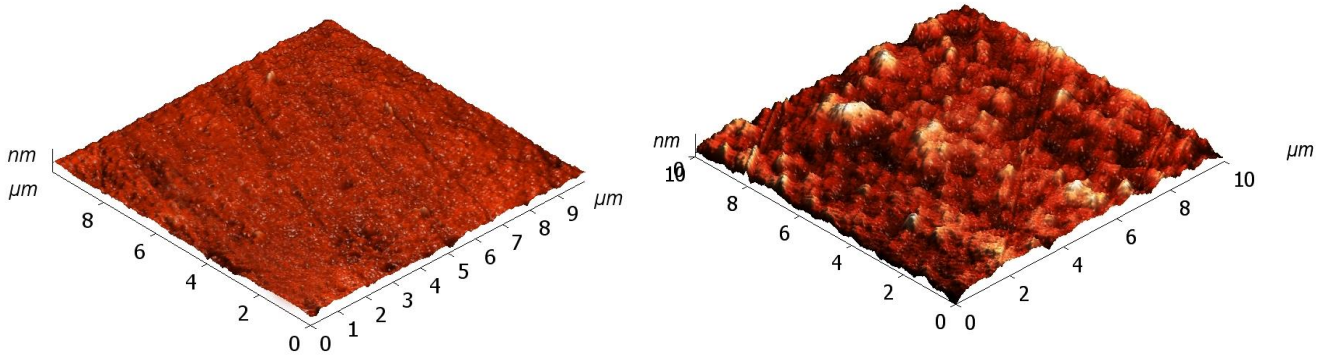


Рис. 7 – АСМ изображения пленки из хитозана (слева) и пленки из хитозана, содержащей ПФ при соотношении [ПФ]/[NH_2] – 0,072(справа)

Предложенный метод получения пленок позволяет получить не растворимые в воде пленки при низком содержании полифосфата. Полученная при соотношении [ТПФ]/[NH_2] 0,036 моль/моль хитозановая пленка обладала высокими осмотическими свойствами: равновесная степень набухания в воде составила 6780%; в случае ПФ -3500% (ПФ]/[NH_2 0,029 моль/моль).

Разработанный способ получения сшитых хитозановых пленок путем введения ионного полифункционального соединения непосредственно в формовочный раствор хитозана был использован при получении антимикробных лекарственно-наполненных пленок с высоким влагопоглощением, которые были внедрены в практику Клинико-диагностического центра Московского государственного медико-стоматологического университета.

Технологические параметры получения и свойства поверхностно- и объемно-модифицированных лекарственно-наполненных пленок из хитозана приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Параметры получения и свойства лекарственно-наполненных пленок из хитозана, полученных с использованием ионных сшивающих реагентов

Способ модификации	Технологические параметры					Свойства пленок	
	Сшивающий реагент (СР)	pH	Концентрация СР/ХТЗ, %	СР/NH_2, моль/моль	Время обработки, мин	Степень набухания, %	Время выделения 70% мирамистина, мин
Поверхностная	ТПФ	6,0	0,5/4,0	-	30	200	50
	ПФ	6,0	1,0/4,0	-	30	140	120
Объемная	ПФ	6,0	1,0/4,0	0,029	-	3500	40

2. Использование сшивающих реагентов ковалентного типа для получения полимерных материалов на основе гидрогелей хитозана

Наиболее распространенным ковалентным сшивающим реагентом для хитозана на сегодняшний день является глутаровый альдегид (ГА). В процессе его взаимодействия с хитозаном происходит не только сшивка полисахаридных цепей, но также и альдольная конденсация ГА, приводящая к образованию продуктов нерегулярного строения, что является основным препятствием при применении материалов, сшитых ГА, в медицине. Особый интерес с точки зрения медицинского использования представляет сшивающий реагент природного происхождения дженипин (Gp).

В настоящей главе установлены особенности гелеобразования и сшивки хитозана Gp, что позволило разработать технологические параметры получения пленок с высокой влагоудерживающей способностью и высокопористых гидрогелевых матриксов.

Исследование процесса гелеобразования в растворах хитозана в присутствии дженипина.

Процесс гелеобразования хитозана в присутствии дженипина был изучен в сравнении с ГА в широком диапазоне pH (4,0–6,4) и молекулярных массах хитозана 95–320 кДа, при различных мольных соотношениях сшивающего реагента к аминосодержащему элементарному звену хитозана.

Использование приема увеличения pH раствора хитозана до 6,4 путем потенциометрического прибавления концентрированной щелочи привело к увеличению скорости гелеобразования по сравнению с описанными в литературе результатами. Было установлено, что ГА сшивает макромолекулы хитозана значительно быстрее дженипина, что связано с особенностями механизма реакции. Увеличение молекулярной массы хитозана от 190 до 320 кДа приводило к снижению времени гелеобразования, соответствующему резкому росту вязкости на рис.8, при всех исследуемых концентрациях дженипина и ГА в результате уменьшения трансляционной подвижности макромолекул в растворе, вследствие чего для потери системой способности к течению оказалось достаточно меньшего числа химических сшивок.

Кинетика изменения модуля упругости гелей, полученных в разных условиях, была исследована после завершения гелеобразования (рис.9). Способность сопротивляться деформированию при сжатии у гидрогелей хитозана (ММ 320 кДа), сшитого Gp, была значительно ниже, чем у гидрогеля, полученного при использовании эквимольного количества ГА (значения E различались более, чем в 2 раза). Это может быть связано с особенностями механизма взаимодействия Gp с аминогруппами хитозана.

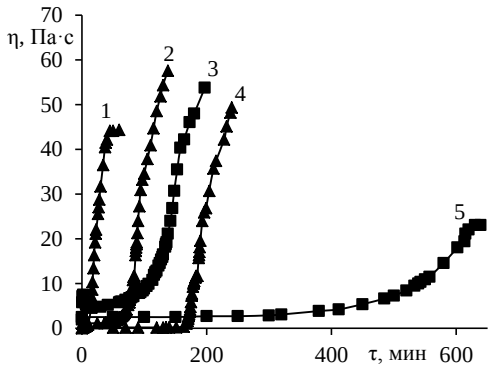


Рис. 8 – Кинетика изменения вязкости в 2%-ном (1, 3-5) и 3,2%-ном (2) растворах хитозана с ММ 190 кДа (▲) и 320 кДа (■) в процессе сшивки ГА (1) или Gp (2-5). pH хитозана 3,8 (5) и 5,6 (1-4), соотношение ГА(Gp)/NH_2 0,02 моль/моль.

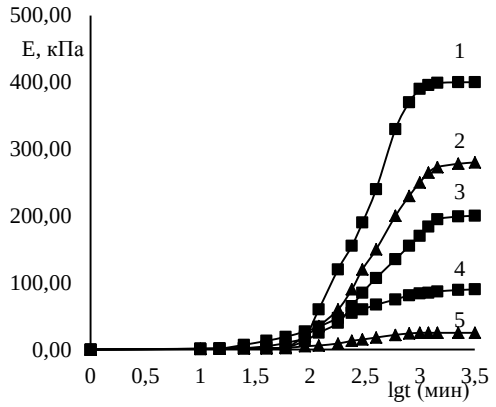


Рис. 9 – Кинетика изменения модуля упругости (E) сшитых Gp (1,2, 4, 5) или ГА (3) растворов и гелей хитозана с ММ массой 190 кДа (▲) и 320 кДа (■) и соотношением Gp(ГА)/NH_2 0,02 моль/моль (3-5) и 0,08 (1-2) моль/моль (pH 5,6).

Изучение механизма взаимодействия хитозана с Gp с использованием электронных спектров поглощения.

Добавление дженипина к раствору хитозана приводит не только к изменению вязкости раствора хитозана, но и появлению поглощения в нескольких диапазонах видимой (610 *нм*) и ультрафиолетовой (240, 285 *нм*) областей спектра. С целью детализация механизма взаимодействия хитозана с дженипином было проведено исследование кинетики изменения поглощения системы раствор хитозана - дженипин в процессе сшивки хитозана вплоть до точки гелеобразования, а также свежесформованных пленок, полученных на основе исследуемой системы на кварце из тонкого слоя исследуемого раствора (рис.10).

Полоса 285 *нм* по литературным данным относится к продукту реакции дженипина с аминогруппой хитозана, поглощение в этой области спектра увеличивается в растворе с первых минут прибавления дженипина и продолжает расти в сформированной пленке (рис.10). Полоса 610 нм, которая по литературным данным относится к олигомерным формам дженипина, начинает появляться на спектре поглощения только после 60 минут.

Наличие индукционного периода для изменения полосы 610 *нм*, свидетельствует, что полимеризация дженипина является вторичной реакцией, и во вторичную реакцию полимеризации дженипина вступают группы дженипина с внедренным в гетероцикл в результате реакции с хитозаном атомом азота. Появление синей окраски (λ 610 *нм*) в реакционной смеси предшествует гелеобразованию в системе и является индикатором этого процесса. Это также свидетельствует о том, что реакция сшивки хитозана происходит с участием олигомерных производных дженипина, привитых к макромолекулам хитозана (рис. 11).

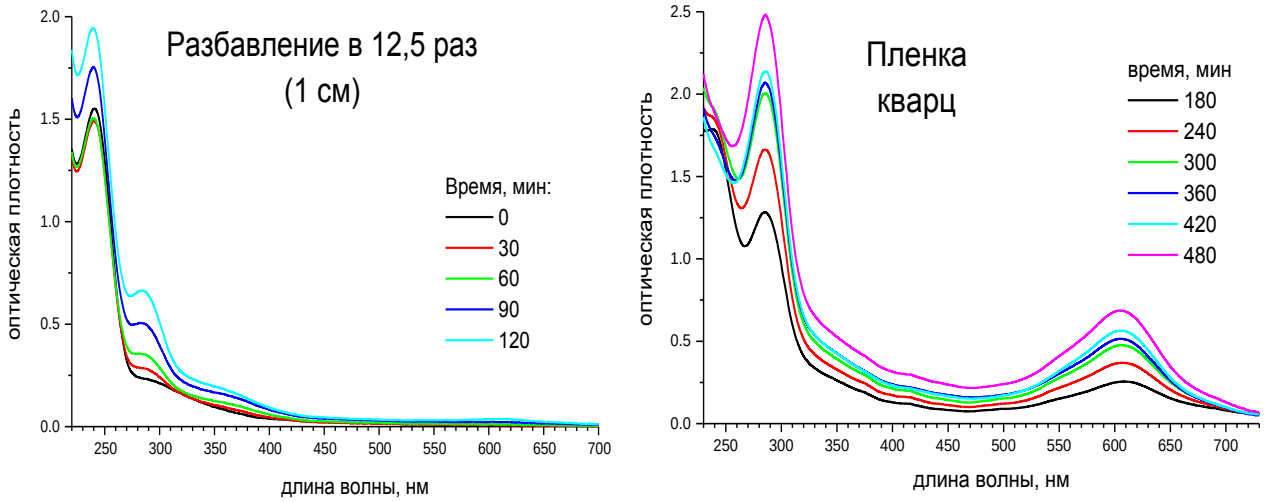


Рис. 10 – Электронные спектры поглощения раствора хитозана, содержащего дженипин, в процессе его реакции с дженипином при разбавлении 12,5 (слева) и свежесформованной пленки (справа).

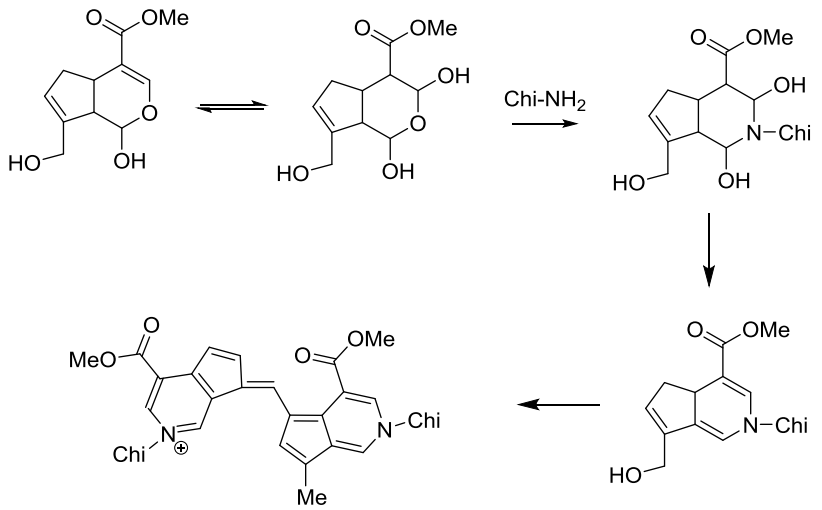


Рис. 11 – Схема, иллюстрирующая стадии реакции взаимодействия хитозана с Gp в водной среде.

Получение пленок на основе хитозана, сшитого дженипином.

С использованием расчетных и экспериментальных методов произведена оценка числа сшивок, необходимых для гелеобразования в растворе хитозана на основе гелеобразующей системы раствор хитозана – сшивающий реагент на примере нескольких сшивающих реагентов (ГА, окисленные производные нуклеотидов, Gp). Показано, что для получения не растворимых в воде гидрогелей в зависимости от природы сшивающего реагента достаточно 2,7 – 5 сшивок на 100 элементарных звеньев хитозана.

При получении пленок в процессе испарения растворителя концентрация раствора увеличивается, и для завершения реакции сшивки при получении пленок достаточно меньшего количества сшивающего реагента, чем для гелеобразования в 2-4%-ных растворах хитозана. В процессе испарения растворителя пленки приобретают голубую окраску, интенсивность которой увеличивается с увеличением содержания дженипина. Пленка, полученная при низком содержании Gp 0,0025

моль/моль, после испарения растворителя в течение 2-х дней оставалась бесцветной, однако впоследствии также становилась голубой.

Сшивка бифункциональным реагентом, фиксируя полимерные цепи, не позволяет им принимать равновесные конформации в процессе испарения растворителя. Этот факт подтверждается обнаруженным снижением уровня физико-механических свойств большинства сшитых пленок (Таблица 2): прочность пленок, полученных с использованием соотношений Gp/NH_2 0,003 и 0,02 моль/моль значительно ниже прочности пленки, полученной в условиях равновесной релаксации полимерных цепей (отсутствие сшивающего реагента, медленное испарение растворителя 20°C, 2 суток). Однако снижение содержания дженипина до концентрации, при которой испарение растворителя происходит быстрее, чем завершается сшивка макромолекулярных цепей хитозана, не только не приводит к снижению, но и увеличивает прочность пленки, вследствие фиксации макромолекулярных цепей в равновесном положении, в котором в наибольшей степени реализуются межмолекулярные взаимодействия (п.4, таблица 2).

Таблица 2 – Разрывная нагрузка пленок, полученных из хитозана и хитозана, сшитого дженипином при различных соотношениях сшивающего реагента к аминогруппе полимера

№ пп	Соотношение Gp/NH_2, моль/моль	Разрывная нагрузка, МПа	Разрывное удлинение, %
1	0	73	33
2	0,02	65	33
3	0,003	55	25
4	0,0025	90	15

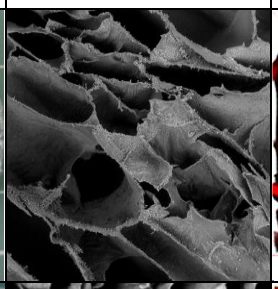
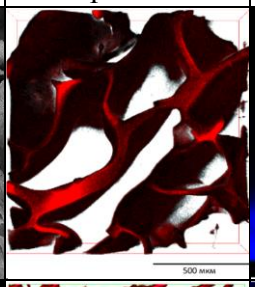
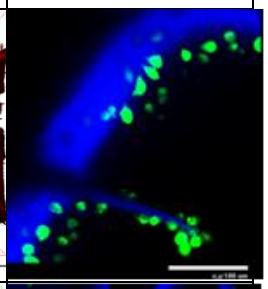
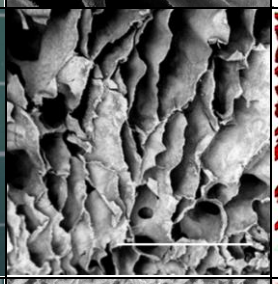
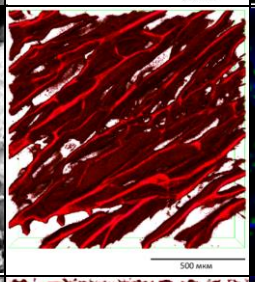
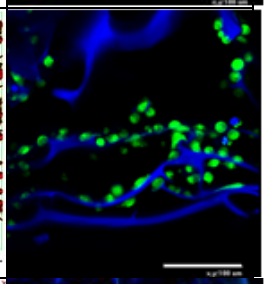
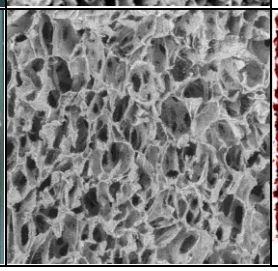
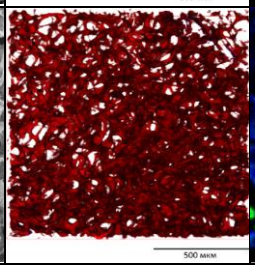
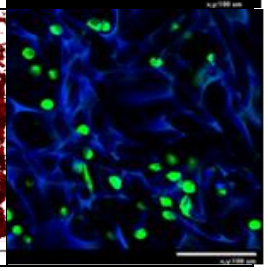
Прочность, контрастная синяя окраска, высокая влагоудерживающая способность гидрогелевых пленок (до 2200%) и возможность ее регулирования за счет изменения условий сшивки создает перспективы для создания на их основе материалов для хирургии.

Получение биополимерных матриксов на основе хитозана, сшитого Gp или ГА.

Неотъемлемой частью тканевой инженерии является разработка оптимального биодеградируемого полимерного каркаса – скаффолда (матрикса), обеспечивающего адгезию и пролиферацию клеток, который должен постепенно замещаться формирующимися тканями или органами. Основные требования, которые предъявляются к полимерным матриксам – это биологическая совместимость, крупнопористая морфологическая структура, поддерживающая миграцию, заселение (адгезию) и последующую жизнедеятельность клеток.

Пористые матриксы были получены путем замораживания и лиофилизации гидрогелей хитозана. Условия получения гидрогелей выбирали на основании проведенных исследований процесса гелеобразования хитозана в присутствии сшивающего реагента дженипина или ГА. Внешний вид и структура биополимерных матриксов, полученных лиофильной сушкой образцов гидрогелей хитозана, приведены в таблице 3 (отрезок масштабной линейки соответствует 500 мкм).

Таблица 3 – Биополимерные матриксы на основе хитозана, сшитого ГА и Gp.

№	ММ хитозана/концентрация раствора/СР	Структура биополимерных матриксов			Распределение и морфология клеток мышиных фибробластов
		Фотография поверхности	Электронная микроскопия	Конфокальная лазерная микроскопия	
1	320 кДа/2,0 %/Gp				
2	190 кДа/3,2%/Gp				
3	320 кДа/2,0%/ГА				

Цитотоксичность матриксов на основе гидрогелей хитозана изучали методом тестирования экстрактов, а в качестве модельной использовали линию мышиных фибробластов L929. Изучение влияния экстрагируемых из матрикса веществ на жизнеспособность клеток показало, что экстракты от всех образцов не были токсичны для клеток. В случае образца матрикса, полученного на основе хитозана с ММ 320 кДа, сшитого дженипином (Хит-320/Дж), доля жизнеспособных клеток была несколько выше - 105%, чем в случае образца (Хит-190/Дж) - 100% и образца, сшитого ГА (Хит-320-ГА), - 94% по сравнению с монослоем клеток. Изучение распределения клеток в образцах гидрогелей, а также качественную оценку их адгезии и распластывания, а также роста и пролиферации в матриксах проводили с помощью конфокальной лазерной микроскопии на 4 день культивирования. Результаты испытания лиофилизованных гидрогелей хитозана в качестве биополимерных матриксов показали быстрый рост, и пролиферацию клеток их распластывание на поверхности, которое свидетельствует об адгезии к материалу матрикса (табл.3, отрезок масштабной линейки соответствует 100 мкм).

Таким образом, результаты изучения механизма взаимодействия хитозана и природного сшивающего реагента дженипина и взаимосвязи состава формовочных композиций, условий реакции сшивки, кинетических закономерностей про-

цесса гелеобразования в растворах хитозана в присутствии дженипина и свойств пленок и пористых биополимерных матриксов на основе хитозана позволили определить условия получения материалов, обеспечивающие высокий уровень функциональных свойств (таблица 4).

Таблица 4 – Параметры получения и свойства пленок и пористых матриксов из хитозана, сшитого дженипином.

Полимерный материал	Технологические параметры				Свойства полимерных материалов			
	ММ хитозана, кДа	Концентрация раствора хитозана, %	pH	Gp/NH_2, моль/моль	Степень набухания %	Прочность, МПа	Размер пор, мкм	Влагопоглощение, %
Пленка	320	2,0	3,8	0,0025	2200	90	-	-
Пленка	320	2,0	3,8	0,02	340	65	-	-
Матрикс	320	2,0	5,6	0,01	-	-	500	5000
Матрикс	190	3,2	5,6	0,005	-	-	30-100	6500

Проведение экспериментального исследования закономерностей получения полимерных материалов на основе хитозана с использованием сшивающих реагентов ковалентного или ионного типа позволило обосновать применение низкомолекулярных полифосфатов для получения наночастиц и поверхностной модификации пленок, а для получения биосовместимых пленок и матриксов с высокой влагоудерживающей способностью целесообразно применять сшивающий реагент природного происхождения дженипин.

ВЫВОДЫ

1. На основании экспериментальных исследований процесса получения биополимерных материалов на основе хитозана с использованием сшивающих реагентов ковалентного или ионного типа обоснован выбор сшивающих реагентов для применения в технологии получения на основе гидрогелей хитозана материалов медико-биологического назначения с заданным уровнем функциональных свойств: наночастиц, лекарственно-наполненных пленок и матриксов с высокой влагоудерживающей способностью.
2. На примере полифосфатов: триполифосфата и пирофосфата показано, что электростатические взаимодействия не позволяют без специальных приемов проводить сшивку в процессе формования полимерного материала, однако эти соединения могут быть с успехом использованы для получения наночастиц и поверхностной модификации пленок.
3. Установлены закономерности процесса сшивки и гелеобразования в растворах хитозана разной молекулярной массы в присутствии природного сшивающего реагента дженипина.
4. Установлены параметры процесса получения хитозановых пленок, сшитых нетоксичным реагентом дженипином, с прочностью, превышающей прочность

не сшитых пленок, и степенью набухания 2200%. Такие свойства наряду с контрастной окраской отвечают требованиям к хирургическим материалам для лечения ран.

5. Впервые с использованием расчетных и экспериментальных методов произведена оценка числа сшивок, необходимых для гелеобразования в растворе хитозана и получения пленок на основе гелеобразующей системы раствор хитозана - дженипин. Показано, что для получения не растворимых в воде пленок со степенью набухания около 1000% достаточно 2,7 зацеплений на 100 элементарных звеньев хитозана.
6. Получены широкопористые биополимерные матриксы для тканевой инженерии на основе хитозана, сшитого дженипином или глутаровым альдегидом, с низкой цитотоксичностью, обеспечивающие быстрый рост и пролиферацию клеток.

Основное содержание диссертации опубликовано в работах:

Публикации в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК:

1. **Касаткина М.А.** Получение биологически активных пленочных материалов на основе хитозана, модифицированных полифосфатами / М.А. Касаткина, Н.А. Буданцева, Н.Р. Кильдеева // Химико-фармацевтический журнал. – 2016. – Т.50. – № 4. – С.32-39.

2. Кильдеева Н.Р. Особенности получения биосовместимых пленок на основе хитозана, сшитого дженипином / Н.Р. Кильдеева, **М.А. Касаткина**, С.Н. Михайлов // Все материалы. Энциклопедический справочник. – 2016. – №4. – С. 9-14.

3. Mikhailov S.N. Crosslinking of chitosan with dialdehyde derivatives of nucleosides and nucleotides. Mechanism and comparison with glutaraldehyde / S.N. Mikhailov, A.N. Zakharova, M.S. Drenichev, A.V. Ershov, **M.A. Kasatkina**, L.V. Vladimirov, V.V. Novikov, N.R. Kildeeva // Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. – 2016. – Vol. 35. – №3. – P.114-129.

4. Кильдеева Н.Р. Биодеградируемые матриксы на основе хитозана: получение, изучение свойств и использование для культивирования животных клеток / Н.Р. Кильдеева, **М.А. Касаткина**, М.Г. Дроздова, Т.С. Демина, С.А. Успенский, С.Н. Михайлов, Е.А. Марквичева // Прикладная биохимия и микробиология. – 2016. – Т. 52. – №5. – С. 504-512.

5. Михайлов С.Н. Об определении степени сшивки хитозана в реакции с диальдегидами / С.Н. Михайлов, С.А. Гаврюшов, **М.А. Касаткина**, Н.Р. Кильдеева // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2016. – №3(1). – С. 87-90

6. Симаненкова Л.М. Изучение полимерных смесей на основе хитозана и аминосодержащего сополиалкилметакрилата EudragitE / Л.М. Симаненкова, И.М. Липатова, Е.А. Мезина, **М.А. Солянкина**, Н.Р. Кильдеева // Пластические массы. – 2013. - № 4. – С.33–37

Патент

7. **М.А. Касаткина** Способ получения пленок на основе хитозана с использованием ионных сшивающих реагентов : пат. 2586697 РФ : МПК C08J 5/18 / Н.Р. Кильдеева, **М.А. Касаткина**; патентообладатель ФГБОУ ВПО МГУДТ. – №2014151870/05 ; заявл. 22.12.2014 ; опубл. 10.06.2016, Бюл. № 16. – 8с.

Публикации в других изданиях:

8. Чалых А.Е. Структура и свойства пленок хитозана, сшитого дженипином / А.Е. Чалых, Н.Р. Кильдеева, **М.А. Касаткина**, Т.Ф. Петрова, В.К. Герасимов, В.В. Матвеев, Р.Р. Хасбиуллин // Сборник статей XXIII Всероссийской конференции «Структура и динамика молекулярных систем». – 2016. – № 23. – С. 36-45.

9. **Касаткина М.А.** Разработка гидрофильных пленок с антимикробным и анестезирующим действием / М.А. Касаткина, Л.М. Симаненкова, Н.Р. Кильдеева, Т.А. Чердынцева // Сборник тезисов докладов Всероссийской научной Интернет-конференции с международным участием «Фармакологическая наука – от теории к практике». – Казань. – 2014. – С. 36-40.

10. **Kasatkina M.A.** Polymeric materials based on amino-containing polymers for controlled drug release / M.A. Kasatkina, L.M. Simanenkova, T.A. Cherdynceva, N.R. Kildeeva // 5th International Congress “Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues” “BIONANOTOX 2014”. – Heraklion. – 2014. – P.31.

11. Кильдеева Н.Р. Получение высоконабухающих биологически активных пленок на основе хитозана, модифицированного полифосфатами / Н.Р. Кильдеева, **М.А. Касаткина**, Л.М. Симаненкова, Т.А. Чердынцева // Сборник тезисов докладов XII международной конференции «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана». – Пермь. – 2014. – С. 161 – 165.

12. **Kasatkina M.A.** Preparation of highly swellable biologically active films based on chitosan modified by polyphosphates / M.A. Kasatkina, N.R. Kildeeva // XV International Scientific Conference «High-Tech in Chemical Engineering – 2014». – Звенигород. – 2014. – С. 271.

13. **Касаткина М.А.** Биополимерные пленки на основе хитозана / М.А. Касаткина, Г.А. Баязитова // Сборник научных трудов VIII Международной конференции молодых ученых и специалистов «Фундаментальные и прикладные исследования по безопасности и качеству пищевых продуктов». – Видное. – 2014. – С.98-102.

14. **Касаткина М.А.** Получение лекарственно-наполненных пленок на основе хитозана с использованием сшивающих реагентов ионного типа / М.А. Касаткина // Сборник тезисов докладов XXII Международной молодежной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2015». – Москва. – 2015. Режим доступа - http://lomonosov-msu.ru/rus/event/3000/.

15. **Касаткина М.А.** Изучение взаимодействия хитозана с полифосфатами в водных растворах / М.А. Касаткина, Н.Р. Кильдеева // Сборник тезисов докладов X Всероссийской школы-конференции молодых ученых «Теоретическая и экспериментальная химия жидкофазных систем» «Крестовские чтения-2015». – Иваново. – 2015. – С. 49-50.

16. **Касаткина М.А.** Изучение процесса модификации хитозановых пленок биологически активными веществами / М.А. Касаткина, Н.Р. Кильдеева // Сборник материалов Международной научно-технической конференции «Инновации-2015». Часть 2. – Москва. – 2015. – С. 187-190.

17. **Касаткина М.А.** Получение гидрогелей на основе хитозана с использованием дженипина / М.А. Касаткина // Сборник тезисов докладов XXIII Международной молодежной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016». – Москва. – 2016. Режим доступа - https://lomonosov-msu.ru/rus/event/3500/.

18. Demina T. Effect of hyaluronic acid on structure and properties of genipin-crosslinked macroporous chitosan hydrogels / T. Demina, M. Drozdova, M. Maslova, **M. Kasatkina**, S. Uspenskii, E. Markvicheva, N. Kildeeva, N. Mikhaylova, M. Selyanin // 3rd International Conference “Bio-Based Polymers and Composites” BiPoCo-2016. –Szeged. – 2016. – P. 49-50.

19. Сажнев Н.А. Получение биосовместимых гелей и пленок на основе хитозана, сшитого дженипином / Сажнев Н.А., **Касаткина М.А.**, Кильдеева Н.Р. // Сборник докладов Международной конференции «Композит-2016». – Энгельс. – 2016. – С. 252-255.

Усл.-печ. 1,25 п.л. Тираж 80 экз.
Типография ООО «Артегер»
117218, г. Москва, ул. Кржижановского, д. 14, корп. 1.
Тел. 8 (495) 719-09-51 e-mail: mail@arteger.ru